

---

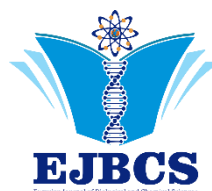
2<sup>nd</sup> International Eurasian Conference on  
**Biological and Chemical Sciences**  
(EurasianBioChem 2019)

June 28-29, 2019 / Ankara, Turkey

[www.EurasianBioChem.org](http://www.EurasianBioChem.org)



# PROCEEDING BOOK



**Chairman of Conference**

Assoc. Prof. Dr. Muhittin DOĞAN Gaziantep University, Turkey

**Organizing Committee**

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ Hatay Mustafa Kemal University, Turkey  
Prof. Dr. Ayten NAMLI Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Mehmet Rüştü KARAMAN Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ Cukurova University, Turkey  
Prof. Dr. Soumia KOUADRI MOUSTEFAL Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria  
Prof. Dr. Ümmühan ÖZDEMİR ÖZMEN Gazi University, Turkey  
Assoc. Prof. Dr. Bensaber BENSEBIA Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria

**General Coordinator**

Assoc. Prof. Dr. Erol ATAY Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

**International Scientific Committee\***

Prof. Dr. Abdullah MART Osmaniye Korkut Ata University, Turkey  
Prof. Dr. Abdunnasır YILDIZ Dicle University, Turkey  
Prof. Dr. Adem ÖNAL Gaziosmanpasa University, Turkey  
Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV Yıldız Technical University, Turkey  
Prof. Dr. Adnan AYHANCI Eskişehir Osmangazi University, Turkey  
Prof. Dr. Ahmet AKSOY Akdeniz University, Turkey  
Prof. Dr. Ahmet ASAN Trakya University, Turkey  
Prof. Dr. Ahmet KARADAG Bartın University, Turkey  
Prof. Dr. Aida SAHMUROVA Okan University, Turkey  
Prof. Dr. Ali ERDOĞAN Akdeniz University, Turkey  
Prof. Dr. Arife Alev KARAGÖZLER Aydın Adnan Menderes University, Turkey  
Prof. Dr. Atila YILDIZ Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Ayla BALABAN GUNDUZALP Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Belma ASLIM Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Bülent KAYA Akdeniz University, Turkey  
Prof. Dr. Dilek DEMİREZEN YILMAZ Erciyes University, Turkey  
Prof. Dr. Ebru Gül ASLAN Süleyman Demirel University, Turkey  
Prof. Dr. E. Sümer ARAS Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Elif Şahin IŞGIN Dokuz Eylül University, Turkey  
Prof. Dr. Emin SARIPINAR Erciyes University, Turkey  
Prof. Dr. Emine ARSLAN Selçuk University, Turkey  
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ Başkent University, Turkey  
Prof. Dr. Engin TILKAT Batman University, Turkey  
Prof. Dr. Erdogan CICEK Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey  
Prof. Dr. Erdal BALCAN Celal Bayar University, Turkey  
Prof. Dr. Fatma Jale GÜLEN Yıldız Technical University, Turkey  
Prof. Dr. Fatma ÜNAL Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Ferda CANDAN Cumhuriyet University, Turkey  
Prof. Dr. F. Zehra KÜÇÜKBAY İnönü University, Turkey  
Prof. Dr. Gönül DÖNMEZ Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ Hatay Mustafa Kemal University, Turkey  
Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ Middle East Technical University, Turkey  
Prof. Dr. Gül Deniz SELMANOĞLU Hacettepe University, Turkey  
Prof. Dr. Gülşen ASMAN Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Güray UYAR Gazi University, Turkey  
Prof. Dr. Handan UYSAL Atatürk University, Turkey  
Prof. Dr. Hasan Basri İLA Cukurova University, Turkey  
Prof. Dr. Hasan Hüseyin DOĞAN Selçuk University, Turkey  
Prof. Dr. Hasan KÜÇÜKBAY İnönü University, Turkey  
Prof. Dr. Hayati TÜRKMEN Ege University, Turkey  
Prof. Dr. Hülya ÖLÇER FOOTITT Dumlupınar University, Turkey  
Prof. Dr. Hüseyin GÜHER Trakya University, Turkey  
Prof. Dr. Hüsnüye AKA SAĞLIKLER Osmaniye Korkut Ata University, Turkey  
Prof. Dr. İbrahim ÖRÜN Aksaray University, Turkey  
Prof. Dr. İhsan AKYURT Giresun University, Turkey  
Prof. Dr. İsmail AYDIN İstanbul University-Cerrahpaşa, Turkey  
Prof. Dr. Jitendra PANWAR Birla Institute of Technology & Science (BITS), India  
Prof. Dr. Kadir YURDAKOÇ Dokuz Eylül University, Turkey  
Prof. Dr. Kamil KOÇ Celal Bayar University, Turkey  
Prof. Dr. Kayahan FISKIN Akdeniz University, Turkey  
Prof. Dr. Mehmet Rüştü KARAMAN Ankara University, Turkey  
Prof. Dr. Mikail AKBULUT Erciyes University, Turkey  
Prof. Dr. Muhammet GAFFAROĞLU Ahi Evran Üniversitesi University, Turkey  
Prof. Dr. Murat ÇELİK Atatürk University, Turkey  
Prof. Dr. Mustafa ATEŞ Ege University, Turkey  
Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN İstanbul Technical University, Turkey  
Prof. Dr. Mustafa TÜRKMEN Giresun University, Turkey  
Prof. Dr. Naime Funda TAY Eskişehir Osmangazi University, Turkey  
Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN Pamukkale University, Turkey  
Prof. Dr. Nilgün ÖZPOZAN Erciyes University, Turkey  
Prof. Dr. Noor Hasima NAGOOR University of Malaya, Malaysia  
Prof. Dr. Numan HODA Akdeniz University, Turkey

Prof. Dr. Nursel PEKEL BAYRAMGİL  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN  
Prof. Dr. Osman DUMAN  
Prof. Dr. Ömer İŞILDAK  
Prof. Dr. Ömer KOZ  
Prof. Dr. Ömür BAYSAL  
Prof. Dr. Özlem ÇETİN ERDOĞAN  
Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU  
Prof. Dr. Ramazan ERENLER  
Prof. Dr. Remziye DEVECİ  
Prof. Dr. Rıdvan ŞEŞEN  
Prof. Dr. Sadık DINCER  
Prof. Dr. Sait Aykut AYTAÇ  
Prof. Dr. Salih DOĞAN  
Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ  
Prof. Dr. Semra İLHAN  
Prof. Dr. Sinem GÖKTÜRK  
Prof. Dr. Serpil YENİSOY KARAKAŞ  
Prof. Dr. Sevda KIRBAĞ  
Prof. Dr. Sevil TOROĞLU  
Prof. Dr. Sevim AKYÜZ  
Prof. Dr. Sibel AKAR  
Prof. Dr. Soumia KOUADRI MOUSTEFAI  
Prof. Dr. Süheyla KIRMIZIGÜL  
Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS  
Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU  
Prof. Dr. Şule Coşkun CEVHER  
Prof. Dr. Talat OZPOZAN  
Prof. Dr. Tamer AKAR  
Prof. Dr. Tülin ASKUN  
Prof. Dr. Tülin AYDEMİR  
Prof. Dr. Ümmühan Özdemir ÖZMEN  
Prof. Dr. Yüksel ABALI  
Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ  
Assoc. Prof. Dr. Alime Ebru AYDIN  
Assoc. Prof. Dr. Altuğ Mert SEVİM  
Assoc. Prof. Dr. Aygül KÜÇÜKGÜLMEZ YANDIM  
Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU  
Assoc. Prof. Dr. Ayşe Dilek ÖZŞAHİN KİREÇÇİ  
Assoc. Prof. Dr. Belgin GÖZMEN SÖNMEZ  
Assoc. Prof. Dr. Berrin DURAN  
Assoc. Prof. Dr. Bensaber BENSEBIA  
Assoc. Prof. Dr. Ebru GÜREL-GÜREVİN  
Assoc. Prof. Dr. Elif Damla ARISAN  
Assoc. Prof. Dr. Elif ÖZTETİK  
Assoc. Prof. Dr. Erol AKPINAR  
Assoc. Prof. Dr. Gizem Dinler DOGANAY  
Assoc. Prof. Dr. Hasan ÇABUK  
Assoc. Prof. Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN  
Assoc. Prof. Dr. Ilgaz AKATA  
Assoc. Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK  
Assoc. Prof. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN  
Assoc. Prof. Dr. M. Burcu Irmak YAZICIOĞLU  
Assoc. Prof. Dr. Mehmet GÖNEN  
Assoc. Prof. Dr. Mehtap TEKŞEN  
Assoc. Prof. Dr. Mustafa BOGA  
Assoc. Prof. Dr. Nazlı SARIKAHYA  
Assoc. Prof. Dr. Ouahida BENSEBIA  
Assoc. Prof. Dr. Özcan YALÇINKAYA  
Assoc. Prof. Dr. Özgür ARAR  
Assoc. Prof. Dr. Özlem ÖZBEK  
Assoc. Prof. Dr. Róbert GYEPES  
Assoc. Prof. Dr. Serap Yalçın AZARKAN  
Assoc. Prof. Dr. Sevgi SEVSAY  
Assoc. Prof. Dr. Şule BARAN  
Assoc. Prof. Dr. Şükran YILDIZ  
Assoc. Prof. Dr. Tugay AYŞAN  
Assist. Prof. Dr. Banu Şebnem ÖNDER  
Assist. Prof. Dr. Cumali ÇELİK  
Assist. Prof. Dr. Engin BAT  
Assist. Prof. Dr. Mostafa NORİZADEH  
Assist. Prof. Dr. Önder YUMRUTAŞ  
Dr. Chong Yee LING  
Dr. Jana SOBOTNÍKOVÁ  
Dr. Meghane TARE  
Dr. Nur Airina MUHAMMAD  
Dr. Ryan BAIDYA

\*This list is arranged in alphabetical order.

#### Conference Secretariats

Assist. Prof. Dr. Demet DOĞAN  
Eylem KINA

Hacettepe University, Turkey  
Balıkesir University, Turkey  
Akdeniz University, Turkey  
Gaziosmanpasa University, Turkey  
Bursa Technical University, Turkey  
Mugla Sıtkı Koçman University, Turkey  
Trakya University, Turkey  
Akdeniz University, Turkey  
Gaziosmanpasa University, Turkey  
Ege University, Turkey  
Dicle University, Turkey  
Cukurova University, Turkey  
Hacettepe University, Turkey  
Erzincan University, Turkey  
Ege University, Turkey  
Eskişehir Osmangazi University, Turkey  
Marmara University, Turkey  
Abant İzzet Baysal University, Turkey  
Fırat University, Turkey  
Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Turkey  
İstanbul Kültür University, Turkey  
Eskişehir Osmangazi University, Turkey  
Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria  
Ege University, Turkey  
Cumhuriyet University, Turkey  
Recep Tayyip Erdoğan University, Turkey  
Gazi University, Turkey  
Erciyes University, Turkey  
Eskişehir Osmangazi University, Turkey  
Balıkesir University, Turkey  
Celal Bayar University, Turkey  
Gazi University, Turkey  
Celal Bayar University, Turkey  
Gazi University, Turkey  
Hatay Mustafa Kemal University, Turkey  
Istanbul Technical University, Turkey  
Cukurova University, Turkey  
Mehmet Akif Ersoy University, Turkey  
Bitlis Eren University, Turkey  
Mersin University, Turkey  
Eskisehir Osmangazi University, Turkey  
Hassiba Benbouali University of Chlef, Algeria  
İstanbul University, Turkey  
İstanbul Kültür University, Turkey  
Eskisehir Technical University, Turkey  
Abant İzzet Baysal University, Turkey  
Istanbul Technical University, Turkey  
Bülent Ecevit University, Turkey  
Cukurova University, Turkey  
Ankara University, Turkey  
Hacettepe University, Turkey  
Hacettepe University, Turkey  
Halic University, Turkey  
Süleyman Demirel University, Turkey  
Aksaray University, Turkey  
Nigde Omer Halisdemir University, Turkey  
Ege University, Turkey  
USTHB University, Algeria  
Gazi University, Turkey  
Ege University, Turkey  
Hitit University, Turkey  
Charles University, Czech Republic  
Ahi Evran University, Turkey  
Erzincan University, Turkey  
Sakarya University, Turkey  
Celal Bayar University, Turkey  
East Mediterranean Agricultural Research Institute, Turkey  
Hacettepe University, Turkey  
Yalova University, Turkey  
Middle East Technical University, Turkey  
Bülent Ecevit University, Turkey  
Adıyaman University, Turkey  
Universiti Malaysia Sarawak, Malaysia  
Karlova University, Czech Republic  
Birla Institute of Technology & Science (BITS), India  
University of Malaya, Malaysia  
California Takshila University, USA

Gaziantep University, Turkey  
Gaziantep University, Turkey

## CONTENTS

<b>1. KEYNOTE SPEAKERS</b> .....	<b>xvii</b>
Micro-mesoporous FAU type zeolite for catalytic applications.....	1
Energetic and kinetic pathways to explain performances and mechanisms, related to oriented processes through affinity polymer membranes .....	2
The mineral composition of the roots of <i>Barbarea vulgaris</i> R.Br. ....	3
Effectiveness prebiotic and synbiotic from composite flour ( <i>Canna indica</i> and <i>Spirulina platensis</i> ).....	4
Antidiabetic activity of aqueous and acetic extracts of <i>Drimys maritima</i> L. ....	5
Effect of milking season and pasture location on bioactive components of mare's milk produced in Kyrgyzstan .....	6
Inflammatory mediator and antioxidant role in gastroprotective of <i>Tinospora crispa</i> against ethanol Induced gastric ulcer .....	7
Characterization of Georgian natural phillipsites .....	8
<b>2. FULL-TEXT PAPERS</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. ORAL PRESENTATIONS</b> .....	<b>9</b>
Study and quantification of oriented processes related to the facilitated extraction of norfloxacin antibiotic through a polymer inclusion membrane .....	10
Oriented membrane processes for the facilitated extraction and recovery of L-tartaric acid through affinity polymer membranes .....	17
Evaluation of efficacy and safety of platelet rich plasma (Prp) and microneedling (Radiofrequency) in the treatment of atrophic acne scars.....	23
Bactericidal activity of metal-containing phillipsites.....	28
Recovery of commodities using sequential stepwise extraction method from agroindustrial waste .....	35
Effectiveness prebiotic and synbiotic from composite flour ( <i>Canna indica</i> and <i>Spirulina platensis</i> ) .....	42
Performance evaluation on vanadium transport through functionalized polymer membrane by Tris 2-aminoethyl amine as a carrier .....	51
Annual rings of woody plants as indicators of climatic environmental conditions .....	57
Chemical synthesis and quality control of a cardioactive substance .....	63
Kalayın kromatografik tayini için metod geliştirme .....	72
Diptera fauna distribution and its relation with some physico-chemical parameters of Göksu Stream (Istanbul/Turkey).....	80
Oligochaeta and Chironomidae fauna in Dam Lake Büyükçekmece (Istanbul/Turkey) and their relationship with some environmental variables .....	85
Glucose effect on biofilm formations of <i>S. aureus</i> strains .....	91
Etkin Biyoetanol üretimi için immobilizasyonda CaCl <sub>2</sub> solüsyonunun etkisi .....	96
Guaiazulen terpeninin <i>in vivo</i> bio-etkileri.....	100
Antibacterial activity of propolis collected in different regions from Algeria .....	107
Antimicrobial activity of jojoba leaf extracts against <i>Candida</i> species and probiotic candidate lactic acid bacteria .....	111
The inhibition effect of the black cumin derivatives on breast cancer .....	116
Başkomutanlık Tarihi Milli Parkı Afyonkarahisar-Kocatepe Bölümü' nde doğal olarak yetişen bazı hemikriptofitler ve toprak özellikleri.....	121

Preparation of magnetically separable Ag/Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> composite and its photocatalytic efficiency	126
Development of Au Doped CuFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /TiO <sub>2</sub> Heterojunction for Promoted Photoelectrochemical Water Splitting under Visible Light	131
Kara kimyon türevlerinin karaciğer kanseri üzerindeki inhibisyon etkisi	136
Erguvan ( <i>Cercis siliquastrum</i> L.)’da çimlenme engelini giderici baz ön işlemler	141
Üç <i>Onopordum</i> türünün tohum protein profillerinin karşılaştırılması ve küme analizleri	145
Türkiye kökenli <i>Salmonella</i> serovaryetelerinde biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi ve pelikül yapılarının özelliklerinin tanımlanması	151
DNA metilasyonu ve tecridinin (sequestration) <i>Salmonella</i> serovaryetelerinde biyofilm üretimi ve virülanslık üzerine etkisi	157
Elazığ ili Murat Nehrinde bor metalinin araştırılması	165
Atıksu arıtma tesisi arıtma çamurlarında civa konsantrasyonlarının izlenmesi: Malatya ili örneği	169
Prevalence of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from cheeses in Ankara	184
Mathematical modelling of the <i>Mytilus Edulis</i> dried by the method of oven	187
Effective moisture diffusivity and activation energy of <i>Loligo vulgaris</i> dried by temperature controlled infrared drier	194
The impact of Zeatin doses on <i>in vitro</i> micropropagation of <i>Hygrophila polysperma</i> (Roxb.) T. Anderson	200
Activity of Kinetin on whole plant regeneration from nodal explants of <i>Lysimachia nummularia</i> L. in liquid culture media	206
Use of principle component analysis to evaluate the sediment quality of significant dam lakes located in thrace region of Turkey	211
Water quality comparison of drinking fountains in different localities of Meriç River Basin	217
Polidimetil siloksan ve doğal kauçuktan üretilen membranın benzen gideriminde kullanımı	221
Application of response surface methodology for optimization of copper removal using a novel adsorbent	227
Synthesis of new pyrazolium based tunable aryl alkyl ionic liquids and their use in removal of methylene blue from aqueous solution	233
Yüksek su adsorpsiyon kapasitesine sahip MOF dolgusu içeren karma matris sodyum alginat membran ile bütanol dehidrasyonu	238
Batı karadeniz bölgesinde yetiştirilen fındıkların yağ asitleri kompozisyonunun araştırılması	246
Ozonlama ile endüstriyel atık sulardaki koku bileşiklerinin giderimi: Spekülatif reaksiyon mekanizması ve muhtemel ara yolları	252
Su ve süt kefirlerinin polifenol içeriklerinin ve antioksidan kapasitelerinin araştırılması	258
Ardıç ( <i>Juniperus</i> L.) türlerinin halk arasında ve modern tıpta hastalıkların tedavisinde kullanımı	264
Amerikan sarmaşığı ( <i>Parthenocissus quinquefolia</i> L.) çeliklerinin köklenme başarısı üzerinde bazı ön işlemlerin etkisi	270
Silolanan ürünlerdeki mikotoksinlerin hayvanlarda verim ve sağlık üzerine etkileri	275
Morphology and distribution of some Vespinae (Hymenoptera: Vespidae) species in Turkey	281
Morphology and distribution of some Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) species in Turkey	287
Thermal kinetics and thermodynamics of the dehydration reaction of Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·22H <sub>2</sub> O	295
Gamet ve Embriyo Kriyoprezervasyon Yöntemleri	302
Speedy/RINGO as a neuroprotector in spinal cord injury-based neurodegeneration	307

Environmental effects of micropollutans .....	313
Bitki ekstraktları elde etme yöntemleri ve bu yöntemlerin bitki ekstrakt içeriğine etkisi .....	319
Hayvan Beslemede Antibiyotik ve Antiparazitlere Alternatif Olarak Kullanılan Bitkisel Ekstraktlar .....	324
<i>Sideritis germanicopolitana</i> Bornm. subsp. <i>germanicopolitana</i> bitkisinin <i>in vitro</i> yara iyileştirici aktivitesinin değerlendirilmesi .....	327
Bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi .....	333
Comparison of aqueous extraction and bligh and dyer method on fatty acid profiles of elasmobranch fish liver .....	337
A preliminary Study on Lipid Quality of Three Commercially Important Fish Species from Black Sea .....	342
Ağır metal gideriminde sepiyolit etkinliğinin araştırılması .....	347
TiO <sub>2</sub> –sepiyolit nano kompozitleri ile sulu çözeltilerden çinko giderimi .....	356
Ameliorative effects of vitamin C on testosterone biosynthesis in acrylamide-exposed Leydig cells .....	365
Effects of arsenite and fluoride on antioxidant capacity and steroidogenesis of Leydig cells .....	372
Elmalarda boscalid ve acetamiprid pestisit kalıntılarının izlenmesi.....	379
Functional effects of cereal-like products on health .....	386
Sızıntı sularından elektro-Fenton yöntemi ile KOİ giderimi.....	395
Characterization of Georgian natural phillipsites .....	403
Investigation of some heavy metal contents of multi-floral honeys and bee pollens collected from The Central Asia.....	410
Tekstil atık sularından elektro-Fenton prosesi ile KOİ ve renk giderimi .....	414
Mechanization level of agricultural farms in three-irrigation plains of Çanakkale province .....	423
Comparison of energy use in Mediterranean olive cultivation: A case study of Çanakkale olive orchards (Turkey) .....	433
2,4-dimetilpirol ile hazırlanan bodipy temelli floresans Hg (II) sensörü .....	441
Naphthaldehyde-derived Schiff bases and Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Fe (II) and characterization of complexes.....	445
Complex flow rheology analysis using magnetic resonance imaging (MRI).....	448
Using various assays to evaluate antioxidant activity of aqueous extracts of bay leaves ( <i>Laurus nobilis</i> L.) extracted by subcritical water extraction method.....	451
Fenton ve foto-Fenton yöntemleri ile tekstil endüstrisi atıksularından KOİ ve renk gideriminin incelenmesi .....	455
Sondaj atıklarının yönetimi .....	466
Erkek obezite hastalarından gastrektomi operasyonu ile elde edilen mide dokularında glutatyon S-transferaz izozimlerinin aktivitelerinin ve toplam tiyol miktarlarının yaşa göre karşılaştırılması .....	471
Mikroplastikler .....	479
Design of biogas system with industrial symbiosis thematic area for clean energy .....	486
Using of advanced oxidation methods in industry .....	490
Antioxidant activity, physical and chemical properties of different honeys from Turkey .....	493
Phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of <i>Astragalus</i> honeys from Turkey .....	497
On the magnetic tweezer design and modeling.....	502
Removal of certain dyes in aqueous media by using Bardakçı clay.....	509

Pliyosen yaşlı Afşin-Elbistan kömür havzasının (Kahramanmaraş, Güney Doğu Anadolu).....	515
biyostratigrafisi (palinoloji).....	515
Sinakalsetin farmasötik preparatlarda 7,7,8,8-tetrasiyano kinodimetan belirteci ile spektrofotometrik analizi .....	523
The inhibitory role of chestnut honey on urease enzyme to the treatment of gastric diseases .....	529
Effects of <i>Cauliflower mosaic virus</i> on morphological parameters of kale.....	533
Evaluation of turnip plants reaction to <i>Cauliflower mosaic virus</i> .....	536
Evaluation of carba NP test for detection of carbapenemase producer <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains from clinical samples .....	540
Synergistic effects of some membrane active cationic antimicrobial peptides in combination with conventional antibiotics against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	544
Sülfametoksazol'ün Sulu Çözeltilerden Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ÇDKNT Kullanılarak Gideriminin Modellenmesi .....	550
Sulu Çözeltilerden Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ÇDKNT üzerine Sülfametoksazol Adsorpsiyonu: .....	558
Kinetik, İzoterm ve Termodinamik Çalışma.....	558
Catalytic properties of Co-B / $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> catalyst for hydrogen generation by hydrolysis of NaBH <sub>4</sub> .....	565
Humidifier design to absorb H <sub>2</sub> O content in biogas fuels.....	572
Genetik geçişli göz hastalıkları.....	575
<i>Oreochromis niloticus</i> 'un solungaç dokularında bazı oksidatif stres parametreleri (GSH ve TBARS) üzerine Chlorantraniliprolün akut toksisitesi.....	580
H <sub>2</sub> - reseptör antogonistlerinden famoditin, nizatinin ve raniditin hidrolitik, oksidatif, termal ve fotolitik stres koşulları altında bozunma davranışının HPLC ile değerlendirilmesi.....	584
Screening of petroleum degrading <i>Bacillus</i> sp. strains and the bacterial degradation of synthetic detergents in wastewater.....	588
Subkritik Su Kullanımıyla Üzüm Çekirdeklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu .....	593
Öküzgözü Üzüm Çekirdeğinden Subkritik Su Ekstraksiyonu Kullanımı ile Antioksidan Kapasitesinin Modellenmesi.....	599
Single nucleotide polymorphisms: Markers of disease susceptibility and drug response .....	605
Micro-mesoporous FAU type zeolite for catalytic applications.....	610
Heterotrof ve mikсотrof koşulların <i>Chlorella variabilis</i> türü mikroalgin yağ birikimine etkisi .....	617
Immunohistochemical evaluation of ADAMTS-5 expression in umbilical cord of gestational diabetic and preeclamptic patients .....	623
Preeclampsia leads to increased expressions of CHOP and PSTAT3 proteins in placenta; an immunohistochemical study .....	630
Preparation and antioxidant activity of N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives .....	635
Inflammatory mediator and antioxidant role in astroprotective of <i>Tinospora crispa</i> against ethanol Induced gastric ulcer .....	642
Investigation of the surface characteristics and photocatalytic properties of TiO <sub>2</sub> layers by anodic oxidation .....	657
Misel Bazlı Biyo-bozunabilir Yalıtım Levhasının Teknolojik Özellikleri .....	663
Mantar Miseli Bazlı Biyo-Bozunabilir Kompozitlerin Fiziksel ve Mekanik Özellikleri.....	667
Ladin ve Kızılağaç Odunlarında Çeşitli Ağartıcıların Renk Değişimleri Üzerine Etkisi .....	672
The mineral composition of the roots of <i>Barbarea vulgaris</i> R.Br. ....	677

Ön İşlemlerin Vernikli Odun Plastik Kompozitlerinin Aşınmada Meydana Gelen Ağırlık Kayıpları Üzerine Etkisi .....	681
Metilen mavisi adsorpsiyonu ile elde edilen biyokompozit malzemenin yara iyileşmesindeki rolü .....	687
<i>Lactarius salmonicolor</i> as an effective biomaterial for the removal of cadmium from solutions.....	696
Lead Biosorption potential of <i>Gibberella fujikuroi</i> biomass for water treatment.....	703
Biosorptive removal of cadmium from aqueous solutions by the biomaterial prepared from <i>Neurospora sitophila</i> cells .....	709
Kayın-kestane karışık ormanlarında yaprak ayrışmasının uzun süreli değişimi.....	715
Nitrate prediction of groundwater and surface water using artificial neural networks: Eskişehir Example .....	721
Parkinson Hastalığı Histopatolojisi .....	725
Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of raw honey in Central Asia .....	729
Growth properties of Sand Smelt ( <i>Atherina boyeri</i> (Risso 1880)) in İznik Lake, Turkey: Different Approaches.....	733
Tek hücre jel elektroforezi/alkali komet testi ve uygulamaları .....	738
The effect of 24-epibrassinolide on the development of spinach ( <i>Spinacia oleracea</i> L. var. Matador) seedlings.....	747
Bazı yeni 7-N-açilamino-2-okso-1,2,3,4-tetrahidrokinolin türevlerinin antioksidan özellikleri .....	756
Çanakkale'de Bulunan Peynir İşletmelerinde Laktokok Faj Prevalansının Ön Değerlendirmesi .....	760
The effect of <i>Hypericum perforatum</i> L. extracts on obesity markers in 3T3-L1 <i>Mus musculus</i> cell line..	766
Zeytinyağının Raf Ömrü Üzerine Farklı Ambalaj Materyallerinin Etkileri .....	772
Postpartum depresyon ve omega-3 yağ asitleri arasındaki ilişki.....	775
Two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanosheets with molecularly imprinted polymer for electrochemical determination of citrinin .....	780
Determination of cypermethrin by square wave voltammetry through modified polymer inclusion membrane with reduced graphene oxide.....	785
Antioxidant properties of isabella grape ( <i>Vitis labrusca</i> L.) phenolic composition .....	790
Türkiye Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki kayın-kestane karışık ormanlarında ağaçlarda göğüs yüzeyindeki çapa bağlı azot içeriğinin değişimi .....	795
İyonik sıvı katalizörlüğünde bitkisel atık yağlardan biyodizel üretimi .....	800
Tüketicilerin probiyotik ürünlere yönelik algıları: Çanakkale örneği .....	807
Struvite precipitation assessment in the presence of methionine and serine .....	814
Yaygın olarak kullanılmayan bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi .....	819
Hümitik asidin yalancı akasya ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ) ve iğde ( <i>Elaeagnus angustifolia</i> ) fidanlarının kök boğazı çapı ve fidan boyuna etkileri .....	822
Endokrin Bozucu Kimyasalların Tüketime Sunulan Kuzu Eti ve Yağında Gaz Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Tespiti ve Cinsiyetin Etkisi .....	826
Rapamycin reverses kidney injury in DOCA-salt induced hypertensive rats: Contribution of mTOR .....	830
Non dairy probiotic products .....	837
Molecular imprinted voltammetric sensor based on carbon nitride nanotubes for determination of chlorpyrifos .....	845



Platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes with molecularly imprinted polymer for determination of bilirubin.....	850
Graphene oxide with Ag@Au nanoparticles composite for methanol oxidation .....	856
A new SPR biosensor for etodolac detection in real samples .....	860
Dipirometen esaslı yeni Zn (II) komplekslerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonu .....	864
Bodipy temelli floresans Hg (II) sensörünün sentezi ve spektroskopik uygulamaları.....	868
Obezite ve mikrobiyota ilişkisi.....	872
Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerlerinin analizi.....	879
Şanlıurfa ili soğuklama süresinin Dinamik Model’le hesaplanması ve diğer modellerle karşılaştırılması	886
Sugar Acid Containing Scaffolds: Effects on Bone Tissue Regeneration.....	896
The prolactin receptor, which is very important for reproductive performance in cattle, is regulated by microRNA-196a.....	901
Fajlar ve süt endüstrisi açısından önemi .....	905
The effects of <i>Spirulina</i> produced in Çankırı geothermal water on DNA protective activity .....	914
Statistical approach to experimental design in the synthesis of polyol ester from fatty acid methyl esters by using lipozyme TL IM catalyst.....	918
<i>Ocimum basilicum</i> L. (Fesleğen) kallus kültürlerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi .....	923
Fesleğen ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) bitkisi kallus kültürlerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarının tespiti .....	932
Study of Intermetallic BaZn in B2 Structure for Elastic and Thermodynamic Properties.....	940
Grafen oksit-CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> katalizörü kullanılarak bisfenol-A'nın ultrasonik destekli fotokatalitik oksidasyonu .....	945
Structural, Elastic and Electronic Properties of CdSr compound : first-principles study .....	952
Treatment of p-aminophenol production wastewater by electrochemical oxidation process using boron-doped diamond anode.....	956
Removal of Cu(II) from aqueous solutions by wheat bran biomass as a low cost biosorbent.....	962
PLA-PMMA karışımlarından gözenekli polimerik filmlerin nefes figürü yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu.....	967
A serotipi şap virusu aşısı suşu adayları ile A <sub>22</sub> Irak ve A Tur 04-06 aşısı suşlarının plak morfolojisindeki farklılıkların genetik olarak incelenmesi .....	974
İmazalil ile indüklenen hücrel toksisite üzerine iz element takviyesinin <i>in vitro</i> değerlendirilmesi .....	982
EVA ve PP bazlı polimerik yüzeyler üzerine <i>Candida albicans</i> tutunmasının incelenmesi .....	988
Metoksi nitrokinolinlerin sentezi ve HeLa ve MCF7 kanser hücrelerine karşı antikanser potansiyellerinin belirlenmesi .....	995
Bazı siyano kinolin türevlerinin antikanser ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi .....	999
Determination of antioxidant enzyme activity changes in soybean plant under drought stress.....	1004
Sazan balığı yavrularında ( <i>Cyprinus carpio</i> ) farklı yemleme sıklığının büyüme performansı ve bazı biyometrik ölçümlere etkisi .....	1009
Stimuli-Responsive Polymer Particles for Drug Delivery .....	1015
Effect of Sodium Dodecyl Sulphate on Cu (II) Biosorption .....	1020
Effect of Temperature on Conventional Transesterification of <i>Coniochaeta hoffmannii</i> Lipids for Biodiesel Production .....	1025

Bioremoval of Commonly Used Textile Dyes by <i>Aspergillus sp.</i> ....	1029
Ceviz ( <i>Juglans regia L.</i> ) İç Yaprağının Antioksidan-Oksidan Durumu ve <i>In Vitro</i> Antimikrobiyal Kapasitesi; Cevizin Bir Başka Olası Etnomedisinal Kısmı.....	1034
Effect of Sodium Dodecyl Benzenesulfonate on the Biosorption of Reactive Black 5 by Yeast Cells ...	1043
Bioethanol Production from Turnip Juice Discards as a Raw Material by an Osmotolerant Yeast .....	1048
Estimation of Natural Radioactivity of Some Medicinal or Herbal Plants Used in Kars, Turkey .....	1054
Expression of transcription factors and miRNAs under salt stress responses in canola ( <i>Brassica napus L.</i> ) .....	1058
Prenatal ve laktasyon döneminde glifosat-bazlı bir herbisite maruziyet sıçan yavrularında oksidatif strese neden olur.....	1063
New boronate compounds and N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate compounds: synthesis and spectroscopic properties.....	1069
Sülfatlanmış Polisakkarit Fucoidan'ın Antioksidan Özelliklerinin Değerlendirilmesi .....	1074
Manyetik, fotokatalitik polimer mikrokürelerle sentetik reaktif yeşil 19 boyar maddesinin sulu çözeltilerden uzaklaştırılması ve fizikokimyasal parametrelerin incelenmesi .....	1080
Hünnap Ağacı ( <i>Zizyphus zizyphus</i> ) Yaprak ve Meyve Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özellikleri .....	1084
Removal of carcinogenic azo dyes from wastewater using calix[8]arene derivative .....	1089
İmidacloprid'in zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> ) ince bağırsak dokuları üzerine histopatolojik etkileri .....	1093
Acid blue 193 adsorption on the effect of pH and poly(divinylbenzene-vinylimidazol) investigated....	1096
Farklı derişim ve kimyasal nitelikli polimerik nanofiberlerin polimetilmetakrilat bazlı dental biyomalzemelerde kullanım etkinliğinin değerlendirilmesi.....	1099
The synthesis, characterization and spectroscopic study of new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes.....	1107
Keçi Sütüne Uygulanan Farklı Isıl İşlemlerin Peynir Özelliklerine Etkileri .....	1115
Memory Enhancing and Neuroprotective Effects of <i>Hypericum perforatum L.</i> Extracts on Cholinesterase and Tyrosinase Enzymes .....	1119
Poli(ε-CL-co-BMA) Polimerinin Termal Bozunma Kinetiğinin Analizi .....	1125
Investigation of Essential Oil Chemical Composition of <i>Thymus</i> Species ( <i>T. longicaulis</i> subsp. <i>chaubardii</i> , <i>T. sipyleus</i> and <i>T. zygoides</i> ) from Turkey .....	1132
Proliferation of HELA cells may be prevented by rivaroxaban .....	1137
Kopolimerlerin Dielektrik Sabitini Geliştirmede Frekans, Voltaj, Grafen Katkısının Etkisi ve Optimizasyonu .....	1142
PLA/bazalt ve PP/bazalt kompozitlerin performans özelliklerinin incelenmesi .....	1147
A Case Study for Determination of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae Fauna of Lakes Eber (Afyonkarahisar) and Cernek (Samsun), Turkey .....	1154
Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae Fauna of Gala Lake (Edirne) .....	1160
Microencapsulation of N-eicosane By nano Clay Particles Doped Chitosan/Sodium Alginate Wall For Latent Heat Storage .....	1165
Electrochemistry: past and present .....	1173
Atmosferik Korozyon.....	1182
Antileishmania etkili bazı bitkiler .....	1187
First record of subgenus <i>Neotrichoppia</i> (Acari: Oribatida) in Turkey .....	1192

Physical Properties and Characterization of Chitosan Films with Rosemary Extract .....	1195
Technological importance of asteroid mining .....	1197
Amonyak/amonyum nitrat çözeltilerinde malahit cevherinden bakır ve çinko liçinin yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyonu .....	1209
PBO (1,4 fenilen bisoksazolin) uyumlaştırıcısının indirgenmiş grafen oksit takviyeli .....	1214
poli(etilen teraftalat)/poli(bütlen teraftalat) kompozitlerinin özelliklerine etkisinin incelenmesi .....	1214
Sodyum Kazeinat/Poli (vinil alkol) filmleri: farklı çapraz bağlayıcıların etkilerinin incelenmesi .....	1221
Isolation of lignin from biomass using deep eutectic solvents in microwave reactor .....	1226
Krom uygulamalarının baklagil bitkilerinin verimine ve besin elementleri alınımına etkileri .....	1231
Çeltik bitkisinde arsenik uygulamaları .....	1236
Domates bitkisinde farklı organik materyal ve mineral madde uygulanması.....	1241
Elektrokoagülasyon prosesi ile mezbaha atıksularından fosfat ve azot bileşiklerinin giderimi.....	1247
Merkezi kompozit tasarım ile P(ε-CL-ko-MMA)/bentonit kompoziti kullanılarak bazik mavi 41 gideriminin modellenmesi .....	1251
Fonksiyonelleştirilmiş MWCNT ile desteklenmiş PC/PLA kompozitlerinin karakterizasyonu.....	1256
Akvaryum koşullarında <i>Anubias barteri</i> Schott'un gelişiminin izlenmesi.....	1262
Kallus ve Bitki Doku Kültüründeki Önemi .....	1266
The effects of myriocin on blood pressure and vascular reactivity in DOCA-Salt hypertensive rats.....	1275
The role of adiponectin, leptin and dietary antioxidant capacity in the pathogenesis of colorectal cancer .....	1280
Tetanoz teşhisi konulmuş bir tayda intratekal tetanoz antitoksini uygulaması.....	1288
Kedi ve köpeklerde postpartum dönem hastalıkları .....	1293
TiO <sub>2</sub> Nanotüp Dizinleri ile Acid Orange 7 Boyarmaddesinin Fotokatalitik Oksidasyonu .....	1298
Eskişehir ilinde yayılış gösteren <i>Convolvulus L.</i> (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik araştırmalar .....	1306
The Influence of Soil- and Foliar-Manganese Fertilization Along with Farm Manure and Humic Acid on Yield and Quality of the Sweet Pepper ( <i>Capsicum annuum L.</i> ) .....	1314
Temperature effects on the adsorption with microbeads in Reactive Orange 16 poly (EGDMA-VIM) .	1323
Şeftali ( <i>Prunus persica (L.) Batsch</i> ) bitkisinin organogenezle çoğaltımı .....	1329
Heavy metals' chemical partitioning in solid matrices and their use in environmental studies.....	1335
<i>In vitro</i> sürgün ucu yöntemiyle erik ( <i>Prunus domestica L.</i> ) anacının klonal çoğaltımı.....	1343
Supercapacitor device performances of rGO/PPy/Carbon black nanocomposite.....	1351
Beden kütle indeksi ile konstipasyon gelişim riski arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	1356
Türk mutfak kültüründe fermente ederek saklama .....	1363
Yetişkin Bireylerin İçecek Tüketim Alışkanlıkları ile Kolon Geçiş Zamanları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi .....	1368
<i>Salvia huberi</i> ve <i>Salvia hypargeia</i> bitki ekstraktlarının deneysel diyabetik sıçanlarda yara dokusunda CTGF, KGF ve GPx gen ekspresyon seviyelerine etkileri.....	1373
Ferro glukonat'ın sitotoksik etkisinin <i>Allium cepa</i> testi ile belirlenmesi .....	1377
Balıkesir ili ve çevresinde yetiştirilen <i>Nerium oleander</i> ve hibritlerinin DNA barkodlaması yoluyla filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi.....	1385

Synthesis and Characterization of 1,4-dilauroylamidanthraquinone as a Novel Phase Change Material for Some Thermal Energy Storage Applications .....	1391
By-catch characteristics and fecundity of the invasive swimming crab <i>Charybdis longicollis</i> in Turkey, the Eastern Mediterranean .....	1399
Synthesis and Characterization of 3-Stearoyloxyethyl Amine as a Novel Phase Change Material for Some Thermal Energy Storage Applications .....	1404
Biochemical calculation methods to determine enzyme activity .....	1413
Fabrication of polyethylene glycol-grafted polyacrylonitrile solid-solid phase change nanofibers .....	1418
General characteristics of white cheese .....	1424
Dünya’ da ve Türkiye’ de Uçucu Yağ Pazarı .....	1434
Baharat kullanımında besin güvenliğine yönelik satın alma ve muhafaza yöntemlerinin değerlendirilmesi .....	1441
Kişniş ( <i>Coriandrum sativum</i> L.) tohum uçucu yağının kullanım alanları ve uçucu yağ kompozisyonu üzerine diurnal varyabilitenin etkisi .....	1446
Exploring Comperative Effects of Sodium Lauryl Sulphate (SLS) and Sodium Laureth Sulphate (SLES) Zebrafish Embryos and Larvae .....	1452
Bitlis Katı Atık Birliği (BİKA) Katı Atık Depolama Sahası Sızıntı Suyunun Fitotoksitesinin Değerlendirilmesi .....	1457
Katı atıkların ekotoksikolojik karakterizasyonu .....	1465
Chemical recycling of waste polyethylene terephthalate bottles with neutral hydrolysis to produce terephthalic acid .....	1475
Chemical recycling of waste polyethylene terephthalate bottles with neutral hydrolysis to produce terephthalic acid .....	1480
<i>Lepidocheyla</i> Volgin akar cinsinin (Acari: Cheyletidae) Türkiye’deki ilk bulunuşu .....	1485
Theoretical (B3LYP, HF) properties [spectroscopic (FT-IR, <sup>13</sup> C/ <sup>1</sup> H-NMR), electronic, thermodynamic and geometric] of 2-(3-benzyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-on-4-yl)-azomethine) benzoic acid molecule .....	1491
Aydın ilinden izole edilmiş termofilik bakterilerde selülaz enzim aktivitelerinin tayini .....	1499
Serum oxidative stress biomarkers in rat models acutely and chronically exposed to electromagnetic fields .....	1509
Doğal ve hızlandırılmış yaşlandırma testlerinin ahşap kaplamanın yüzey özelliklerine etkisi .....	1513
Nanoparticle containing coating of timber in outdoor applications .....	1521
Monosodyum glutamat .....	1527
Yüksek kaliteli kömürün Hummers yöntemi ile oksidasyonu .....	1531
The Effects of Sodium Laureth Sulphate On Zebrafish Liver Organotypic Culture .....	1536
Kalp dokusunda rotenon maruziyetinin oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkileri .....	1542
Antrasen grubu içeren Pd-NHC komplekslerinin sentezi ve Suzuki-Miyaura tepkimesinde katalitik özelliklerinin incelenmesi .....	1548
Kentsel alanlarda ağaç transplantasyon çalışmaları .....	1554
İmidacloprid’in zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> ) karaciğer dokusu üzerindeki histolojik etkisi .....	1562
A DFT/TDDFT Study: Reactivity analysis of benzimidazolium derivative molecules .....	1566
1-(Allyl)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolium tuzu ve bu tuzun Ag(I) kompleksinin antiproliferatif aktivitesinin araştırılması .....	1570

Temel bilimler ve nanoteknoloji.....	1576
Offroad'un orman yolları ve ormanlık alanlardaki etkisi (Belgrad ormanı örneği).....	1580
Dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) Bileşiğinin Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi .....	1586
Dikloro-[1-(2-metalli)benzimidazol]-( <i>p</i> -simen)rutenyum(II) Kompleksinin Antikanser Aktivitesi .....	1592
Amine-functionalized graphene oxide supported effective metal nanocatalyst for dimethylamine-borane dehydrogenation in water .....	1597
Catalytic reduction of 2-nitrophenol in water by using carbon-based material supported metal (0) nanoparticles .....	1603
Sıçanlarda oluşturulan deneysel böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında akut agomelatin uygulaması koruyucu rol üstlenir mi?.....	1610
Functionalized graphene supported transition metal (0) nanoparticles: effective catalysts for the catalytic reduction of thioflavin-T in water.....	1614
Efficient removal of radioactive uranium from aqueous solutions using high surface area metal-organic framework: UTSA-76.....	1619
Orman yönetiminde insansız hava aracı uygulamaları .....	1624
Investigation of antibacterial properties of textile surfaces treated with zeolite-added chitosan.....	1629
Salusin- $\beta$ insan over kanseri hücrelerinde proliferasyona neden olur: <i>In vitro</i> bir araştırma .....	1637
The effects of gastric digestion and refrigerated storage on beef marinated with different food materials .....	1642
Synthesis of TiO <sub>2</sub> based nanocomposites and their Supercapacitor Applications .....	1650
Investigation of edible starch film properties using malonic acid as crosslinking .....	1658
Kronik hastalık riskinin belirlenmesinde antropometrik ölçümlerin değerlendirilmesi .....	1661
Sürdürülebilir beslenmenin besin ögesi alımlarına göre değerlendirilmesi.....	1665
Kauçuk-metal yapıştırıcısı sentezinde melamin formaldehit reçinenin etkisi .....	1669
<i>Cymbopogon spp.</i> ve <i>Helianthemum spp.</i> bitki ekstraktlarının in-vitro antibakteriyal aktivitelerinin araştırılması .....	1674
The Development of Copper Based Nanocatalysts for the Catalytic Hydrolysis of Hydrazine-Borane..	1680
Acid Blue 25 Adsorption on the effect of pH and poly(DVB-Vpirid)-TiO <sub>2</sub> .....	1685
Assessment of neuroprotective and antioxidant potentials of <i>Tribulus terrestris</i> L. aqueous and methanol extracts using <i>in vitro</i> assays .....	1688
Valorization of clover stalk and polyvinyl chloride wastes via in co-pyrolysis using thermogravimetric analysis.....	1695
The effect of pH in the removal of synthetic reactive acid violet 7 dyes from magnetic photocatalytic polymer microspheres .....	1703
Yarı kurak alanlarda yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi .....	1707
Baraj çevresi yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi .....	1715
First record of <i>Liacarus (L.) subterraneus</i> (Koch, 1844) from Turkey.....	1724
Synthesis and structural characterization of HMBOS; A comparative MP2 and DFT study .....	1727
Porous Polyurethane Film Fabricated Via The Breath Figure Approach For Biomedical Application ...	1734
Synthesis, characterization, electronic and nonlinear optical properties of new schiff base of sulfamethoxazole and its Pd(II) complex .....	1748

Synthesis, characterization, spectroscopic and electronic properties of sulfa drugs.....	1756
Optimization of encapsulation parameters by experimental design method in alginate-chitosan membrane capsules .....	1764
Acid blue 29 adsorption on the effect of pH and poly(DVB-Vpirid)-TiO <sub>2</sub> .....	1772
Hydrothermal Fructose Conversion over Sulfated Zeolite: Effect of Acid Concentration .....	1775
A morphological study on aedeagus and spermatheca of <i>Cassida fausti</i> Spaeth & Reitter, 1926 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey .....	1781
A morphological study on aedeagus and spermatheca of <i>Cassida rubiginosa</i> Müller, 1776 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey .....	1788
A SEM study on aedeagus and spermatheca of <i>Cassida pannonica</i> Suffrian, 1844 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey .....	1795
A SEM study on aedeagus and spermatheca of <i>Cassida vibex</i> Linnaeus, 1767 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey .....	1807
Stability enhancement in pectolytic enzymes by covalent immobilization .....	1820
The Adhesion of Dyes on Polymer and Investigation of pH Effect .....	1826
Acarlar Longoz Ormanı Çevresindeki Yerel Halkın Ekoturizme Yönelik Bakış Açılarının İncelenmesi .....	1829
Koyun ve sığır yetiştirilen karma bir çiftlikten coryza gangrenosa bovum tespiti .....	1837
Synthesis of rGO/Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Nanocomposites and Supercapacitor Characterizations .....	1841
Hayvan beslemede kullanılan aromatik ve terapötik bitkilerin et kalitesi üzerine etkileri .....	1849
Kongenital anomalili yavru doğumu görülen bir koyunculuk işletmesinde viral enfeksiyonların varlığının araştırılması .....	1853
Grafted Thermosensitive Gelatin Scaffold as Drug Delivery System .....	1856
Production and characterization of calcium silicate added Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> for bioceramic applications.....	1864
3D yazıcılar ve gıda uygulamaları .....	1871
İyonize radyasyon uygulanan NRK-52E hücre hattında vitamin c'nin apoptotik yolağa etkisi .....	1878
Ab-initio Study of Physical Properties of TbMn <sub>2</sub> O <sub>6</sub> .....	1883
Fonksiyonel Organik Malzeme Bileşenli Hibrit Aygıtın Elektriksel Parametrelerinin Belirlenmesi .....	1886
<i>Achillea nobilis</i> subsp. <i>denissima</i> uçucu yağının kimyasal bileşenleri ve radikal giderim aktiviteleri....	1890
Biyomedikal uygulamalar için <i>Inula viscosa</i> metanol ekstresi içeren polivinil alkol-nişasta hidrojel 1896	
Magnetit nanoparçacıklar varlığında nitroaromatik enerjetik madde trinitrotoluenin spektroskopik tayini .....	1908
Krom(III) varlığında peroksidisülfattan sülfat radikallerinin oluşturulması ve antioksidan kapasite tayininde kullanılması .....	1913
Ruminant beslemede kullanılan bazı mikro mineraller ile ilgili son gelişmeler.....	1919
Işınlama teknolojisinin gıda kalitesi ve duyu özellikleri üzerine etkileri .....	1926
Kedi ve köpek beslemede fonksiyonel gıdaların önemi.....	1934
Çeşitli su ve atık su kaynaklarında demir gideriminde antiskalant verimliliğinin incelenmesi .....	1938
Comparison of Two Techniques for Corrosion Protection Ability of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde: Self-assembled Monolayer Films and Inhibitor Applications .....	1944
Stability and Surface Properties of Self-assembled monolayer films of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde on Copper.....	1949

The Use of Bingöl-Adaklı Propolis Self-Assembled Monolayer Films for Metal Protection .....	1953
Methanol electrooxidation activity of MoCu-Au composit electrocatalyst in alkaline solution .....	1959
Siyah çayda bulunan eser Fe(III), Cu(II), Ni (II), Zn(II), Pb(II) and Se(IV) elementlerin diferansiyel puls polarografisi ile tayini .....	1964
Siyah Çayda bulunan İyodür ve Florürün İyodür ve Florür Seçici Elektrotlar ile Tayini .....	1969
Fabrication of superhydrophobic surfaces on aluminum substrates by dip coating method.....	1975
Improvement of superhydrophobic coatings on aluminum surfaces by acid etching method using phosphoric acid .....	1979
Investigation of spectral properties of newly synthesized organometallic ruthenium complexes .....	1984
Investigation of the antimicrobial effects of red beet root ( <i>Beta vulgaris</i> L.) wastes from Turkey .....	1992
Kanser hastalığının tedavisinde kullanılan bazı bitkiler ve bunların etnobotanik olarak kullanımları ....	1998
Kitosan Bazlı Enjekte Edilebilir Kemik Greftlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	2005
<b>2.2. POSTER PRESENTATIONS.....</b>	<b>2021</b>
Study of some detergents effects against the fungi isolated from dog's shed in Baghdad .....	2022
Performance evaluation on vanadium transport through functionalized polymer membrane by TREN as a carrier .....	2027
Effect of 532nm CW Nd:YAG laser on antibiotics susceptibility of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from burn and wound infections .....	2034
Study antibacterial activity of ethanolic extract of wild mint leaves against different pathogenic bacteria isolated from burn wound infections .....	2040
Lignin modifikasyon yöntemlerinin araştırılması ve fenolik içeriği azaltılmış lignin esaslı reçine sentezi .....	2048
Ayvalık Tuzlası'nın bakteriyel çeşitliliğinin araştırılması .....	2055
Deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda üzüm ( <i>Vitis vinifera</i> L.) meyve ve çekirdek ekstraktlarının serum parametreler üzerine etkilerinin araştırılması .....	2061
Experimental optimization of emulsion liquid membrane for selective cadmium separation and concentration from acidic zinc plant leach .....	2069
Isolation of lactic acid bacteria from tarhana.....	2076
Farklı ambalaj materyallerinde muhafaza edilen zeytinyağlarında kalite parametrelerinin karşılaştırılması .....	2087
Antimicrobial activity and QSAR studies of some new (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanols.....	2091
İyonik sıvı modifiye edilmiş polimer sorbentler ile sulu çözeltilerden Zn(II) giderimi .....	2095
Apiterapinin Türkiye'deki yeri .....	2104
Studies on anticholinesterase and antioxidant effects of samples from <i>Iris</i> L. genus of Turkish origin..	2110
Isolation and identification of cholinesterase inhibitors from the bulbs of <i>Iris pseudacorus</i> L.....	2117
Sign of folic acid targeted pH-sensitive magnetic nanocarriers .....	2123
<i>In vitro</i> study on antioxidant, antibacterial and DNA interaction activities of extracts from <i>Arbutus andrachne</i> L. ....	2133
Gemilerde korozyon ve korunma yöntemleri .....	2141
<i>Trametes versicolor</i> özütünün sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitesi.....	2146
Antibacterial, antioxidant and dna interaction properties of <i>Cistus creticus</i> L. extracts .....	2154

The antibiofilm activity of juglone loaded nanoparticles against <i>Fusarium</i> spp.....	2160
Yenilenebilir enerji kaynakları .....	2172
Biyoaktif bileşiklerin oleojel dağıtım sistemleriyle hazırlanması ve uygulamaları.....	2176
<i>In vitro</i> study of mTOR gene expression in plasma based microrna-7 / chitosan complexes in hepatocellular carcinoma cell lines .....	2185

DRAFT





## 1. KEYNOTE SPEAKERS

Name-surname	Country	Page no
Vladimer Tsitsishvili	Georgia	1
Miloudi Hlaibi	Morocco	2
Ruzanna Aitkazina	Kazakhstan	3
Nita Noriko	Indonesia	4
Bouatrous Yamina	Algeria	5
Aichurok Mazhitova	Kyrgyzstan	6
Walaa Najm Abood	Iraq	7
Nanuli Dolaberidze	Georgia	8

## Micro-mesoporous FAU type zeolite for catalytic applications

Vladimer Tsitsishvili\*, Nanuli Dolaberidze, Nato Mirdzveli, Manana Nijaradze, Zurab Amiridze, Vakhtang Gabunia, Giorgi Tsintskaladze

Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry of Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia.

\*Corresponding author e-mail: v.tsitsishvili@gmail.com

### Abstract

The effectiveness of zeolite catalysts increases when a secondary porous network exists in the material, thereby allowing shorter diffusion paths and providing access of reagents to active sites on the surface of the catalyst. The purpose of the study was to obtain a micro-mesoporous FAU type zeolite by recrystallization of Georgian natural phillipsite. It is found that phase-pure zeolite with chemical composition  $[\text{Na}_{66(3)}[\text{K}, \frac{1}{2}\text{Ca}, \frac{1}{2}\text{Mg}, \frac{1}{2}\text{Cu}, \frac{1}{2}\text{Zn}]_{12(1)}(\text{H}_2\text{O})_{248(10)}](\text{Al}_{78(3)}\text{Si}_{114(4)}\text{O}_{384})$  can be prepared in the form of octahedral crystallites with uniform micrometric (2-7  $\mu\text{m}$ ) dimensions by hydrothermal crystallization (95°C) of aged (96 hr) at room temperature aluminosilicate gel (2.9Na<sub>2</sub>O: 0.26Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 1SiO<sub>2</sub>: 150H<sub>2</sub>O) obtained from water suspension of natural phillipsite, treated with hydrochloric acid and mixed with sodium hydroxide. According to the X-ray diffraction pattern showing the strongest peak at  $2\theta = 6.1^\circ$  (hkl=111, d-spacing 14.28Å) and all weaker peaks typical for hydrated NaX zeolite, as well as in accordance with the IR spectrum presenting all characteristic vibration bands, the resulting zeolite has a crystal structure FAU and is classified as the Na-X type. The nitrogen adsorption-desorption plot measured at 77 K corresponds to typical Langmuir isotherm at a relative pressure up to  $p/p_0=0.9$ ; specific surface area calculated by the Brunauer-Emmett-Teller method is 589 m<sup>2</sup>/g. At higher pressures ( $0.925 < p/p_0 < 0.999$ ), type H<sub>1</sub> narrow hysteresis loop is observed, corresponding to the filling of well defined cylindrical pore channels with average diameter of 55 nm calculated by the Barrett-Joyner-Halenda method; the total pore volume is 0.578 cm<sup>3</sup>/g, of which 52% are micropores with a diameter <0.8 nm, and 48% are mesopores. Measured for water vapor sorption capacity exceeds 0.2 cm<sup>3</sup>/g, scientific ion exchange capacity of prepared NaX is 4.876 meq/g. The resulting zeolite in its characteristics is competitive with commercially available materials; additionally, it has a developed system of mesopores providing transport of large molecules.

**Keywords:** Hydrothermal crystallization, Phillipsite, Micro-mesoporous zeolite X.

## Energetic and kinetic pathways to explain performances and mechanisms, related to oriented processes through affinity polymer membranes

M. Hlaibi<sup>1,2,\*</sup>, H. Mouadili<sup>1</sup>, H. EL Atmani<sup>1</sup>, R. Louafy<sup>1</sup>, S. Tarhouchi<sup>1</sup>, K. Touaj<sup>1,2</sup>, L. Lebrun<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Génie des Matériaux pour Environnement et Valorisation (GeMEV), Equipe I3MP, Faculté des Sciences Aïn Chock, B.P. 5366, Maârif, Casablanca, Morocco.

<sup>2</sup> Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces UMR 6270 du CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France.

\*Corresponding author: Email: m.hlaibi58@gmail.com

### Abstract

Membranes for extraction, separation and recovery are adopted in industry: desalination, pharmaceutical, biotechnological, food. In particular, polymer membranes, which are efficient for processes and are adopted to carry out research and development topics.

Polymer membranes containing, *Methyl cholate*, *Resorcinarene*, *Dibenzo-18-crown-6* and  *$\beta$ -Cyclodextrin*, were prepared and characterized. Obtained membranes were adopted to carry out extraction processes of substrates that are active ingredients very useful for industries. Processes were performed at different acidities and temperatures, *permeability* and *initial flux* of the membranes were determined for studied processes.

Initial fluxes of extracted substrate are related to initial concentrations by a law, which allowed determining *apparent diffusion coefficient* and *association constant* for the migration of substrate across membrane. Results show an influence on membrane performances, and *activation parameters* were determined.

Membrane performances and selectivity are related to movement nature of substrates through membranes, and to *energetic* or *kinetic* pathway that control processes mechanisms.

**Keywords:** affinity polymer membranes, oriented processes, permeabilities, apparent diffusion coefficients, activation parameters.

**Projects:** PPR2/ERANETMED3 (MESRSFC – CNRST)

## The mineral composition of the roots of *Barbarea vulgaris* R.Br.

Ruzanna Aitkazina<sup>1\*</sup>, Sluken Rakhmadieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eurasian National University named after L.N.Gumilyov, Department of Chemistry, Nur-Sultan, Kazakhstan.

\*Corresponding author e-mail: ruzanna0598@gmail.com

### Abstract

The purpose of the work is to determine the mineral composition of *Barbarea vulgaris* R.Br. Brassicaceae Burnett family by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with mass spectrometry from *Leeman Lab Profile Plus*. As a result of the research, it was revealed that the roots of the plant *B. vulgaris* R.Br. rich in macro - and microelements (41 elements), 11 of which are vital. Roots are represented by the highest content of such elements as - P, Al, Fe, Sr, Ti, Zn and Mn. Analysis of the content of heavy metals showed that the content of the elements Pb, As, V, Cd, Co, Cu corresponds to the MPC, with the exception of zinc, the concentration of which exceeds twice. Also, an analysis of the good quality of raw materials was carried out. According to these calculations, the rate of extractability of raw materials is 28.183%, the total ash was 6.4398%, the ash is insoluble in 10% HCl is 2.4633%, and the value of sulfate ash is 4.4534%.

**Keywords:** *Barbarea vulgaris*, mineral composition, heavy metals.

## Effectiveness prebiotic and synbiotic from composite flour (*Canna indica* and *Spirulina platensis*)

Nita Noriko\*, Alina Primasari, Sheila Syaifiyah Istiqo

Universitas Al Azhar Indonesia (UAI) . Jln. Kompleks Mesjid Agung Al Azhar Jln. Sisingamangaraja,  
Kebayoran Baru Jakarta Indonesia

\*Corresponding author e-mail: nita\_noriko@uai.ac.id

### Abstract

Prebiotic can stimulate growth of non pathogenic microflora in intestinal such as Bifidiobacteria and Lactobacillus with the result that prevent benefit of health. Sources of prebiotic that contain oligosaccharide were *Canna indica* and *Spirulina platensis*. Information about the effectiveness of *C. indica* and *S. platensis* as prebiotic and component of synbiotic based on in vivo treatment were minimal. Aims of the research were to know the effect of flour composite from *C. indica* and *S. platensis* (Cannalina) as prebiotic and synbiotic on ability to suppress total of microbe and support the growth and hold *Lactobacillus* (LAB) in intestine male *Sprague dawley*. The methodology was experimental design which divided for 4 groups for treatment. There were control, prebiotic, probiotic and sinbiotic groups. The division of control group which was mice fed up standard ration and 1 ml NaCl physiology. The prebiotic groups fed up pellet from *Cannalina* flour and 1 NaCl physiology, probiotic groups fed up pellet standard and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu / ml in 1 ml NaCl and synbiotic group fed up *Cannalina* formed as the pellets and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu/ml in 1 ml NaCl. The number of *S. dawley* in each groups were six mice. Bacteria from mice feces were isolated and analyzed to find the total of microbes and number of LAB. The results from in vivo treatment showed the highest total of microbe was found in control. probiotic, prebiotic and syntiotic have ability stimulated growth and hold of LAB in intestine compared with control in 10 days treatment and 5 days after treatment.. On 5 days after treatment synbiotic group was highest hold log 10,59 cfu/ml of LAB, and probiotic group was the lowest total of mecrobe log 9,21 cfu/ml.

**Keywords:** Cannalina, *in vivo*, pebiotics, probiotics, synbiotic

## Antidiabetic activity of aqueous and acetic extracts of *Drimia maritima* L.

Bouatrous Yamina

Laboratory of Genetics, Biotechnology and Valorization of Bio-resources (GBVB) .Department of Natural Sciences and Life.  
Faculty of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life.Mohamed Khider University, Biskra, Algeria.BP 145 RP, 07000 Biskra - Algeria.

\*Corresponding author e-mail: y.bouatrous@univ-biskra.dz, bouatrousyamina@yahoo.fr

### Abstract

In Algeria, diabetes is a major public health problem. For socio-economic reasons, the local population often uses medicinal plants to treat this chronic disease. The purpose of our work was to take a scientific look at this traditional practice. During this work, we experimentally evaluated the antihyperglycemic activity of a medicinal plant (*Drimia maritima* L.).

The objective of this study is to evaluate in rats the antihyperglycemic activity of aqueous and acetic extracts, bulbs and leaves of (*Drimia maritima*), these were harvested, dried, crushed and extracted. Successive in water, acetone. After the chemical screening, the extracts (200 mg / kg) were administered to normoglycemic albino whistar rats or made diabetic by subcutaneous injection of alloxan at the dose of 60 mg / kg of body weight.

The results showed that the acetone extract of leaves and bulbs contains the greatest number of compounds: tannins, flavonoids, saponins, compared to other extracts, and a significant effect of the organ of this plant on the content of these compounds shows that the bulb richer compared to the leaves of the same plant studied. After 2 hours, the baseline glycaemia significantly increased ( $P < 0.001$ ) from  $1.05 \pm 0.06$  to  $0.65 \pm 0.02$ g / L for acetone bulb extracts and  $1.06 \pm 0.05$  to  $0.89 \pm 0.03$  for the acetone extract of the leaves of the same plant, ie reduction rates of 40% and 17% respectively. This decrease is only 16% for the reference medicine, metformin. These results are confirmed in rats subjected to constant hyperglycemia by treatment with alloxane which show significant decreases ( $P < 0.001$ ) in glycemia after 15 days of treatment with the acetone extract of the two studied organs of the species (*Drimia maritima*). The acetic extracts of the bulbs have effects reminiscent of some insulin secretors. These bulbs of this plant species could be used in hypoglycemic treatments.

**Key words:** *Drimia maritima*, leaves, bulbs, diabetes, blood sugar

### References

- [1]- ADJANOHO E. J. Médecine traditionnelle et pharmaceutique : contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin ; p.129
- [2]- AHO Y. J. Etude de l'activité antidiabétique de *vernonia colorata* (Willd) Drake COMPOSEES chez des rats Wistar Thèse Pharmacie 2002 ; n°53
- [3]-ANDRE J-SHEEN, PIERRE J-LEFEVRE Oral antidiabetic agent Department of diabetes, nutrition and metabolic disorders, Department of medicine CHU Sart Tilman, Liege, Drug, 1998 ; 55, 2 : 225-226
- [4]-BENOIT F., VALENTIN A., PELISSIER Y., DIAFOUKA F., MARION C. *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine American journal of tropical medicine and hygiene DA 1996 vol 54 NO1 pp67-71
- [5]-Afssaps-Has, 2006.Traitement Médicamenteux Du Diabète De Type 2- Recommandation De Bonne Pratique.
- 6- Akbarzadeh A., Norouzian ., Mehrabim. R., Jamshidi Sh., Farhangi A., Allah Verdi A., Mofidiant S.M.A., Lame
- 7-Rad B., 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* .22 (2): 60-64.
- 8-Aloumba A., 2007. Approche anthropo-psychologique des usages thérapeutiques et «medico-magiques » du genre *netum*. In *Mialoundama F. Le koko ou mfumbu (Gnétacées). Une plante alimentaire d'Afrique centrale. L'Harmattan. 187 – 211.*

## Effect of milking season and pasture location on bioactive components of mare's milk produced in Kyrgyzstan

A. T. Mazhitova<sup>1\*</sup>, A. A. Kulmyrzaev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kyrgyz Turkish Manas University, Engineering Faculty, Department of Chemical Engineering, Bishkek 720038, Kyrgyzstan.

<sup>2</sup>Kyrgyz Turkish Manas University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Bishkek 720038, Kyrgyzstan..

\*Corresponding author e-mail: aichurok.mazhitova@manas.edu.kg

### Abstract

In Kyrgyzstan, mare's milk is used for production of the traditional fermented dairy beverage koumiss and fresh mare's milk has also being used to cure lung diseases as a traditional method of therapy. The quantity and contents of bioactive constituents in mare's milk considerably depend on the milking season and the altitude at which the animals are grazed. In this study chemical composition ( $P < 0.01$ ) and fatty acid profile ( $P < 0.05$ ) of mare's milk samples obtained from animals grazing at 1700 m and 2200 m above sea level was measured depending on the milking season. The animals (Novokirgizskaya horse breed) were kept under extensive pasture conditions and received no additional feed supplements. Milk samples were collected monthly using machine milking from May to July (1700 m) and from May to August (2200 m) from 25 mares. Total solids (11.05-11.84%), milk fat (1.23-2.23%) and ash (0.40-0.53%) contents of the milk samples produced at 1700 m above sea level decreased to the end of milking season, while those in the milk produced at 2200 m (10.93-11.11% total solids; 1.29-1.60% milk fat) and as well as protein (2.20-2.29%) and lactose (6.98-6.93%) did not change significantly during the milking season, except for ash content (0.46-0.30%). Fatty acid composition of the milk obtained at 2200 m (vegetation variety consisted of 18 plant families and 38 plant species) was richer in unsaturated fatty acids than that of produced at the pastures at 1700 m above the sea level (vegetation variety consisted of 19 plant families and 31 plant species of which only 3 species were found at both pastures). The results of the study have shown that the chemical composition and fatty acid profile of the mare's milk are significantly influenced by milking season and geographical location of pastures.

**Keywords:** chemical composition, fatty acids, geographical location, mare milk, milking season.

## **Inflammatory mediator and antioxidant role in gastroprotective of *Tinospora crispa* against ethanol Induced gastric ulcer**

Walaa Najm Abood\*

University of Diyala, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Diyala, Iraq.

\*Corresponding author e-mail: walaaabood@gmail.com

### **Abstract**

This research performed to determine the potential protective effects of *Tinospora crispa* stems to the rat gastric mucosal injury of induced by ethanol. As well as clarify the role of gastrin, pepsin, prostaglandinE2 (PGE2), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) and cytokines (Tgfb1 and TNF- $\alpha$ ). Seven groups of rats were orally pre-treated with Tween20 as vehicle control group, Tween20 as ulcer group, 20 mg/kg of omeprazole as reference drug group, 100, 200,500 and 1000 mg/kg of extract as the experimental groups. An hour later, induction ulcer by given 95% ethanol orally except vehicle control group. The results have been showed significant ulcer protective effects by reduction the ulcer area and increase the ulcer inhibition grossly and histology. As well as significant elevate the gastric juice PH and increasing the production of mucus. In addition, significant elevated of inflammatory mediators PGE2, increased the activity of SOD and CAT have shown in gastric mucosa and significant elevated of in Tgfb1. On the other hand, observed reduction the serum level of gastrin and pepsin, and decreasing the level of MDA and TNF- $\alpha$ . In conclusion, our results proof that *T. crispa* pretreatment has protective effects in ethanol-induced gastric ulcers in rats. Moreover, these results provide evidence that these protective effects of *T. crispa* by stimulation of some inflammatory mediators as PGE2, gastrin, Tgfb1 and TNF- $\alpha$ . Moreover, important antioxidant enzymes such as SOD and CAT which are scavengers of ROS and therefore prevent gastric injury induced by them.

**Keywords:** *Tinospora crispa*, Gastroprotective, Prostaglandin E2, Tgfb1, TNF- $\alpha$ , Antioxidants enzyme.



## Characterization of Georgian natural phillipsites

Nanuli Dolaberidze<sup>1\*</sup>, Vladimer Tsitsishvili<sup>1</sup>, Marinela Panayotova<sup>2</sup>, Nato Mirdzveli<sup>1</sup>, Manana Nijaradze<sup>1</sup>,  
Zurab Amiridze<sup>1</sup>, Tekla Kapanadze<sup>1</sup>, Ketevan Virsaladze<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TSU Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry, Tbilisi, Georgia.

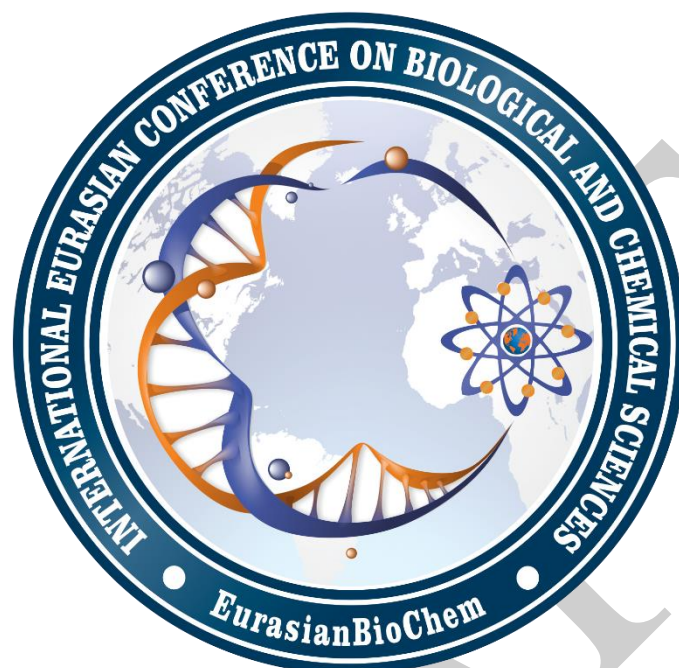
<sup>2</sup>University of Mining and Geology, Sofia, Bulgaria.

\*Corresponding author e-mail: n\_dolaberidze@yahoo.com

### Abstract

Phillipsite-containing Eocene rocks were discovered in Georgia at the northern fringe of the Akhaltsikhe depression, along with other zeolites, and in the Gurian range, near Shukhuti village. Zeolite phase of Akhaltsikhe deposit (PA) is not typical for the sedimentary tuffs from saline alkali lakes due to comparatively high content of calcium and magnesium, its content in rocks differs in a range of 60-70%, major impurities are chlorite and montmorillonite. The Shukhuti phillipsite (PS) is characterized by high content of potassium, zeolite phase content differs from 60% (lower plot) to 80% (upper plot), main impurity is heulandite. Powder X-ray diffraction patterns of PA and PS are in a good agreement with Breck's data for natural phillipsite from Nevada, USA, and with the pattern of synthetic sample (P). Water adsorption capacity of micropores ( $p/p_s=0.40$ , 20°C) is in the range of 5.2 (PS, upper plot) to 7.25 mmol/g (PS, lower plot), comparable with the capacity of the synthetic sample (7.83 mmol/g). The total pore volume in PA takes 0.32 cm<sup>3</sup>/g, pore system is well developed and differentiated: distribution curve  $V(r)$  shows maximums at 1000 (0.21 cm<sup>3</sup>/g) and 200 nm (0.06 cm<sup>3</sup>/g), a broad peak corresponds to the mesopores with radii in the range of 20-60 nm (0.035 cm<sup>3</sup>/g); PS samples are characterized by macropores (100-4000 nm, 0.28 cm<sup>3</sup>/g) and mesopores (4-100 nm, 0.02 cm<sup>3</sup>/g). Total ion exchange capacity (2.6-3.3 for PA, 2.2-3.2 meq/g for PS) is less than measured for P (4.5 meq/g), ion exchange isotherms prove high selectivity of both zeolites towards NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, but the selectivity series are different: K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> >> Ca<sup>+2</sup> > Mg<sup>+2</sup> for PA, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> >> Ca<sup>+2</sup> > Mg<sup>+2</sup> for PS. There are considerable differences between thermal properties of studied phillipsites: crystal structure of PA is destroyed at 400°C, PS samples preserve the metaphillipsite structure to 500-550°C.

**Keywords:** Microporous crystal structure, Mesopores, Metaphillipsite.



## **2. FULL-TEXT PAPERS**

### **2.1. ORAL PRESENTATIONS**

---

## Study and quantification of oriented processes related to the facilitated extraction of norfloxacin antibiotic through a polymer inclusion membrane

Rkia Louafy<sup>1\*</sup>, S. Tarhouchi<sup>1</sup>, H. Mouadili<sup>1</sup>, O. Kamal<sup>1</sup>, K. Touaj<sup>1</sup>, L. Lebrun<sup>2</sup>, M. Hlaibi<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire Génie des Matériaux pour Environnement et Valorisation (GeMEV), Equipe I3MP, Faculté des Sciences Ain Chock, B.P. 5366, Maârif, Casablanca, Morocco

<sup>2</sup> Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS), UMR 6270 du CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France.

PPR2 and ERANETMED3 projects (MESRSFC / CNRST)

Corresponding author e-mail: r.louafy@gmail.com

### Abstract

Antibiotics have been widely used in human and veterinary medicine. They have toxic effects on aquatic ecosystems. In particular, norfloxacin (NRF) widely used as a drug, which is most detected in wastewater effluents. Considering this situation, polymer membranes were adopted to extraction and recovery of this antibiotic as high value-added compound.

Present work, describes results relating to oriented membrane processes for extraction and recovery of this drug. FTIR and SEM techniques have been used to characterize elaborated membranes, which have been adopted to carry out extraction oriented processes of NRF substrate. Results make it possible to determine several parameters: *permeability (P)* and *initial flux (J<sub>0</sub>)*, at different acidities, *association constant (K<sub>ass</sub>)* relating to interactions between substrate and extractive agent, and *apparent diffusion coefficient (D\*)* relating to substrate movement through the membrane. Evolution of these parameters makes it possible to elucidate the diffusion movement of substrate through the membrane and *kinetic* or *energetic* pathway which controls the studied oriented processes.

**Keywords:** polymer inclusion membranes, antibiotics, permeability, flux, apparent coefficient diffusion, kinetic and energetic pathways.

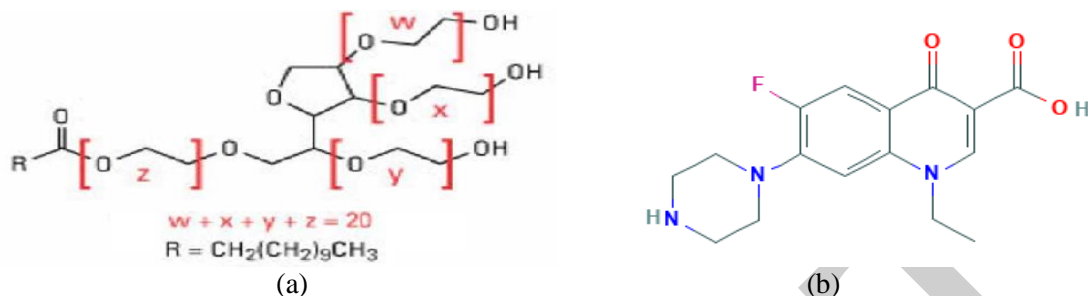
### Introduction

There are several ways to introduce pharmaceuticals compounds into the aquatic environment including different therapeutic categories, which are introduced through municipal wastewater, treatment plants, hospitals, pharmaceutical industries, agricultural activities and breeding farms (Li et al. 2015; Sim et al. 2011). Antibiotics are among the most prescribed therapeutic classes used in human and veterinary medicine; these active substrates have important consequences on harming ecosystems and human health. There was study to identify and characterize the risks of antibiotics to the aquatic environment of the Hai River System (HRS) in China that was conducted by Haiyang Chen et al. (Chen et al. 2018). Thirteen antibiotics have been identified as priority contaminants in HRS. Norfloxacin (NRF) is a type of broad-spectrum fluoroquinolone antibiotic, one of the most widely used drugs, which gives it a high detection frequency in wastewater effluents, thus posing a high risk for aquatic organisms. It was detected in 228 samples with a frequency rate of 80.4% in HRS surface waters.

Considering this approach, it is indispensable to develop effective techniques for the treatment of wastewater to protect human health and aquatic ecosystem. There are several techniques have been developed such as advanced oxidation processes (Kanakaraju et al. 2018; Biancullo et al. 2019), adsorption (Kyzas et al. 2015) and membrane technology as examples: ultrafiltration (UF) (Wu et al. 2016), nanofiltration (NF) (Souza et al. 2018), reverse osmosis (RO) (Liu et al. 2018) and membrane bioreactor (Li et al. 2015) which exhibit a high potential removal of micropollutants from water effluents.

For this study, we propose the application of membrane processes, by developing a polymer inclusion membrane (PIM) based on poly(vinylidene fluoride) (PVDF) polymer support, 2-nitrophenyl octyl ether (2-NPOE) as a plasticizer, and the amphiphilic molecule *polysorbate 20* (Tween 20) (**Fig. 1.a**) as extractive agent (**T**) for the recovery oriented membrane processes of antibiotic norfloxacin (NRF) (**Fig. 1.b**) from an aqueous solution, whose main objective is the treatment of pharmaceutical discharges. FTIR and SEM techniques have been used to characterize the composition, the structure and the morphology of elaborated membrane.

This membrane will be adopted to study oriented processes related to the extraction and recovery of NRF substrate. In order to quantify the performance of the developed membrane and to elucidate the mechanism of the processes carried out, several macroscopic (permeability  $P$  and initial flux  $J_0$ ) and microscopic (association constant  $K_{ass}$  and apparent diffusion coefficient  $D^*$ ) parameters will be determined. The influence of factors: initial concentration  $C_0$  of NRF substrate and medium acidity on the evolution of these various parameters will be examined to elucidate the mechanism of NRF substrate diffusion through the membrane phase, to verify the selectivity of the studied processes and to confirm the performance of the elaborated membrane.



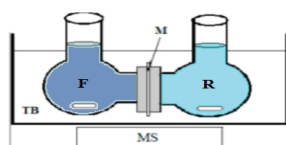
**Figure 1:** Molecular Structures of *polysorbate 20* extractive agent (Tween 20) (a), and norfloxacin substrate (NRF) (b).

### Methods, chemicals, and materials

The membrane was prepared by dissolving 2g of PVDF (MW: 35000 obtained from HIMEDIA) in 12 ml of N, N-dimethyl formamide (DMF) (99, 8%; purchased from Sigma-Aldrich) at 60°C, then an equivalent mass of  $0,5 \cdot 10^{-3}$  mol of polysorbate-20 (Tween® 20;  $d=1$ , 1 g/cm<sup>3</sup>; FW: 1 228 g/mol; purchased from Merck KGaA) was added as an extractive agent. After total dissolution a volume of 100µl of NPOE ( $\geq 99\%$ ;  $d$ : 1, 04 g/mol obtained from Fluka) was added as a plasticizer, then the mixture is stirred for 72h. After dissolution and total insertion of the extractive agent, the polymer obtained solution was spread uniformly onto the surface of a glass plate by a ruler. First, it was in the air temperature for 30 s, and then it was put in the heat inside the oven for 12 min to allow the evaporation of the solvent. Afterward, the plate is immersed to a non-solvent coagulation bath containing distilled water (conductivity  $\leq 2 \mu S \cdot cm^{-1}$ ) at room temperature.  $l = 137 \mu m$  is the measured thickness of the elaborated membrane and  $[T]_0 = 0.171 M$  is the calculated concentration of the inserted (trapped) agent in the membrane phase.

An electronic micrometer (Mitutoyo) was used to measure the thickness of the prepared membranes at 12 points along the cut edge. Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to determine the morphology of prepared membrane. The IR spectrophotometer (AVATAR 360 FTIR ESP) was used to identify the composition of the prepared membrane, and to justify the presence of the extractive agent in the polymer matrix.

The experimental protocol relating to the facilitated extraction processes of the NRF substrate was carried out in a transport cell similar to the one described by El Atmani et al. (Atmani et al. 2018) (**Fig.2**) in which, it consists of two glass compartments separated by the membrane (M) with a contact active area  $S = 10.75 cm^2$ . A feed compartment (F) containing the solution of NRF (FW: 319, 33 was purchased from Alfa Aesar) to be treated at different initial concentrations  $C_0$  (0.04, 0.02, 0.01 and 0.005 M) and a receiving compartment (R) containing distilled water with the same pH in feed solution. The system is immersed in a thermostatic bath (TB) containing water to maintain the same temperature throughout the extraction studied processes. The constant acidity of the medium was measured and verified by a Titrator (Easy Pro, Mettler Toledo) at pH 2.6 and pH 4.2 (acidified with 1M HCl; 37% a commercial product of Sigma-Aldrich), and pH 10.5 (adjusted with 1M NaOH; FW: 40 with 99, 1% was obtained from VWR). Evolution of the extracted NRF substrate concentration according to the time factor was measured and analyzed at the maximum absorption wavelength ( $\lambda_{max} = 277 nm$ ) from the receiving phase, using a UV-Vis spectrophotometer (UV / VIS Excellence, Mettler Toledo).



**Figure 2:** Cell with two compartments adopted for oriented processes through affinity membranes.

## Results and discussion

### 1. Characterization of the prepared membranes

After the preparation of the membrane, studies on their morphology and composition were performed. The SEM images of the surface and section of the polymer support (PVDF) and the developed membrane (PVDF / TW20 / NPOE) show a clear difference in porosity. Indeed, the integration of the extractive agent increases the porosity of the obtained membrane. On the other hand, FTIR spectroscopic studies confirm these results and indicate the presence of the new absorption bands relating to the vibration of O-H and C - O functions characteristic of the used extractive agents.

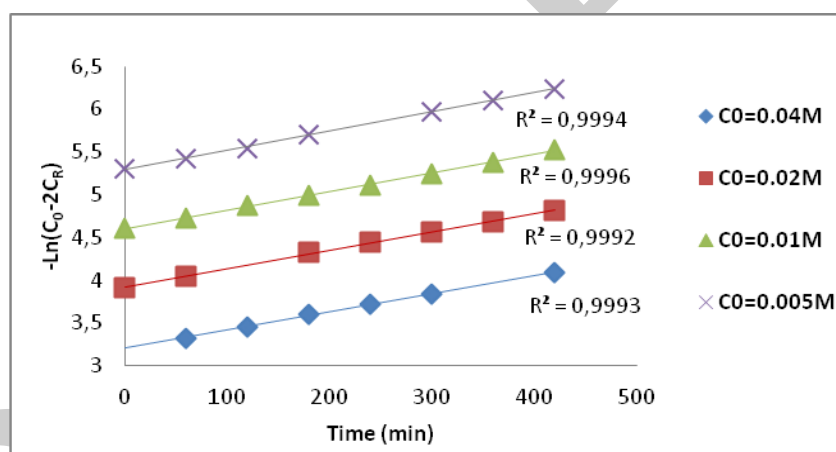
### 2. Influence of NRF initial concentration $C_0$

To evaluate the performance of the membrane, the influence study of NRF initial concentration  $C_0$  (0.04, 0.02, 0.01 and 0.005 M) on the evolution of the macroscopic parameters, permeability  $P$  and initial flux  $J_0$  was carried out at pH = 4.5 and T = 298 K (Table 1). Values of these parameters are calculated according to the expressions in equations 1 and 2, where “ $a$ ” is the slope of the linear representation of  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$  (Fig.3) function, resulting from a developed kinetic model based on the Fick’s first law and the use of very thin membranes (Tbeur et al. 2000; Atmani et al. 2018).

$$P = a \times V \times l / 2S \quad (1)$$

$$J_0 = P \times C_0 / l \quad (2)$$

$l$ : membrane thickness,  $S$ : membrane active area,  $V$ : receiving phase volume,  $C_0$ : substrate initial concentration in the feed phase,  $C_R$ : substrate concentration in the receiving phase at time  $t$ .



**Figure 3:** Evolution of the kinetic term  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$  for the studied processes at different initial concentration of NRF substrate at pH = 4 and T = 298 K.

Figure 3 show the linear evolution of the function  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$ , which indicates that these results of facilitated extraction processes of NRF substrate through the elaborated PIM are well adapted to the elaborated kinetic model, in which the diffusion of the substrate through the membrane phase is a rate-determining step. The slopes of the obtained lines were used to calculate the permeability parameter  $P$  (Eq. 1) for each of NRF initial concentrations, which makes it possible to calculate the corresponding initial fluxes  $J_0$  (Eq. 2). Values of these macroscopic parameters are grouped in Table.1.

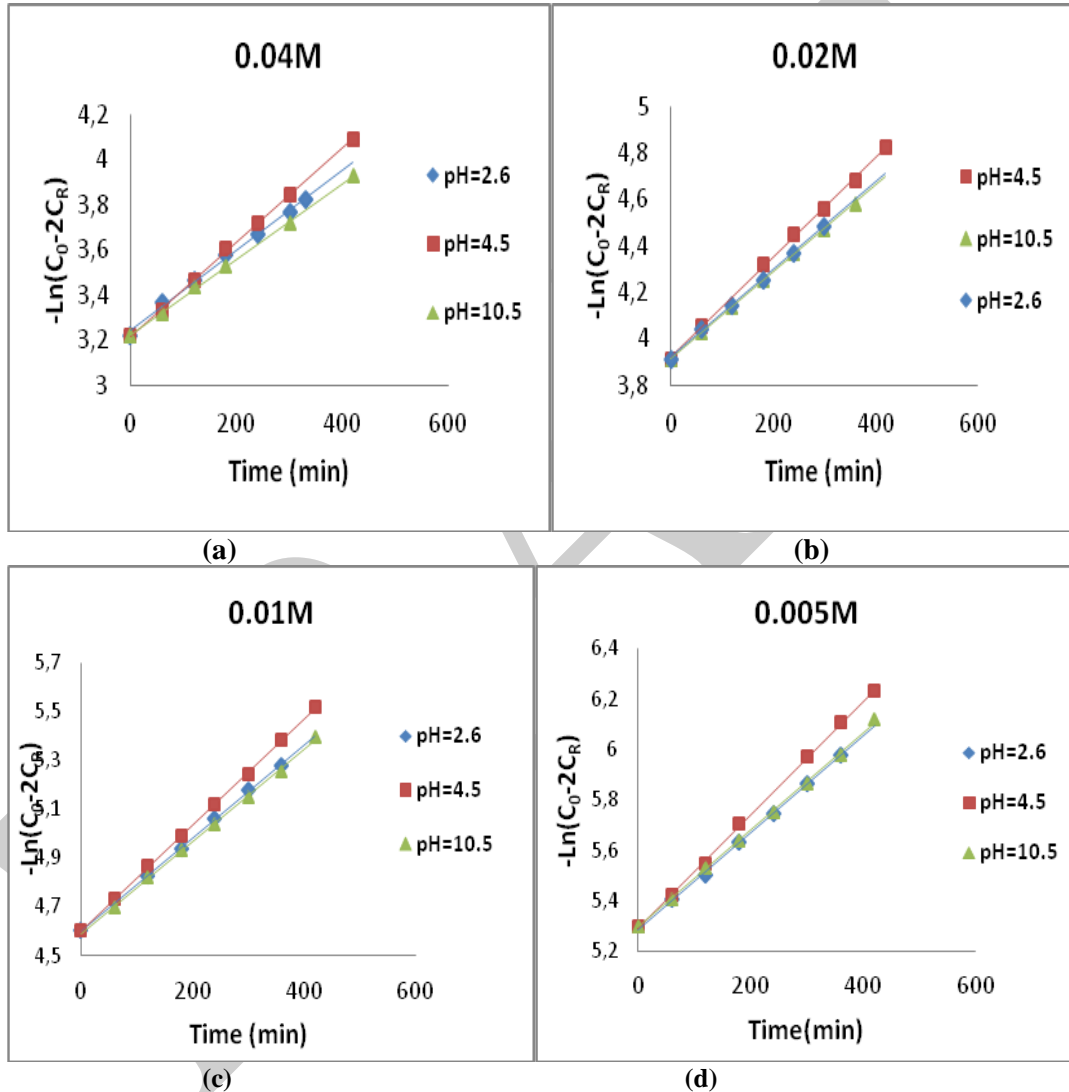
**Table.1:** Evolution of  $P$  and  $J_0$  parameters relating to the membrane performance, with the initial substrate concentration  $C_0$ .

$C_0$ (M)	$P \cdot 10^7$ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$J_0 \cdot 10^5$ ( $\text{mmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ )
0.04	17,812	0,552
0.02	18,209	0,282
0.01	18,431	0,143
0.005	19,153	0,074

From the obtained results (**Table 1**), it is found that the permeability parameter  $P$  increases when the substrate initial concentration  $C_0$  decreases, on the other hand the initial flux  $J_0$  evolves in the same direction of the initial concentration  $C_0$ .

### 3. Influence of the acidity factor

The pH factor of feed and receiving aqueous solutions has a significant effect on the facilitated extraction processes of the NRF substrate through the elaborated PIM. Indeed, the structure of the NRF substrate molecule has carboxylic and amine groups, characterized successively by acidity constants  $pK_{a1} = 5.58$  and  $pK_{a2} = 8.68$ . Depending on the pH of the solution, NRF molecule can exist in cationic, zwitterionic or anionic forms (Souza et al. 2018). To examine the influence of this factor on the evolution of the membrane performance ( $P$  and  $J_0$ ), the experiments were carried out at three values of pH (2.6, 4.5 and 10.5) for different initial concentrations  $C_0$ , and at  $T = 298$  K (**Fig. 4**).



**Figure 4:** Influence of acidity factor on the evolution of the kinetic term  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$ , at different pH (2.6, 4.5, 10.5), and different concentrations  $C_0$  [0.04M (a), 0.02M (b), 0.01M (c), 0.005M (d)], at  $T = 298$  K.

The different graphs in Figure 4 present the linear evolutions with the correlation coefficients ( $R^2$ ) greater than or equal to 0.999 for all the standardized experimental conditions. The slope values of these segments were used to calculate the values of  $P$  and  $J_0$  parameters, and **Table 2** summarizes all obtained results for each studied pH.

**Table.2:** Acidity influence on the evolution of the membrane performance ( $P$  and  $J_0$ ) for the extraction oriented processes across elaborated membrane.

pH	$C_0$ (M)	$P \cdot 10^7$ ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$J_0 \cdot 10^5$ ( $\text{mmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ )
2.6	0.04	14.254	0.442
	0.02	15.962	0.247
	0.01	16.093	0.125
	0.005	16.408	0.064
4.5	0.04	17.837	0.553
	0.02	18.209	0.282
	0.01	18.431	0.143
	0.005	19.153	0.074
10.5	0.04	14.200	0.440
	0.02	15.782	0.245
	0.01	16.097	0.125
	0.005	16.389	0.064

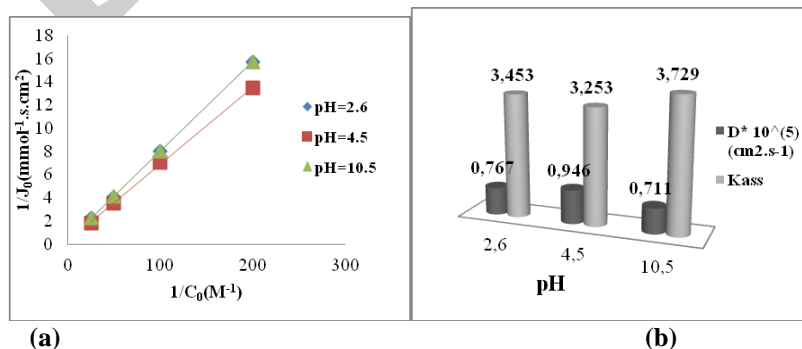
Data in Table 2 clearly indicate that the elaborated membrane is more efficient at the intermediate studied acidity (pH = 4.5), therefore, the zwitterionic form of NRF substrate diffuses more rapidly through the PIM membrane PVDF-Tween20 than its cationic and anionic counterparts. To confirm and explain these results, it is necessary to calculate the microscopic parameters, association constant  $K_{ass}$  relating to the interaction of the substrate with the extractive agent to form unstable entities (ST), and apparent diffusion coefficient  $D^*$  relating to the movement of NRF substrate molecules through the membrane phase. Indeed, a thermodynamic model based on Fick's second law and a saturation law of the extractive agent by the substrate (Mickaelis-Menten type), makes it possible to establish the relation between  $J_0$  parameter and  $C_0$  substrate concentration according to the expression in the equation 3 (Atmani et al. 2018; Tbeur et al. 2000).

$$1/J_0 = (l/D^*) \times [(1/[T]_0) \times (1/K_{ass}) \times (1/C_0) + (1/[T]_0)] \quad (3)$$

$l$ : membrane thickness and  $[T]_0$  = Fixed concentration of Tween 20 Agent in membrane phase.

The values of initial fluxes  $J_0$  allowed to determine  $K_{ass}$  and  $D^*$  specific parameters (Fig. 5.b), from the slopes ( $p$ ) and the intercepts ( $OO$ ) of line segments relating to the Lineweaver-Burk representation ( $1/J_0 = f(1/C_0)$ ) (Fig. 5.a), according to the expressions in following equation:

$$K_{ass} = \text{intercept (O.O)}/\text{slope (p)} \text{ and } D^* = (l/O.O \times [T]_0) \quad (4)$$



**Figure 5:** (a) Lineweaver-Burk presentations of  $1/J_0 = f(1/C_0)$  for facilitated extraction processes of NRF substrate; (b) Evolution of  $K_{ass}$  and  $D^*$  parameters for studied oriented processes.

Analysis of obtained results shows that the thermodynamic model is well verified, indicates an opposite evolution of these specific parameters  $D^*$  and  $K_{ass}$  and confirm that the diffusion of the substrate through the membrane is conditioned by the successive interactions of the substrate with the fixed extractive agent in the membrane phase. Indeed, when  $D^*$  is high,  $K_{ass}$  is weak, which shows that for weak interactions of the substrate with the extractive agent (unstable ST), the membrane is more efficient for the studied processes, it is certainly related to the movement nature of substrate molecules during their diffusion through the membrane phase. On the other hand, the best extraction of the zwitterion form (Roland Barret 2018) at the pH values between the two pka values of the NRF molecule is certainly due to the structure of the zwitterion form molecule, carrying two opposite charges which ensure a weak association of this form with the extractive agent.

All these observations make it possible to envisage for the studied processes, a **mechanism by successive jumps** of NRF substrate molecules from one site to another of the extractive agent immobilized in the membrane phase. However, an examination of the temperature factor influence is necessary in order to confirm this mechanism and to elucidate the **energetic or kinetic** pathway that controls the oriented membrane processes related to the extraction and recovery of the NRF compound.

## Conclusion

In this work, we have developed and characterized a PIM affinity polymer membrane type by the heat vulcanization method, with the amphiphilic molecule Tween 20 as an extractive agent. The developed membrane has been adopted to perform the oriented processes relating to the extraction of norfloxacin compound. The influence studies of the initial concentration and the medium pH factors have conducted and the evolution of  $P$ ,  $J_0$ ,  $D^*$  and  $K_{ass}$  parameters relating to the facilitated extraction processes of norfloxacin compound has been analyzed. Thus the performance of the adopted membrane has been quantified and the mechanism of the studied processes has been proposed.

Finally, we have shown that the agent Tween 20 is an effective extractive agent for oriented membrane processes relating to the extraction and recovery of different forms of norfloxacin compound and more particularly the zwitterion form.

## References

- Atmani, E.H. El et al., 2018. The oriented processes for extraction and recovery of paracetamol compound across different affinity polymer membranes . Parameters and mechanisms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 126, pp.201–210. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.001>.
- Biancullio, F. et al., 2019. Heterogeneous photocatalysis using UVA-LEDs for the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria from urban wastewater treatment plant effluents. *Chemical Engineering Journal*, 367(November 2018), pp.304–313. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.012>.
- Chen, H. et al., 2018. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: Occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. *Science of the Total Environment*, 618, pp.409–418. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.054>.
- Kanakaraju, D., Glass, B.D. & Oelgemöller, M., 2018. Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, pp.189–207.
- Kyzas, G.Z. et al., 2015. New approaches on the removal of pharmaceuticals from wastewaters with adsorbent materials. *Journal of Molecular Liquids*, 209, pp.87–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2015.05.025>.
- Li, C., Cabassud, C. & Guigui, C., 2015. Evaluation of membrane bioreactor on removal of pharmaceutical micropollutants: a review. *Desalination and Water Treatment*, 55(4), pp.845–858.
- Liu, Y. ling et al., 2018. Adsorption of pharmaceuticals onto isolated polyamide active layer of NF/RO membranes. *Chemosphere*, 200, pp.36–47. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.088>.
- Roland Barret, 2018. *Principes fondamentaux de chimie thérapeutique: Médicaments, propriétés physico-chimiques, prodrogues, pharmacophore*,
- Sim, W.J. et al., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 82(2), pp.179–186. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.026>.
- Souza, D.I. De et al., 2018. Nanofiltration for the removal of norfloxacin from pharmaceutical effluent. *Journal*



of *Environmental Chemical Engineering*, 6(September), pp.6147–6153.

Tbeur, N., Rhlalou, T. & Hlai, M., 2000. Molecular recognition of carbohydrates by a resorcinarene . Selective transport of alditols through a supported liquid membrane. *Carbohydrate Research*, 329, pp.409–422.

Wu, H. et al., 2016. Retentions of bisphenol A and norfloxacin by three different ultrafiltration membranes in regard to drinking water treatment. *Chemical Engineering Journal*, 294, pp.410–416. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.02.117>.

DRAFT

## Oriented membrane processes for the facilitated extraction and recovery of L-tartaric acid through affinity polymer membranes

Sanae. Tarhouchi<sup>1\*</sup>, R. Louafy<sup>1</sup>, H. Mouadili<sup>1</sup>, T. Eljaddi<sup>1</sup>, K. Touaj<sup>1</sup>, L. Lebrun<sup>2</sup>, M. Hlaïbi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Génie des Matériaux pour Environnement et Valorisation (GeMEV), Equipe I3MP, Faculté des Sciences Aïn Chock, B.P. 5366, Maârif, Casablanca, Morocco.

<sup>2</sup> Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS), UMR 6270 du CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France.

PPR2 and ERANETMED3-166 Projects (MESRSFC/CNRST)

Corresponding author: E-mail: sanae.tarhouchi@gmail.com

### Abstract

L-Tartaric acid is a compound involved in many biological and biochemical processes as an antioxidant and a pH regulator. The recovery of tartaric acid as an interesting product from winery liquid discharges and wastewaters is an important operation.

To conduct experiments for recovery processes of L-tartaric acid, affinity polymer membranes based on PVDF and PVA polymeric supports, respectively containing *methyl cholate* and *cholic acid*, were adopted after characterization.

Two models have been adopted to determine values of parameters: permeability, initial flux for the membrane performance, and association constant, apparent diffusion coefficient relating to interactions between substrate and extractive agent, necessary for the diffusion of L-tartaric acid through the membrane. Influence of temperature was examined and activation parameters were determined. All results make it possible to identify membrane type that allows the selective extraction of L-tartaric acid, to elucidate processes mechanisms and to specify an *energetic* or *kinetic* pathway that controls processes.

**Keywords:** Oriented membrane processes, L-Tartaric acid, methyl cholate, permeability, flux, apparent diffusion coefficient.

### INTRODUCTION

Wine production industries generate a large amount of waste containing diverse by-product. The treatment of this liquid waste enables the extraction and recovery of strategic value-added products for several applications in the biotechnology industry. One of the most valuable compounds present in these waste waters is L-tartaric acid, which is involved in many biological and biochemical processes as an antioxidant and pH regulator, etc. .... In addition, it is widely used as a food additive and is found naturally in many plants and fruits, especially grapes, it is one of the main acids present in wine (Kontogiannopoulos, Patsios and Karabelas, 2016; Lourenço *et al.*, 2018). The extraction and recovery of tartaric acid as a valuable product from winery wastes and waste waters are processes of great environmental and industrial interest.

Currently, special attention is being paid to the development of efficient extraction, recovery and purification methods in modern industries. In particular, the development of processes through polymer membranes has been considered as a gentle and promising method for obtaining sensitive biological compounds (Baudot, Floury and Smorenburg, 2001; Andrade-Eiroa *et al.*, 2016; Tabani *et al.*, 2018).

The present studies describe the extraction of L-tartaric acid from aqueous solution by membrane processes. Oriented membranes processes were carried out across two affinity polymer membranes, Supported Liquid Membrane (SLM) and Polymer Inclusion Membrane (PIM), with respectively methyl cholate and cholic acid as extractive agents, whose compositions and structures have been characterized by FTIR and SEM techniques. For these studies devoted to the quantification of performances and the identification of mechanisms, we examined the influence of following factors, initial substrate concentration ( $C_0$ ) and temperature ( $T$ ) on the evolution of several parameters related to the facilitated extraction oriented processes across the elaborated membranes. Subsequently all obtained results made it possible to quantify the performances of the elaborated membranes and to elucidate the mechanisms of the processes carried out, as well as kinetic or energetic pathways that control these oriented membrane processes.

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. REAGENTS AND MATERIAL.

- The L-tartaric acid, chemical reagents and solvents used were pure analytical grade commercial products (Aldrich, Fluka, Redel-Dehaene). The used PVA and PVDF polymers supplied by (Merck-Schuchardt and Himedia).

- A refractometer (RM40 Refractometer, Mettler Toledo) was used to perform refractometric assays to determine substrate concentration in feed and receiving phases.

## 2. MEMBRANE PREPARATION.

SLM adopted in our studies was prepared and conditioned as described in previous studies (Benjjar *et al.*, 2012). PIM membrane is prepared according to heat vulcanization method: 10g of Polyvinylalcohol (PVA) is dissolved in a mixture of 20 ml of Dimethyl sulfoxide (DMSO) and 80 ml of distilled water (ED) at 120°C under 24 hours of intense agitation. A precise amount of extractive agent cholic acid (CA) is added to this solution in order to obtain a homogeneous solution after vigorous stirring for 6 h at 60°C. Then, the obtained solution was poured into a kneaded box, which was placed in an oven at a temperature of 60-80°C until the complete evaporation of the solvent. After these steps, a solid flat sheet membrane was obtained with  $[T_0] = 0.483 \text{ mol.L}^{-1}$  as extractive agent concentration, and  $l = 184 \text{ }\mu\text{m}$  as membrane thickness was calculated for this PVA-CA elaborated PIM membrane.

SEM and FTIR techniques were used to characterize the developed membranes. The SEM images indicate that the insertion operation of cholic acid agent (CA) in the PVA polymer support increases its porosity. Similarly, IR spectrum of the elaborated membrane confirms after this inclusion operation, the presence of the extractive agent in the membrane phase (Atmani *et al.*, 2018).

## 3. EXTRACTION CELL

The extraction cell used in this work consists of two compartments with identical volumes separated by the elaborated membrane and which are vigorously associated. (Mouadili *et al.*, 2018). The active area of the membrane in contact with the solutions is  $10 \text{ cm}^2$ . The feed phase is an aqueous solution containing L-tartaric acid at well-defined concentration, but the receiving phase is an aqueous solution with the same pH as the feed phase. The system is immersed in a thermostatic bath to keep the environment temperature constant for the manipulations carried out. The two aqueous phases were subjected to continuous agitation with two magnetic stirrers.

## 4. MODELING AND THEORETICAL CALCULATIONS

The facilitated extraction membrane process of substrate **S** depends on the formation and dissociation of unstable entity (**ST**) "substrate-extractive agent" at the membrane-solution interfaces and across the membrane phase. In order to determine kinetic and thermodynamic parameters for the studied extraction processes, calculation models were developed by our team members (Touaj *et al.*, 2014; Eljaddi *et al.*, 2015). A kinetic model based on Fick's first law and a thermodynamic model based on the mass action law, the Fick's second law and a saturation law of extractive agent (T) by substrate (S), allow establishing the relationships described by following equations.

$$P \times (t-t_1) = (l \times V/S) [1/2 \times \text{Ln} (C_0/(C_0 - 2C_R))] \quad (1)$$

$$1/J_0 = (l/D^*) \times [(1/[T]_0) \times (1/K_{ass}) \times (1/C_0) + (1/[T]_0)] \quad (2)$$

With,  $l$ : is the membrane thickness,  $S$ : the membrane active area,  $V$ : is the receiving phase volume,  $C_0$ : is the substrate initial concentration,  $C_R$ : is the receiving phase substrate concentration,  $[T_0]$ : is the extractive agent concentration,  $P$ : is the membrane permeability,  $J_0$ : is the initial flux,  $D^*$ : is the apparent diffusion coefficient and  $K_{ass}$ : is the association constant.

### a) Calculation of macroscopic parameters: $P$ and $J_0$ :

The slope ( $a$ ) of the linear presentation of the kinetic function  $-\text{Ln}(C_0 - 2C_R) = f(t)$ , allows to determine the permeability values according to the following equation:

$$P = a \times V \times l / 2S \quad (3)$$

The initial flux  $J_0$  can be calculated from the permeability by the following equation:

$$J_0 = P \times C_0 / l. \quad (4)$$

### b) Calculation of microscopic parameters $D^*$ and $K_{ass}$ :

The apparent diffusion of the substrate **S** is carried out via the unstable entity **ST** resulting from the interaction of the substrate **S** with the extractive agent **T**. This diffusion movement and the formation of this entity **ST** are characterized by the specific microscopic parameters  $D^*$  and  $K_{ass}$ , whose the values are calculated from slope and intercept of the Lineweaver-Burk linear representation  $1/J_0 = f(1/C_0)$  (Eq.2) according to the expressions describe by equation 5.

$$K_{ass} = \text{intercept } (OO)/\text{slope } (p) \text{ and } D^* = (l/OO) * (1/[T]_0) \quad (5).$$

### c) Determination of activation parameters $E_a$ , $\Delta H^\#$ and $\Delta S^\#$ :

The initial flux is related to temperature factor by Arrhenius law, according to the following equation:

$$J_0(T) = A_j \exp(-E_a/RT) \quad (6)$$

$R$  is the gas constant ( $8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $A_j$  is the pre-exponential constant, and  $E_a$  is the transition state activation energy of association / dissociation reactions between the substrate  $S$  and the extractive agent  $T$  during the apparent diffusion of the substrate through the membrane phase.

After linearization we get the following equation:

$$\ln(J_0) = (-E_a/R) \cdot (1/T) + \ln A_j \quad (7)$$

Thus the values of activation energy  $E_a$  and pre-exponential constant  $A_j$  are determined directly from the slope and the intercept of the linear function  $\ln(J_0) = f(1/T)$ . According to the activated complex theory (Eyring theory), we can calculate the activation parameters, enthalpy  $\Delta H^\ddagger$ , and entropy  $\Delta S^\ddagger$ , according to the expressions in the following equation:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - 2500 \text{ (J}\cdot\text{mol}^{-1}) \text{ and } \Delta S^\ddagger = R (\ln A_j - 30,46) \text{ (J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}) \text{ at } 298 \text{ }^\circ\text{K} \quad (8)$$

#### d) Determination of thermodynamic enthalpy $\Delta H_{th}$

The thermodynamic enthalpy parameter  $\Delta H_{th}$  represents the energy amount exchanged during the equilibrium reaction association /dissociation of the ST entity, whose value is determined directly from the slope of the linear representation of Van't Hoff's law described by equation 9.

$$\ln(K_{ass}) = (-\Delta H_{th}/RT) + cste \quad (9)$$

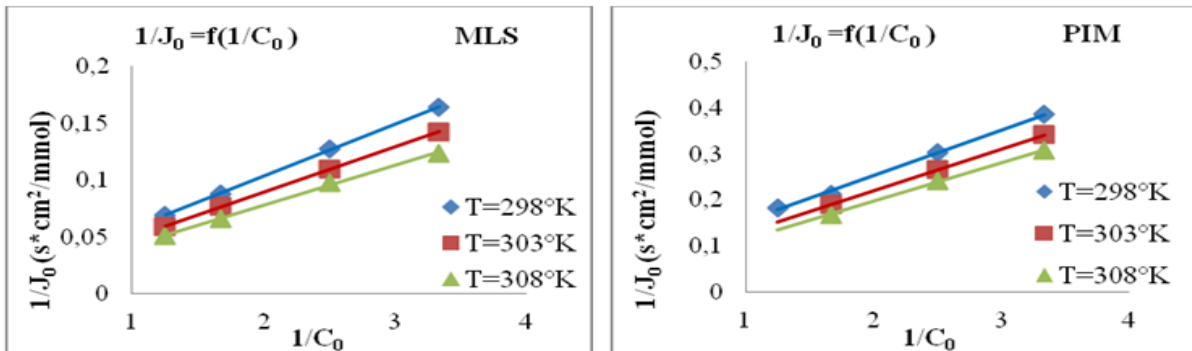
This thermodynamic parameter is related to the activation enthalpies, association  $\Delta H_{ass}^\ddagger$  and dissociation  $\Delta H_{diss}^\ddagger$  according to the following relation:

$$\Delta H_{th} = \Delta H_{ass}^\ddagger - \Delta H_{diss}^\ddagger \quad (10)$$

## RESULTS AND DISCUSSION

### a) Influence of L-tartaric acid concentration on the studied processes parameters.

The studies of the facilitated extraction processes through the adopted membranes SLM and PIM were conducted for different concentrations of L-tartaric acid (**0.8M**, **0.6M**, **0.4M**, and **0.3M**); to examine the influence of substrate initial concentration  $C_0$  on the evolution of  $P$ ,  $J_0$ ,  $D^*$  and  $K_{ass}$  parameters. Several experiences related to the studied processes were performed at  $\text{pH} = 4$  and  $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$ , values of  $C_R$  concentration in the receiving phase were determined versus time. The kinetic function  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$  (Eq.1) has been plotted for the different considered concentrations and the linear evolution presented by the graphs in **Figure 1** indicates that the kinetic model is well verified with the same mechanism for both membrane types.



**Figure 1:** Evolution of the kinetic function  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$  for the extraction studied processes of L-tartaric acid by SLM and PIM adopted membranes at  $\text{pH} = 4$  and  $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$ .

From the slopes of these lines, we have determined the values of  $P$  and  $J_0$  parameters for the facilitated extraction studied process of L-tartaric acid substrate according to the expressions in equations 3 and 4. All obtained values for the evolution of  $P$  and  $J_0$  parameters related to the performances of elaborated membranes are represented by Table 1.

**Table1:** Evolution of  $P$  and  $J_0$  parameters with the initial concentration  $C_0$  of the substrate for the extraction oriented processes through the elaborated membranes.

Membrane types	SLM		PIM	
Initial concentration $C_0$ mol.L <sup>-1</sup>	$P \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	$J_0 \cdot 10^5$ mmol.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	$P \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> . s <sup>-1</sup>	$J_0 \cdot 10^5$ mmol.cm <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>
0,8	18,096	14,476	12,568	5,476
0,6	18,942	11,365	14,390	4,703
0,4	19,690	7,876	15,197	3,311
0,3	20,318	6,095	15,828	2,586

Analysis of the results indicates firstly, that the used membranes are effective for the studied oriented processes, and the SLM membrane is more efficient for the facilitated extraction of L-tartaric acid. Secondly, the results show that  $P$  and  $J_0$  parameters vary inversely, and when the concentration  $C_0$  decreases in the feed phase, permeability parameter  $P$  increases, and flux parameter  $J_0$  through the membrane decreases.

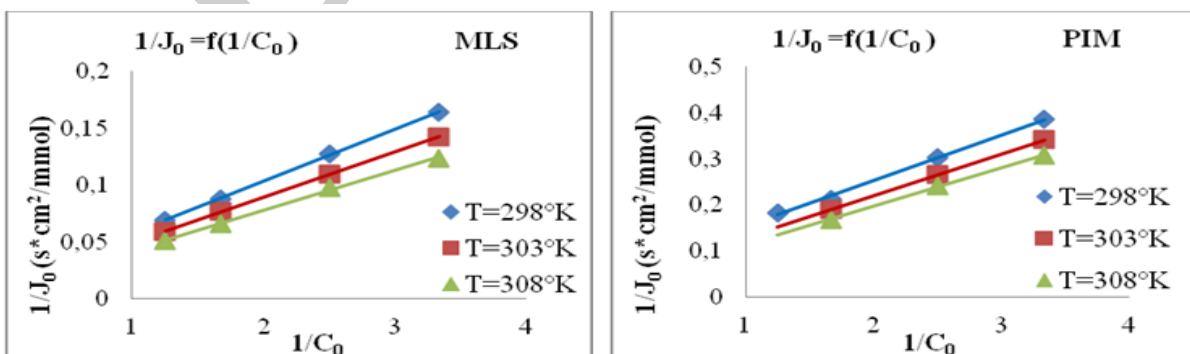
**b) Effect of the temperature factor on the evolution of the processes parameters.**

To study the influence of temperature factor on the evolution of different parameters relating to the extraction studied processes of L-tartaric acid substrate through the adopted polymer membranes, several experiments were conducted at three temperatures 298, 303 and 308 K. The proposed kinetic model applied to the studied processes, indicates a linear evolution of the function  $-\ln(C_0 - 2C_R) = f(t)$ , to determine the values of  $P$  and  $J_0$  parameters at the three studied temperatures.

These results indicate a clear evolution of  $P$  and  $J_0$  macroscopic parameters according to temperature factor and show that the increase of this important factor causes an increase in membrane performance. For each studied temperature, we plotted the Lineweaver-Burk presentation,  $1/J_0 = f(1/C_0)$  (Eq.2) in order to explain the observed membrane performances, to examine the influence of temperature factor on the evolution of  $D^*$  and  $K_{ass}$  microscopic parameters, and to elucidate the mechanisms for the studied oriented processes through the two elaborated membrane types.

**Table 2:** Influence of the temperature factor on the evolution of  $P$  and  $J_0$  parameters relative to the facilitated extraction processes of L-tartaric acid through SLM and PIM membranes.

Types de membranes	SLM		PIM	
T	$P \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	$J_0 \cdot 10^5$ mmol /s.cm <sup>2</sup>	$P \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	$J_0 \cdot 10^5$ mmol /s.cm <sup>2</sup>
298 K	19,261	9,953	14,496	4,019
303 K	22,288	11,541	16,382	4,538
308 K	25,635	13,306	18,357	5,100



**Figure 2:** Lineweaver-Burk representations ( $1/J_0 = f(1/C_0)$ ) for the extraction oriented processes of L-tartaric acid through SLM and PIM membranes.

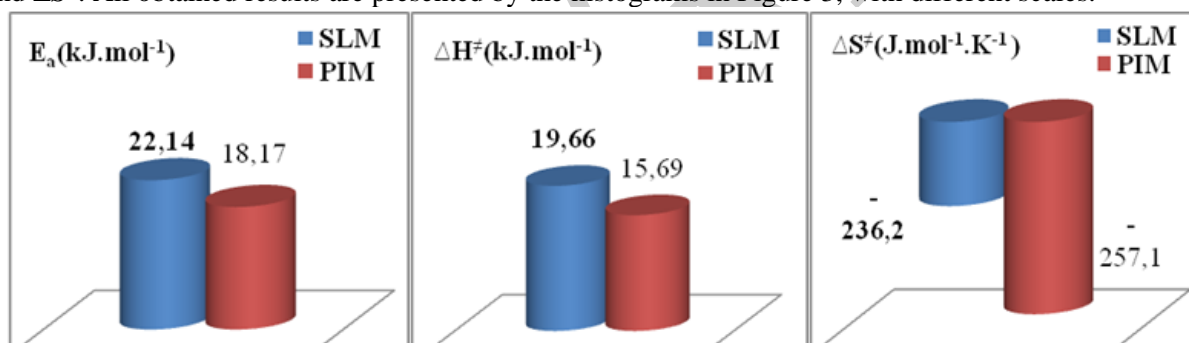
Slopes and intercepts of obtained straight lines (Fig. 2) allow to calculate the values of  $D^*$  and  $K_{ass}$  specific parameters according the expressions in equation 8, who are grouped in the table 3. The analysis of the results shows an inverse evolution of these specific parameters, with a decrease in  $K_{ass}$  and an increase of  $D^*$  when the temperature increases. On the other hand, these results confirm the increase in membrane performances with temperature factor and indicate probable mechanisms by *successive jumps* of tartaric substrate molecules on the sites of each extractive agent.

**Table 3:** Effect of the temperature factor on the evolution of specific parameters  $D^*$  and  $K_{ass}$  relating to the diffusion movement of tartaric acid molecules through organic membrane phases.

Types de membranes	SLM		PIM	
T (K)	$D^* \cdot 10^5$ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{ass}$	$D^* \cdot 10^7$ $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$K_{ass}$
298	83,238	0,263	72,078	0,529
303	104,532	0,240	101,696	0,409
308	129,856	0,220	132,105	0,344

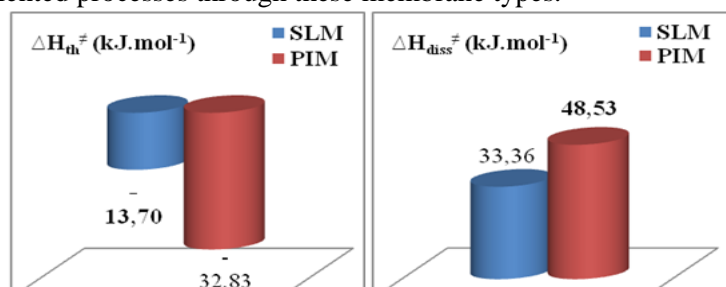
**c) Determination of activation and thermodynamic parameters.**

To elucidate the mechanisms of studied oriented processes and explain the performances of the elaborated membranes, it is necessary to determine and analyze the values of activation and thermodynamic parameters, relating to the transition state of the substrate diffusion step across each organic membrane phase. This kinetically determining step of the studied processes corresponds to the equilibrium reaction (association / dissociation) between the substrate and the extractive agent during the diffusion of the substrate through the membrane phase. Values of initial flux ( $J_0$ ) were used to plotted the function  $\text{Ln}J_0 = f(1/T)$  (Eq.7), the slopes and intercepts of obtained straight segments were used to determine directly the values of  $E_a$ ,  $A_j$  activation parameters and the expesions in equation 8 make possible to determine the values of actvation parameters  $\Delta H^\ddagger$  and  $\Delta S^\ddagger$ . All obtained results are presented by the histograms in Figure 3, with different scales.



**Figure 3:** Activation parameters of the substrate diffusion step for the studied extraction processes of L-tartaric acid through SLM and PIM elaborated membranes.

For the thermodynamic parameter  $\Delta H_{th}$ , the Van't Hoff law (Eq.9) has been verified, and the slopes of obtained line segments make it possible to directly calculate the values of this parameter. Obtained values for  $\Delta H_{th}$  parameter were used to calculate, according to the expression of Equation 10, the values of the relevant parameter activation enthalpy  $\Delta H_{dis}$ , characteristic of the dissociation reaction of ST entity, allowing the substrate **S** to jump from one site to another of the extractive agent **T** during its apparent diffusion through the membrane phase. The evolution of these parameters for the studied processes through the elaborated membranes, presented by the histograms in figure 4, makes it possible to identify the *energetic or kinetic way* which controls these oriented processes through these membrane types.



**Figure 4:** Evolution of  $\Delta H_{th}$ , and  $\Delta H_{dis}$  parameters relating to the mechanisms for the extraction oriented processes of L-tartaric acid through the elaborated membrane types.

From all obtained results for the extraction studied processes of L-tartaric acid through two elaborate membranes, we can make the following interpretations:

- The SLM membrane is more efficient than its PIM counterpart. This result is normal because the diffusion process of L-tartaric acid molecules through the SLM is done according to a mechanism of *successive jumps on mobile sites* of the MC agent, whereas this process is carried out through the membrane phase of the PIM according to a mechanism of *successive jumps on fixed sites* of the CA agent.
- The values of  $\Delta H_{th}$ , and  $\Delta H_{dis}$  parameters show, for the studied oriented processes, a kinetically controlled diffusion movement through the SLM membrane, whereas this diffusion movement is controlled energetically through the PIM membrane, which perfectly confirms the obtained performances and the identified mechanisms.

## CONCLUSION

The various studies carried out made it possible to quantify the performance of each developed membrane by determining the values of different macroscopic and microscopic parameters for the oriented membrane processes relating to the extraction of L-tartaric acid through the adopted SLM and PIM membranes. On the other hand, Studies of the temperature factor influence proved to be very important and made it possible to identify the mechanisms of diffusion movements through the membrane phases as well as the energetic and kinetic pathways that control these mechanisms have been elucidated and perfectly explain the obtained results and the performances observed for the two types of developed membranes.

Finally, the results indicate that the mechanism by jumps of L-tartaric acid molecules, on mobile sites of the extractive agent, is more efficient for the extraction and recovery of this compound by membrane processes.

## REFERENCES

- Andrade-Eiroa, A. *et al.* (2016) 'Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part II', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 80, pp. 655–667. doi: 10.1016/j.trac.2015.08.014.
- Atmani, E. H. El *et al.* (2018) 'The oriented processes for extraction and recovery of paracetamol compound across different affinity polymer membranes . Parameters and mechanisms', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 126, pp. 201–210. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.06.001.
- Baudot, A., Floury, J. and Smorenburg, H. E. (2001) 'Liquid-liquid extraction of aroma compounds with hollow fiber contactor', *AIChE Journal*, 47(8), pp. 1780–1793. doi: 10.1002/aic.690470810.
- Benjjar, A. *et al.* (2012) 'A new supported liquid membrane (SLM) with methyl cholate for facilitated transport of dichromate ions from mineral acids: Parameters and mechanism relating to the transport', *Journal of Materials and Environmental Science*, 3(5), pp. 826–839.
- Eljaddi, T. *et al.* (2015) 'New Supported Liquid Membrane for Studying Facilitated Transport of U ( VI ) Ions Using Tributyl Phosphate ( TBP ) and Tri-n-Octylamine ( TOA ) as Carriers from Acid Medium', *BAOJ Chemistry*, 1(1), p. 003. doi: 10.24947/baojc/1/1/103.
- Kontogiannopoulos, K. N., Patsios, S. I. and Karabelas, A. J. (2016) 'Tartaric acid recovery from winery lees using cation exchange resin: Optimization by Response Surface Methodology', *Separation and Purification Technology*. Elsevier B.V., 165, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.seppur.2016.03.040.
- Lourenço, A. S. *et al.* (2018) 'Voltammetric determination of tartaric acid in wines by electrocatalytic oxidation on a cobalt(II)-phthalocyanine-modified electrode associated with multiway calibration', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V., 1008(Ii), pp. 29–37. doi: 10.1016/j.aca.2018.01.005.
- Mouadili, H. *et al.* (2018) 'New grafted polymer membrane for extraction , separation and recovery processes of sucrose , glucose and fructose from the sugar industry discharges', *Separation and Purification Technology*. Elsevier, 200(January), pp. 230–241. doi: 10.1016/j.seppur.2017.12.012.
- Tabani, H. *et al.* (2018) 'Recent developments in green membrane-based extraction techniques for pharmaceutical and biomedical analysis', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 160, pp. 244–267. doi: 10.1016/j.jpba.2018.08.002.
- Touaj, K. *et al.* (2014) 'Membrane processes for the facilitated extraction of disaccharide sugars: Parameters and mechanism', *Microporous and Mesoporous Materials*. Elsevier Inc., 198, pp. 122–128. doi: 10.1016/j.micromeso.2014.07.025.

## Evaluation of efficacy and safety of platelet rich plasma (Prp) and microneedling (Radiofrequency) in the treatment of atrophic acne scars

Burooj Mohammed Razooqi Al-aajem<sup>1\*</sup>, Khudhair Khalaf Alkayally<sup>2</sup>, Aya Khudhair Khalaf Alkayally<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MSc, Diyala College of Medicine, Iraq

<sup>2</sup>M.B.Ch.B. , F.I.C.M.S , Diyala College of Medicine, Iraq

<sup>3</sup>MSc, Diyala College of Medicine, Iraq

\*Corresponding author e-mail: m.rburooj@yahoo.com

### Abstract

Acne vulgaris is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous follicles, characterized by different skin lesions, which may heal with squally of different types of scars (ice pitted, boxcar, rolling and keloid). Many therapeutic options are used in the treatment of acne scars including: dermabrasion, surgical excision, laser and chemical peeling.

To evaluate the efficacy and safety of platelet rich plasma (PRP) and radiofrequency microneedling (RF) in the treatment of atrophic acne scars.

An interventional study in which (31) patients with different types of atrophic acne scars (ice pitted, boxcar and rolling) were included. They were (27) females and (4) males, with a mean age of (26.41±8) years. The study was conducted in a private clinic in Kalar City, Al-Sulaymaniyah Province for the period from Jan. 2017 to Dec. 2018. All patients were fully assessed and treated by RF microneedling and then PRP was injected in the scars, after topical EMLA anesthesia for 30-45 minutes. Different number of sessions of therapy were used and patients were followed for 3 months after the last session.

Thirtyone patients were involved in the study, (11) had ice pitted scars and (20) patients had open mouth (boxcar and rolling) scars. Ten patients (32.25%) shows an excellent response to PRP and RF therapy, with (2) grades improvement, (15) patients (48.38%) shows good response with one grade improvement and (6) patients (19.6%) shows poor response to therapy, without improvement in grades, (all of them of ice pitted scars). There was a direct relation ship between the number of sessions and the response to therapy. Three patients developed folliculitis at sites of puncturing with isolation of staphylococcus aureus bacteria, which cleared by topical and systemic anti-staph. antibiotics.

It was concluded that PRP and RF represented a safe, efficient and satisfactory option for the treatment of atrophic acne scars, and ice pitted scars shows a poor response to therapy.

**Keywords:** Acne scars, PRP, RF, grading of scars, atrophic, keloid.

### INTRODUCTION

Acne vulgaris is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous follicles, characterized by different skin lesions, like papules, pustules, nodules and cysts, which may heal with scars formation<sup>(1)</sup>. Early and sufficient treatment is very important to reduce the complications specially scarring<sup>(2,3)</sup>.

Even with the excellent treatment options available, scarring may occur, although smaller lesions may produce scarring, but it is more prominent in cystic acne<sup>(4)</sup>, which include: atrophic [ice pitted (V shape), open mouth depressed {boxcar(U), rolling(W)}] and hypertrophic include: hypertrophic and the keloid, the atrophic scars are the common types of scarring<sup>(5)</sup>. Atrophic acne scars are graded by Goodman and Baron as a scale of four grades<sup>(6)</sup>:

1. Grade-1: Macular erythematous hypo. or hyperpigmented scars.
2. Grade-2: Mild atrophy not obvious at social distance of >50cm or easily covered by facial make up or beard hair.
3. Grade-3: Moderate atrophy obvious at social distance of >50cm, not easily covered by make up or beard hair.
4. Grade-4: Sever atrophy not flattened by manual stretching of skin.

Many options are available for the treatment of acne scars, which include: chemical peeling, dermabrasion, surgical excision, punch graft, imiquimod, ultrapulsed laser resurfacing and the use of filler, all of these procedures are variably effective in improving the appearance of scars<sup>(7,8,9)</sup>.

Recently platelet rich plasma (PRP) and microneedling are used in the treatment of many dermatological disorders including acne scarring<sup>(10-14)</sup>.



The aim of the present study was to evaluate the efficacy and safety of PRP and radiofrequency (RF) microneedling in the treatment of atrophic acne scars.

## PATIENTS AND METHODS

An interventional (clinical trial) study in which a thirtyone patients with atrophic acne scars on their faces were included. The study was conducted in a private clinic in Kalar City, Al-Sulaymmania Provence, for the period from Jan. 2017 to Dec. 2018. They were (27) females and (4) males, their ages ranged from (18-40) years with a mean age of (26.41±8) years.

All patients with Goodman and Baron grade:2,3and 4 were included in the study. The exclusion criteria were the presence of active acne lesions, any active infectious diseases, like herpes simplex, HIV, bacterial infections, wart, HVC-AB , HVB-Ag, actinic keratosis, skin cancers, systemic retinoid intake in the previous 6month, sever systemic illness, Hb<10g/dl or platelet <105mic/L, diabetes mellitus, keloidal tendency, bleeding disorders, anticoagulant therapy, oral steroid therapy, pregnancy and lactation. The patients were graded according to the Goodman and Baron scale. They were explained about radiofrequency microneedling (RF) and platelet rich plasma (PRP) therapy, possible side effects and prognosis of treatment. They were treated by RF microneedling and then PRP preparation was injected, after taking an informed concept for permission of therapy and application of topical EMLA anesthesia for 30-45min. PRP was prepared by taking 10ml of autologous whole blood from the patients and collected into tubes containing acid citrate dextrose(ACD), and centrifuged at 3700rpm for 10min , to obtain the supernatant at the top, which contained PRP , calcium gluconate was added as an activator (1:9), i.e. 1ml gluconate and 9mlPRP. The preparation was injected in the scars after they treated by radiofrequency laser with a hand peace of number-49(contain 49needls). Each patient received different number of sessions ranged from 3-7, with a period of 3-4 weeks apart. The patients were followed up for 3months after the last session of therapy. Chi-square test was used as statistical method and when P- value <0.05, was regarded as significant.

**The Scientific Ethical Committee** in the College of Medicine, University of Diyala and Baquba Teaching Hospital was approved that the research proposal submitted by Assistant prof. Burooj Mohammed Razooqi Al-aajem, entitled (Molecular study of resistant microorganisms in post-operative patients on meropenem treatment). Under the scientific research with the necessary rules and regulations governing the ethics of scientific research, scientific ethical committee decided to approve the research project and give the ethical number (MD45 January 2017BMR).

## RESULTS

The study shows that (11) patients had ice pitted scars (V) shape and (20) patients had opened mouth depressed scars (boxcar-U shape and rolling-W shape), ( table-1) . They were (20) of grade (4), (6) grade (3) and (5) of grade (2) , according to the Goodman and Baron scale .

Table-2 shows the response to platelet rich plasma (PRP) and microneedling radiofrequency (RF) , which was classified into three levels (excellent , good and poor response) , and the response was assessed by the observer and the patient satisfaction . Ten patients ( 32.25%) shows an excellent response with improvement of 2grades according to Goodman and Baron scale , (15) patients (48.38%) shows a good response , with one grade improvement and (6) patients (19.61%) with poor response without any grade improvement ,all of them had ice pitted scars .

There was a direct proportion between the number of sessions and response to therapy , so those receive more sessions shows excellent response (5-7sessions) , and those receive less number of sessions (3-4) , shows good to poor response , also the type of scars effect the outcome of the therapy , so those with ice pitted scars shows a poor response .

The procedures were safe and associated with some pain even with topical anesthesia , 3 patients developed folliculitis at the site of puncturing by the PRP or RF needles , which consisted of small papules or pustules , with isolation of staphylococcus auras bacteria , although all patients were prepared by using a topical antiseptic before puncturing , and topical antibiotic (fucedic acid cream) was used after the end of therapy and for 7days , and they cleared by using topical and systemic antistaphylococcus antibiotics .

**Table-1: Number of patients according to the type of scar .**

Type of scar	Number of patients	Percentage
Boxcar and rolling	20	64.5%
Ice pitted	11	35.5%
Total	31	100%

**Table-2 : Number of patients in relation to the type of response and number of sessions .**

Type of response	Grade of improvement	Number of patients	Percentage%	Number of sessions
Excellent	2	10	32.25%	5-7
Good	1	15	48.38%	3-4
Poor	Zero	6	19.61%	3-4
Total		31	100%	

**Figure -1-(before)**



**Figure -2-(after)**



**Figure-3-(before)**



**Figure-4-(after)**



## **DISCUSSION**

Platelet rich plasma (PRP) was used alone or in combination with microneedling for the treatment of atrophic acne scars, all over the world. Although it was a newly introduced as a good option in the treatment of atrophic acne scars, and many studies were conducted in different countries all over the world, either by dermatologists or plastic surgeons, but the results of these studies were variable from one center to another.

Platelet rich plasma (PRP) worked through the presence of protein and growth factors, which enhance collagen and elastic fibers synthesis, and microneedling causes trauma, releasing of scarring tissue and induction of mild inflammatory reaction, which also causes releasing of growth factors and growth promoting substances, which in combination with that of PRP causes improvement in the scar tissue and appearance of the skin.

The results of our study which gave excellent and good results (32.25% and 48.38% respectively) as compared with other procedures, like dermabrasion and laser were superior to other studies<sup>(3)</sup>. Our study gave results better (80.63%) than that done by Shefail P. et al (58.47%)<sup>(15)</sup>. In comparison with other study conducted by Simran Ch., which gives excellent results in only (18.5%)<sup>(16)</sup>, while our study gave excellent results in (32.25%).

## CONCLUSSION

Platelet rich plasma (PRP) and radiofrequency (RF) microneedling were an effective option in the treatment of atrophic acne scars and giving an excellent and good results in (80.63%) of patients with a minimal side effects .

## REFFERANCES

1. William D. James , Timothy G. Berger, Dirk M. Elston . Acne vulgaris . Andrews, Diseases of the skin , Clinical Dermatology , 2006; 9<sup>th</sup> edition-1: 231-50 .
2. Arowojolu AO et al . Combined oral contraceptive pills for treatment of acne . Cochrane Database Syst. Rev. 2004; 3: CDOD4425 .
3. Bherdwajss SS, et al . Laser and light therapy for acne vulgaris . Semin Cut Med Surg. 2005; 24: 207
4. Wilson BB, et al . Papular acne scars . Arch Dermatol 1990; 126: 797 .
5. Alster TS , et al . Treatment of scars . Ann Plast. Surg. 1997; 39: 418 .
6. Goodman GJ, Baron JA . Post acne scarring: A qualitative global scarring grading system . Dermatol. Surg. 2006; 32: 1458-66 .
7. Pelel N. et al . Selective nonablative treatment of acne scarring with 585nm flash lamp pulsed dye laser . Dermatol. Surg. 2002; 28: 947 .
8. Paithankar DY , et al . Acne treatment by 1450nm wavelength laser and cryogen spray cooling . Laser Surg. Med. 2002; 31: 106 .
9. Fabbrocini G , Annunziata MC, D'Arcov, et al . Acne scars . Pathogenesis , classification and treatment . Dermatology Research and practice , 2010; 2010: 893080 .
10. Kuny JS, Zheng Z, Chol MJ, Lee SH, Kim DY, Cho SB . The effect of CD34+cell containing autologus platelet rich plasma injection on pattern hair loss . Preliminary study . J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. , 2012; 11: 312 .
11. Arshdeep MK, Seilhi Kumaran MS . Indications of PRP in dermatology . Indian J. Dermatol. Venereol. Lepro. (IJDVL), 2014; 80(1): 5-14 .
12. Besti EE, Germain E, Kalbermantten DF, Tremp M, Emmenegger V . Platelet rich plasma injection is effective and safe for treatment of alopecia . Eur. J. Plas. Surg. 2013; 36: 407-12 .
13. Tosti A, DePadova MP, Beer KR eds . Acne scars: Classification and treatment London: Informa UK Ltd, 2010 .
14. Sirman Ch . Split face comparative study of microneedling with PRP versus microneedling with vit. C in treating atrophic post acne scars , J. Cutan. Aesthet. Surg. 2015; 8(1): 75 .
15. Shefal P, Yatendra SC, Pramod KS . A comparative study of combined dermaroller and PRP versus dermaroller alone in acne scars . Indian J. of Dermatol. 2018; 63(5): 403-408 .
16. Simran C . Split face comparative study of microneedling with PRP versus microneedling alone in treating atrophic acne scars . J. Cutan. Aesthet. Surg. 2014; 7(4): 209-12 .

## Bactericidal activity of metal-containing phillipsites

Nato Mirdzveli<sup>1\*</sup>, Vladimer Tsitsishvili<sup>1</sup>, Nanuli Dolaberidze<sup>1</sup>, Marinela Panayotova<sup>2</sup>, Maria Doula<sup>3</sup>, Ketevan Ebralidze<sup>1</sup>, Manana Nijaradze<sup>1</sup>, Zurab Amiridze<sup>1</sup>, Bela Khutsishvili<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry of Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia.

<sup>2</sup>University of Mining and Geology, Sofia, Bulgaria.

<sup>3</sup>Benaki Phytopathological Institute, Kifissia, Greece.

\*Corresponding author e-mail: nato.mirdzveli@gmail.com

### Abstract

Metal-containing zeolite adsorbents and ion exchangers are promising for environmental protection and medical application. Silver-, copper-, and zinc-containing micro-mesoporous materials have been prepared on the basis of natural phillipsite from Shukhuti (Western Georgia) using ion-exchange reactions between zeolite and a salt of a transition metal in the solid phase followed by washing. According to the data of chemical analysis, prepared Ag-, Cu-, and Zn-forms contain up to 230 mg/g of silver, 66 mg/g of copper, and 86 mg/g of zinc, respectively. Ion exchange reactions do not change the microporous crystal structure of the zeolite, this is confirmed by the powder X-ray diffraction patterns and FTIR spectra of the modified samples. Isotherms of nitrogen adsorption-desorption and water adsorption capacity indicate preservation of total pore volume and system of mesopores including cylindrical pore channels with average diameter of 22 nm and slit-shaped pores in non-rigid aggregates of particles (over 50 nm); SEM images show that the procedure of dry ion-exchange synthesis leads to an increase in the dispersion of the material. Synthesized adsorbent-ion-exchangers show bactericidal activity towards *Escherichia coli*. According to the changes in the relative number of viable cells of bacteria contacting with zeolites and the data on leaching of metals from modified zeolites compared to the minimal inhibitory concentration (MIC) values for corresponding ions toward *E. coli*, the silver-containing zeolite exhibits a certain antibacterial activity even before the concentration of ions in the solution reaches the MIC value, and its bactericidal effect could be ascribed not only to released Ag<sup>+</sup> ions but also to Ag-phillipsite itself; the copper- and zinc-containing zeolites emit a small amount of ions (up to 0.5MIC) and their activity is entirely attributed to Cu-phillipsite and Zn-phillipsite themselves. Strong bacteriostatic activity of modified zeolites was established by the Kirby-Bauer test.

**Keywords:** Silver-, Copper-, Zinc-containing zeolites, *Escherichia coli*.

### INTRODUCTION

Zeolites ( $M^{n+}_{x/n}[(SiO_2)(AlO_2)_x] \cdot wH_2O$ , where M=Na, K, Ca, Mg, etc.) are porous crystalline aluminosilicates with open framework uniform structures (Baerlocher et al., 2007). Application of zeolites (Li et al., 2017; Bacakova et al., 2018) is based on the complex of their properties, especially on the ability of zeolites to enter into ion exchange reactions with the participation of Me<sup>n+</sup> ions compensating the negative charge of the crystal lattice constructed from alternating SiO<sub>4</sub> and AlO<sub>4</sub><sup>-</sup> tetrahedrons.

Different studies have demonstrated effectiveness of zeolites for removal of heavy metals from aqueous waste (Fu and Wang, 2011; Steffin et al., 2016). Besides, started at the beginning of the 21<sup>st</sup> century and continuing to this day, studies showed that natural and synthetic zeolites exchanged by ions of silver, copper, zinc, or some other transition metals exhibit antimicrobial activity toward a broad range of microorganisms (Kawahara et al., 2000; Rivera-Garza et al., 2000; De la Rosa-Gomez et al., 2008; Ferreira et al., 2012; Hrenovic et al., 2012; Guerra et al., 2012; Akhigbe et al., 2014; Rossainz-Castro et al., 2016; Milenkovic et al., 2017; Dolaberidze et al., 2018), and silver-containing zeolites are characterized by the most powerful antibacterial activity (Top Ülkü, 2004; Hrenovic et al., 2013; Demirci et al., 2014). In general, silver is considered as antibacterial agent with well-known mode of action, bacterial resistance against silver is well described (Klasen, 2000), similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents were discussed recently (Kędziora et al., 2018).

Along with medical use, application of such metal-containing zeolites (MZs) is helpful in the remediation of hazardous heavy metal-polluted soils (Shi et al., 2009) or in the purification of industrial wastewater (Martemianova et al., 2016), in such cases it is necessary to provide the sorption material with bactericidal properties in order to prevent the growth of microorganisms on its surface. It is believed that the porous zeolite structure enables metal cations to move freely from the lattice to the environment, and this seems to be

responsible for their activity toward microorganisms (Kwakye-Awuah et al., 2008), and zeolites not containing transition metals (silver, copper, zinc, mercury, cadmium, chromium, and lead) are not active (Hrenovic et al., 2012; Jiraroj et al., 2014), but it has recently been established that in some cases the antibacterial activity could be attributed to the MZ itself (Milenkovic et al., 2017; Dolaberidze et al., 2018).

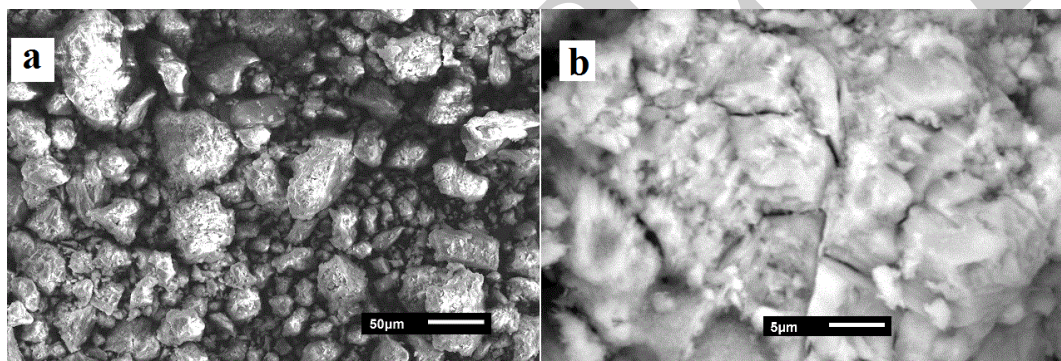
In the preparation of MZs by ion exchange, synthetic zeolites A, X, and Y, as well as cheap natural clinoptilolite of different origin have been used, a list of these works is given in our recent publication (Dolaberidze et al., 2018). The purpose of the study to develop a fast, eco-friendly method for producing silver-, copper-, and zinc-containing MZs from natural phillipsite characterized by relatively high ion exchange capacity.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Preparation of MZs by “ion exchange synthesis” was carried out using Georgian natural phillipsite-containing tuff rock from Shukhuti, Western Georgia, described and characterized (Tsitsishvili et al., 1998) previously, zeolite phase content differs from 60 to 80%, major impurities – heulandite and clay minerals.

The mechanical grinding of tuff in the planetary micro mill (Pulverisette 7, Fritsch Laboratory Instruments, Idar-Oberstein, Germany) to obtain <63  $\mu\text{m}$  (240 mesh) fraction leads to the formation of a multitude of micrometric crystallites (Figure 1a). It is easy to obtain a highly dispersed fraction, since large crystallites (with dimensions of about 50  $\mu\text{m}$ ) consist of smaller (about 5  $\mu\text{m}$ ) bound together by clay minerals (Figure 1b).



**Figure 1.** SEM images with magnification 270 (a) and 2700 (b) of tuff from Shukhuti

Crushed and sieved rock was washed by diluted HCl solution (0.025 N) to remove clay impurities, and named as NP (natural phillipsite). The affiliation of the zeolite phase crystal structure to the PHI type for NP was confirmed by powder X-ray diffraction pattern and FTIR spectrum; chemical composition of NP corresponds to formula  $(\text{Na}_{1.30}\text{K}_{2.0}\text{Ca}_{0.30}\text{Mg}_{0.25})\text{Me}_{0.10}[\text{Al}_{4.50}\text{Si}_{11.80}\text{O}_{32}]\cdot 11.4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Me} = \frac{1}{3}\text{Fe}^{3+}, \frac{1}{2}\text{Cu}^{2+}, \frac{1}{2}\text{Mn}^{2+}$ , etc. The Si/Al ratio value (2.6) and relatively high sodium content indicate the sedimentary origin of the rock; water content is in a good accordance with accepted crystal chemical formula  $[\text{K}_2(\text{Ca}, \text{Na}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_{12}][\text{Al}_6\text{Si}_{10}\text{O}_{32}]$ -PHI, (Baerlocher et al., 2007).

Analytical grade silver nitrate  $\text{AgNO}_3$ , copper chloride  $\text{CuCl}_2$ , and zinc chloride  $\text{ZnCl}_2$  were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and used without any further purification.

### Preparation of MZs

Ion exchange was carried out as follows: powder of zeolite NP and the corresponding salt were mixed in different weight ratios (from 1:1 to 1:6) and thoroughly grinded in an agate mortar for 5-10 minutes, depending on the cationic form and weight ratio. The solid mixture was then transferred to a filter and washed with distilled water until the absence of nitrate or chlorine anions, after which the modified samples were first dried in air and then at 100-105°C in a thermostat; samples with a maximum silver content are labeled as AgP, with a maximum copper and zinc content called CuP and ZnP, respectively.

### Characterization of zeolite samples

Chemical composition of raw material and prepared samples was determined by elemental (atomic absorption spectrometer 300, Perkin-Elmer, UK) and energy dispersive (ED) X-ray analyses. Powder X-ray diffraction patterns were obtained from a modernized Dron-4 X-ray diffractometer (Russia) employing the  $\text{Cu-K}_\alpha$  line and scanning in the  $2\Theta$  range of 5° to 50° with a 0.02° step at a scanning speed of 1°/min. FTIR spectra were collected by a 10.4.2 spectrometer (Perkin-Elmer, UK) over the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of

2 cm<sup>-1</sup> using the KBr pellet technique for sample preparation. The surface morphology of the samples was observed by scanning electron microscope JSM6510LV (Jeol, Japan) equipped with X-Max 20 analyzer (Oxford Instruments, UK) for ED spectra. Nitrogen adsorption-desorption isotherms were measured at 77 K using an ASAP 2020 Plus physisorption analyzer (Micromeritics, Norcross, GA, USA), after evacuation of the samples at 350°C during 2 hours; water adsorption capacity was measured under static conditions.

### Release of metals from zeolites and antibacterial activity

The determination of the amount of metals released from MZs in normal saline solution (9 g of NaCl in 1 L of deionized water) was carried out under static conditions in a thermostatic bath (Grant Instruments OLS26 Aqua Pro) at a temperature of 37 ± 0.1 °C, without stirring or shaking. Sampling for analysis was carried out after 1, 3, 6 and 24 hours after loading 0.1 gram of zeolite in 100 ml of saline.

The antibacterial activity of NP and MZs was tested against Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. Before testing the antibacterial activity, all dry zeolite products were sterilized at 70°C for 2 hours in a dry sterilizer. No microbial contamination of the prepared samples was found.

Luria Bertani (LB) medium sterilized by autoclaving (121°C, 15 min) prior to the antibacterial activity tests was used as a growing medium, bacteria were grown aerobically in LB broth at 37°C for 12 hours, the culture was centrifuged twice (10,000 rpm), and the cells were washed and suspended in distilled water. 1 cm<sup>3</sup> of the prepared biomass suspension of approximately 10<sup>7</sup> colony-forming units (CFU) per cm<sup>3</sup> was inoculated into the Schott's bottles with 100 cm<sup>3</sup> of autoclaved saline, and zeolite samples in a concentration of 0.1 g/100 cm<sup>3</sup> were added. The bottles were incubated in a thermostatic water bath with shaking at 105 rpm for 24 hours at 37±0.1°C. The number of viable cells was determined taking 0.1 mL of water + bacteria + zeolite mixture at the beginning of the experiment, after 1 hour (the lag phase of bacterial growth), and after 3, 6, and 24 hours (the stationary phase). The aliquots were diluted in distilled water, spread on LB agar plates and incubated at 37°C for 24 hours. Bacterial colonies were counted using microscope.

Bacteriostatic properties of natural and modified zeolite samples were determined by the disk diffusion (Kirby-Bauer) method in standard conditions using the culture of *E.coli* grown on Mueller–Hinton agar medium at 37°C for overnight and placed (10<sup>9</sup> CFU/ cm<sup>3</sup>) on Mueller–Hinton agar (3 mm deep) poured into 100 mm Petri dishes. 0.2 g of zeolite in the form of pellets with 8 mm in diameter was placed into the plates. The plates were incubated at 37°C over 5% CO<sub>2</sub> medium and, finally, the width of inhibition zone of each sample in the plates was measured at the end of the first day.

All experiments on antibacterial activity of NP and MZs were done in triplicate. The values obtained were averaged to give the final data with standard deviations.

## RESULTS

### Chemical composition

Chemical composition of natural phillipsite and its modified forms with a maximum content of transition metals are listed in the Table I in terms of the empirical formulas x(M<sub>a</sub>N<sub>b</sub>K<sub>c</sub>Ca<sub>d</sub>Mg<sub>e</sub>Me<sub>f</sub>)[Al<sub>x</sub>Si<sub>y</sub>O<sub>32</sub>]nH<sub>2</sub>O, where Me<sup>+</sup> ion corresponds to the impurity metals, M= Ag<sup>+</sup>, ½Cu<sup>2+</sup>, or ½Zn<sup>2+</sup>, and deviations are given in parentheses.

**Table 1.** Chemical composition of phillipsites

Sample	NP	AgP	CuP	ZnP
a (½a for Cu and Zn)	0	0.76(4)	0.400(16)	0.41(15)
b	0.289(14)	0.0022(1)	0.0484(9)	0.0023(1)
c	0.444(24)	0.018(2)	0.0386(8)	0.077(5)
d	0.067(3)	0.056(3)	0.028(3)	0.017(2)
e	0.056(3)	0.045(3)	0.026(4)	0.028(4)
f	0.044(3)	0.013(1)	0.033(2)	0.011(1)
y/x=Si/Al	2.62(16)	2.52(15)	2.60(16)	2.64(16)
n	11.4(6)	14.2(8)	14.3(8)	15.6(9)
a+b+c+2d+2e+f	1.02(6)	1.01(6)	1.03(7)	1.02(6)

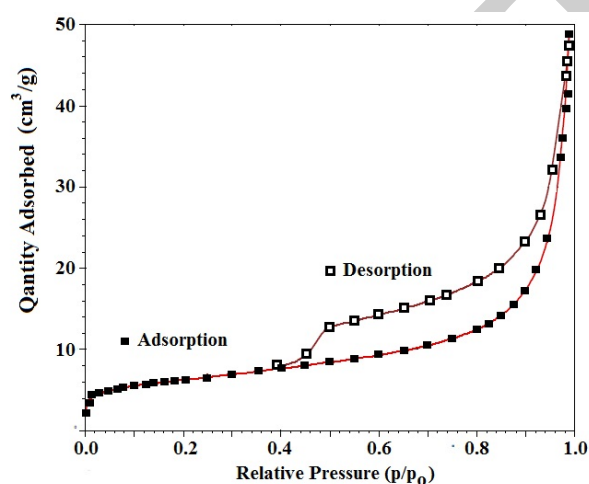
### X-ray diffraction patterns and IR spectra

No notable changes were observed in the powder X-ray diffraction patterns and IR spectra of the AgP and ZnP (Dolaberidze et al., 2018), as well as of the CuP as compared with the characteristic peaks and vibration bands of raw zeolitic mineral (Tsitsishvili et al., 1998).

The ratio of the absorbance of asymmetric stretching vibration of the external tetrahedron with frequency  $\nu_{\text{asym}}$  to the absorbance of internal bending vibration with frequency  $\delta$  was used for the evaluation of the IR spectra data for natural and modified Mexican zeolite (Revera-Garza et al., 2000); for a mixture of clinoptilolite-heulandite and corresponding MZs, this ratio varies from 1.34 to 1.64, but for phillipsite NP and its modifications, this ratio varies only slightly from 1.75 to 1.82. A narrow absorption band at  $1385\text{ cm}^{-1}$  typical for NO stretching vibrations in nitro compounds was observed in IR spectra of insufficiently washed silver-enriched phillipsite, this effect can be used to monitor the purity of silver-containing samples.

### Sorption properties

The nitrogen adsorption-desorption isotherms on natural phillipsite (Figure 2) and MZs demonstrate a hysteresis loop with a jump at  $p/p_0=0.4-0.5$  indicating the presence of mesopores including slit-shaped pores in non-rigid aggregates of particles ( $H_3$  type hysteresis loop) and possibly well defined cylindrical pore channels ( $H_1$  type hysteresis loop according to Sing et al. (1985)). Average pore diameter of mesopores, calculated by the Barrett-Joyner-Halenda method using adsorption and desorption isotherm, is 22.0 and 54.4 nm, respectively.



**Figure 2.**  $N_2$  adsorption-desorption isotherms on NP

Some changes are observed for adsorption isotherms of MZs at low relative pressures ( $0.05 < p/p_0 < 0.25$ ), under conditions of filling micropores. However, the pore sizes in phillipsite crystal structure are close to the kinetic diameter of  $N_2$  ( $3.64\text{ \AA}$ ), and the Brunauer-Emmett-Teller method cannot be used to estimate the surface area and volume of micropores; despite the formal suitability of this method up to  $p/p_0 < 0.2$ , it gives an average pore diameter over 15 nm, typical for mesopores and not for micropores.

Room temperature water adsorption capacity (Table 2) at the “plateau” pressure ( $p/p_0=0.40$ ) is  $7.25\text{ mmol/g}$  or  $0.130\text{ cm}^3/\text{g}$ , and is 46% of the total water adsorption capacity  $0.285\text{ cm}^3/\text{g}$ , which is close to the total pore volume  $0.278\text{ cm}^3/\text{g}$ , determined from the low-temperature  $N_2$  adsorption-desorption isotherms.

**Table 2.** The water adsorption capacity of phillipsites

Water adsorption ( $\text{mm}^3/\text{g}$ )	NP	AgP	CuP	ZnP
In micropores ( $p/p_0=0.4$ )	$130\pm 6$	$100\pm 5$	$120\pm 8$	$118\pm 6$
Total ( $p/p_0=1.0$ )	$285\pm 15$	$282\pm 12$	$286\pm 18$	$290\pm 15$

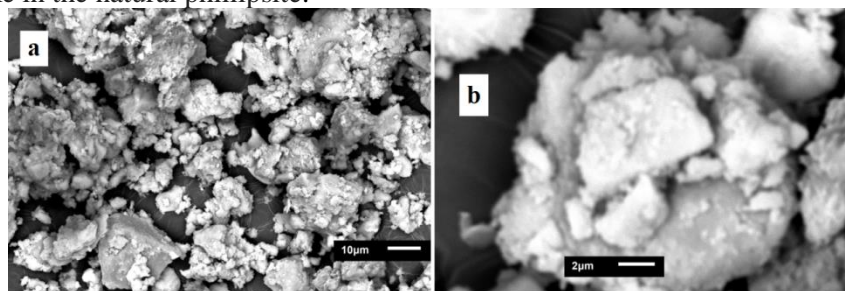
The total pore volume within the experimental error is preserved; the volume of micropores in the MZs available for the adsorption of water molecules decreases, especially for the silver-containing sample AgP. Apparently, transition metal ions, when introduced into the zeolite structure, at least partially retain their hydration shell, effectively reducing the free micropore volume.

### SEM images

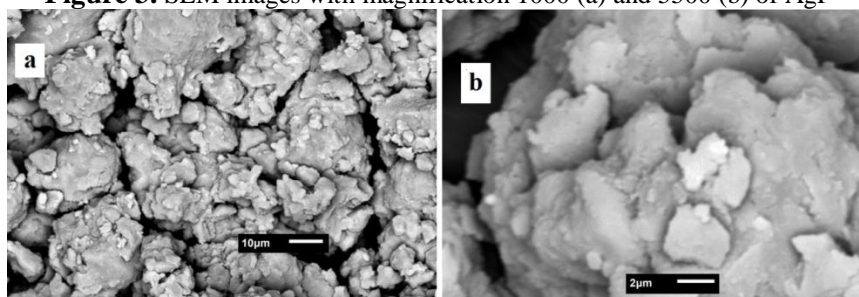
In general, the procedure of ion-exchange synthesis leads to a significant increase in the dispersion of the material, the size of the largest crystallites does not exceed  $20\text{ }\mu\text{m}$  for AgP (Figure 3a) and  $30\text{ }\mu\text{m}$  for ZnP (Figure 4a) and CuP. Compared with the natural phillipsite, the proportion of crystallites smaller than  $2\text{ }\mu\text{m}$  is increased, especially for the AgP sample (Figure 3b). The silver- and copper- containing crystals are



sufficiently isolated, whereas the aggregation of zinc-containing crystallites (Figure 4b) is preserved to a greater degree, like in the natural phillipsite.



**Figure 3.** SEM images with magnification 1000 (a) and 5500 (b) of AgP



**Figure 4.** SEM images with magnification 1000 (a) and 5500 (b) of ZnP

#### Release of metal ions

The amount of silver ions released after 6 hours (Table 3) corresponds to concentration of 0.067 mM, which is higher than the minimal inhibitory concentration (MIC) value for silver ions toward *E. coli*, 3.996 mg Ag in dm<sup>3</sup> (Mulley et al., 2014) or 0.037 mM. On the contrary, the amount of copper and zinc ions released after 24 hours corresponds to concentration of 0.45 and 0.5 mM, respectively, lower than MIC value for copper and zinc ions toward *E. coli*, 1 mM (Navarro et al., 2017).

**Table 3.** The leaching of metals from modified phillipsites

Ions	Ag <sup>+</sup> from AgP (mg/L)	Cu <sup>2+</sup> from CuP (mg/L)	Zn <sup>2+</sup> from ZnP (mg/L)
In 1 hour	<5	<5	5.2±1.2
In 3 hours	<5	8.5±2.5	12.7±2.5
In 6 hours	7.2±1.5	16.2±3.2	23.0±5.5
In 24 hours	20.6±4.5	28.7±4.5	32.4±6.6

#### Bactericidal activity

Table 4 shows the relative number of viable cells of *E. coli* suspended in water after their contact with natural and modified phillipsites in relation to the number of cells at the beginning of the experiment; results of the Kirby-Bauer test are given in the Table 5.

**Table 4.** The change in the relative number of viable cells of *E. coli* in time

Sample	NP	AgP	CuP	ZnP
At the beginning	100	100	100	100
After 1 hr	102.5±4.2	72.0±4.1	85.0±5.0	93.2±6.5
After 3 hr	98.3±3.5	23.6±2.8	42.0±2.5	51.6±4.7
After 6 hr	99.6±4.5	0	12.0±2.0	30.4±2.2
After 24 hr	100.5±4.8	0	0	0

**Table 4.** Bacteriostatic properties of NP and MZs against *E. coli*

Sample	Diameter of inhibition zone (mm)
Petri dish with <i>E. coli</i> only (check)	0 – confluent growth
Petri dish with <i>E. coli</i> and NP	0 – confluent growth
Petri dish with <i>E. coli</i> and AgP	18.6±0.7
Petri dish with <i>E. coli</i> and CuP	15.7±1.0
Petri dish with <i>E. coli</i> and ZnP	16.3±0.9

## DISCUSSION

Neither the crystal structure of the zeolite, nor the system of mesopores changes with the introduction of transition metals into the phillipsite structure.

Introduction of Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>+2</sup>, and Zn<sup>+2</sup> ions into the phillipsite crystal lattice results in replacement of monovalent K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> ions. Degree of replacement is quite high, the obtained MZs contain a large amount of transition metals – up to 230 mg/g (2.14 mmol/g) of silver in the AgP sample, up to 66 mg/g (~1 mmol/g) of copper in the CuP sample, and up to 86 mg/g (~1.3 mmol/g) of zinc in the ZnP sample. The obtained values are comparable with the maximum possible content of silver (1.85 mmol/g), copper (1.2 mmol/g), and zinc (1.03 mmol/g) calculated from ion-exchange isotherms (Top and Ülkü, 2004), and significantly exceed figures measured for synthetic and natural samples, ranging from 0.14 (Jędrzejczyk et al., 2017) to 0.82 mmol/g (Akhigbe et al., 2014) for Ag<sup>+</sup>, and not exceeding 0.3 mmol/g for Cu<sup>+2</sup> and Zn<sup>+2</sup> (Milenkovic et al., 2017).

No antibacterial action was observed for the original phillipsite. The silver-containing zeolite AgP exhibits a certain antibacterial activity even before the concentration of ions in the solution reaches the MIC value, and its bactericidal effect could be ascribed not only to released Ag<sup>+</sup> ions but also to AgP itself. The amount of released Cu<sup>+2</sup> and Zn<sup>+2</sup> ions does not provide the MIC even in a day, so the activity of CuP and ZnP should be attributed not to the leached metal ions, but to MZs themselves.

The width of the inhibition zones of the antibacterial metal-exchanged forms AgP, CuP, and ZnP is of the same order of magnitude as for silver-, copper, and zinc-containing clinoptilolite-rich mineral from Gördes, Turkey, Western Anatolia (Top and Ülkü, 2004), and exceed diameter of inhibition zones reported for copper-containing clinoptilolite from the “Holinskoe” mineral deposit, Russia, Republic of Buryatia (Martemianova et al., 2016).

## CONCLUSION

In this study, the process of ion exchange between natural phillipsite and transition metal salt proceeding in solid phase was investigated in order to obtain MZs. It is found that this method makes it possible to obtain samples with a high content of silver, copper, and zinc, while maintaining the crystal structure and other properties of the zeolite, and the obtained MZs exhibit bactericidal activity even when the amount of released metal does not reach the minimal inhibitory concentration against *E. coli*.

Thus, the obtained MZs can be used as bactericidal adsorbents and ion exchangers for medical purposes, as well as for cleaning and disinfecting water and soil.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (SRNSFG) [grant number FR-18-2600 “Scientific feasibility of creating nanocrystalline bactericidal sorbents on the basis of Georgian natural zeolites and the study of corresponding mechanisms”].

## REFERENCES

- Akhigbe L, Ouki S, Saroj D, Min Lim X 2014. Silver-modified clinoptilolite for the removal of Escherichia coli and heavy metals from aqueous solutions. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(18): 10940-10948.
- Bacakova L, Vandrovцова M, Kopova I, Jirka I 2018. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomaterials Science*, 6: 974-989.
- Baerlocher Ch, McCucker LB, Olson DH 2007. Atlas of zeolite framework types. Sixth revised edition. Amsterdam: Elsevier, 398 pp.
- De la Rosa-Gomez I, Olguin MT, Alcantara D 2008. Bactericides of coliform microorganisms from wastewater using silver-clinoptilolite rich tuffs. *Applied Clay Science*, 40(1-4): 45-53.
- Demirci S, Ustaoglu Z, Yilmazer GA, Sahin F, Baç N 2014. Antimicrobial properties of zeolite-X and zeolite-A ion-exchanged with silver, copper, and zinc against a broad range of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3): 1652-1662.
- Dolaberidze NM, Tsitsishvili VG, Khutsishvili BT, Mirdzveli NA, Nijaradze MO, Amiridze ZG, Burlanadze MN 2018. Silver- and zinc-containing bactericidal phillipsites. *New Materials, Compounds and Applications*, 2(3): 247-260.
- Ferreira L, Fonseca AM, Botelho G, Almeida-Aguiar C, Neves IC 2012. Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous and Mesoporous Materials*, 160: 126-132.
- Fu F, Wang Q 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*, 92: 407-418.

- Guerra R, Lima E, Viniegra M, Guzman A, Lara V 2012. Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* inhibited by fractal silver nanoparticles supported on zeolite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 147(1): 267-273.
- Hrenovic J, Milenkovic J, Ivankovic T, Rajic N 2012. Antibacterial activity of heavy metal-loaded natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 201-202: 260-264.
- Hrenovic J, Milenkovic J, Goic-Barisic I, Rajic N 2013. Antibacterial activity of modified natural zeolite against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 169: 148-152.
- Jiraroj D, Tungasmita S, Tungasmita DN 2014. Silver ions and silver nanoparticles in zeolite A composites for antibacterial activity. *Powder Technology*, 264: 418-422.
- Jędrzejczyk RJ, Turnau K, Jodłowski PL, Chlebda DK, Łojewski T, Łojewska J 2017. Antimicrobial properties of silver cations substituted to faujasite mineral. *Nanomaterials (Basel)*, 7(9): 240-251.
- Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, Uchida M 2000. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental Materials Journal*, 16(6): 452-455.
- Klasen HJ 2000. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. II. Renewed interest for silver. *Burns: journal of International Society for Burn Injuries*, 26(2): 117-138.
- Kwakye-Awuah B, Williams C, Kenward MA, Radecka I 2008. Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1516-15248.
- Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, Rybka J, Łukowiak A, Bugła-Płoskońska G 2018. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 444-461.
- Li Y, Li L, Yu J 2017. Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem*, 3: 928-949.
- Martemianova I, Nadeina L, Plotnikov E, Martemianov D 2016. Modification of natural sorbent for providing it with bactericidal and bacteriostatic properties. *MATEC Web of Conferences* 85: 01030.
- Milenkovic J, Hrenovic J, Matijasevic D, Niksic M, Rajic N 2017. Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 20273-20281.
- Mulley G, Jenkins ATA, Waterfield NR 2014. Inactivation of the antibacterial and cytotoxic properties of silver ions by biologically relevant compounds. *PLoS ONE*, [Online]. 9(4): e94409 (Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094409> ).
- Navarro CA, von Bernath D, Jerez CA 2017. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: Importance for biomining and bioremediation. *Biological Research*, 46(4): 363-371.
- Rivera-Garza M, Olguin MT, Garcia-Sosa I, Alcantara D, Rodriguez-Fuentes G 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39: 431-444.
- Rossainz-Castro LG, De la Rosa-Gomez I, Olguin MT, Alcantara-Diaz D 2016. Comparison between silver- and copper-modified zeolite rich tuffs as microbicidal agents for *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Journal of Environmental Management*, 183(3): 763-770.
- Shi WY, Shao HB, Li H, Shao MA, Du S 2009. Progress in the remediation of hazardous heavy metal-polluted soils by natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1): 1-6.
- Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquérol J, Siemieniowska T 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57: 603-612.
- Steffin JE, Dilson BS, Manikandan PM 2016. An overview on activated carbon and zeolites in water treatment. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 2: 6-11.
- Top A, Ülkü S 2004. Silver, zinc, and copper exchange in Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. *Applied Clay Science*, 27(1-2): 13-19.
- Tsitsishvili V, Dolaberidze N, Alelishvili M, Tsintskaladze G, Sturua G, Chipashvili D, Nijaradze M, Khazaradze N 1998. Adsorption and thermal properties of zeolitic rocks from newly investigated deposit plots in Georgia. *Georgian Engineering News*, 2(6): 61-65.

## Recovery of commodities using sequential stepwise extraction method from agroindustrial waste

Ketevan Ebralidze\*, Mzia Tsitsagi, Vladimer Tsitsishvili, Imeda Rubashvili, Mariam Chkhaidze, Miranda Khachidze, Manana Buzariashvili

Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry of Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia.

\*Corresponding author e-mail: ketiebralidze@yahoo.com

### Abstract

Agro-industrial wastes are defined as non-product outputs of production and processing of agricultural products usually containing material that can benefit man, but whose economic values are less than the cost of collection, transportation, and processing for beneficial use. Winemaking, citrus, apple, tomato and onion production are the main branches of agriculture in Georgia, after recycling giving a large amount of waste, a rich source of commodity products – oils, flavor, natural pigments, antioxidants, pectin, etc. Modern concept of utilization of agricultural wastes focuses on complete utilization and use of eco-friendly separation method that require standard equipment for industrial application. The research was focused on sequential stepwise extraction method for utilization of grape/apple pomace and citrus peel. Design of sequential stepwise extraction methodology requires following preliminary studies: Selection of valuable compounds available from waste; Choice of extraction method (conventional, ultrasonic, supercritical fluid); Determination sequence of steps for extraction of selected compounds; Choice of solvents; Optimization of operational conditions. Supercritical fluid extraction for extraction of valuable compounds from citrus peel is eco-friendly separation tool. Supercritical CO<sub>2</sub> as solvent offers numerous advantages such as excellent mass transfer and control of density by temperature and pressure providing high selectivity of extracted products. Process relies on standard equipment and is fast. Ultrasonic sequential stepwise method were used in case of apple pomace, residues of apple juice processing. Ultrasound-assisted extraction can offer high reproducibility in shorter time, higher yields of products, simplifies manipulation, decreases temperature during processing and lowers energy input. Conventional sequential stepwise extraction recently developed is low cost alternative to supercritical and ultrasonic method. Choice of suitable techniques depends on: desired class of compounds to be extracted, quality and yield required for product; the process conditions and economic feasibility for scaling up the process.

**Keywords:** Supercritical fluid, Ultrasonic, Pomace, Waste.

### INTRODUCTION

Georgia is a developing country, and over the past 15 years, the intensification of agricultural, livestock breeding, industrial and tourist activities has produced an immense increase in the production and accumulation of large amounts of wastes that increase disposal and pollution problems because of their high organic matter content. Generally, agro-industrial wastes are mainly composed of complex polysaccharide/proteins, carbohydrates, polyphenolic constituents, etc. (Mohd, 2017).

The basis of Georgia's agriculture is grapes, but citrus, tomato and onion are no less important. Some hundreds of compounds have been identified in grape (Iriti and Vitalini, 2011), citrus peels contain essential oil and are very rich in antioxidant phenolic compounds, tomato and onion skin is a source of natural colorants.

A broad spectrum of extraction techniques is widely used for the early purification of natural products from plant material and microorganisms. Traditional methods including Soxhlet extraction, maceration, percolation and turbo extraction (high speed mixing) are very often time-consuming and require relatively large quantities of polluting solvents. The hot water extraction and supercritical fluid extraction (SFE) using carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) have been proposed as an alternative to extraction with organic solvents for production of grape seed oil (Gómez et al., 1996). SFE results in similar yields as the oil extraction through solvent and eliminates the solvent removal process and subsequent stages of refinement. Nowadays, various pretreatment techniques such as ultrasound- (UAE) or microwave-assisted extraction (MAE) followed by chromatographic analysis have been developed to extract natural colorants and biologically active compounds from different waste samples.

The main goal of our studies was to establish rational eco-friendly techniques and optimal conditions for the extraction of valuable products from the waste of the agro-industrial sector of Georgia. Grape pomace, orange and tangerine peel, tomato paste waste, onion skin and apple pomace were the main subjects of research, and oils, phenolic antioxidants and colorants, carotenoids, flavonoids, lipophilic and pectin were target products.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Grape pomace has been provided by local wine factories and SMEs from the Kakheti and Imereti regions of Georgia. The raw material was dried at 50-60°C (Kvartskhava et al., 2010), after which the peel was separated from the seeds by a fan. Separated grape skin was additionally dried in laboratory room under the controlled conditions (20-25°C, and the relative humidity – 30-60 %) and protected from direct sun light.

Ripe tangerine (*Citrus Unshiu*), orange and tomato were bought in the local agrarian market of Georgia. The peel and skin were manually removed from the selected fruit/vegetable and dried for 14 days in laboratory room under the controlled conditions (the temperature – 20-25°C, the relative humidity – 30-60%) and protected from direct sun light. Apple pomace including seeds, the primary by-product of apple juice production, were provided by LTD “Samegobro” Gori, Georgia. Apple pomace were dried in oven at 40-45°C. The certified analytical standards of cyanidin chloride, kuromanin chloride and  $\beta$ -carotene, the HPLC grade acetone, ethanol, ethyl acetate, acetonitrile, methanol, the analytical grade hydrochloric acid, formic acid and phosphoric acid were supplied by Sigma-Aldrich (Germany). The HPLC/GC grade acetonitrile, methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, acetic acid, dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, 1,2-dichloromethane, *n*-hexane were purchased from Sigma-Aldrich, Merck and Carl Roth (Germany). The HPLC grade water was prepared using Milli Q Advantage A10 purification system (Merk-Millipore, France).

### Extraction

The grape seed oil was extracted with the help of the Soxhlet equipped hubs. For each hub of the equipment, 10 g of grinded with an electrical grinder seeds, with the dimension of 1 mm have been used. The extraction was done with hexane and petrol ether at 50-60°C, and repeated 5 times for each variety of seeds.

SC-CO<sub>2</sub> extraction was carried out on a laboratory SFE system described recently (Tsitsishvili et al., 2018) including a 500 mL stainless steel extraction vessel (reactor), equipped with CO<sub>2</sub> high pressure pump PM 101 (Germany), and using conventional cylinders for transportation and supply of carbon dioxide. The system operates in the following mode: the carbon dioxide is compressed and chilled at –5°C, liquefied CO<sub>2</sub> is pumped continuously into the extraction vessel in which the previously weighed sample is loaded; The extraction takes place under static equilibrium conditions, at constant temperature and pressure, for a certain time. Dynamic extraction is carried out by feeding with a certain flow rate the liquefied CO<sub>2</sub> gas or its mixture with co-solvent. Ultrasonic P 300 H bath (Elma Schmidbauer, Germany) was used for ultrasound-assisted extraction at 22 and 37 kHz, the temperature was controlled during ultrasonication. IKA C-MAG MS magnetic stirrer (IKA-Werke, Germany) was used for magnetic stirring extraction. The stirring speed was 100 – 1500 rpm and the temperature range from 25 to 60°C.

### Chromatographic analysis and method validation

Agilent Quadrupole GC-MS 790B1/5977A system (AG Technologies, USA) was used for the gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analysis. The chromatographic conditions have been optimized using the fused silica capillary column – HP-5ms (30m × 0.32mm × 0.25 $\mu$ m). The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed using Agilent 1260 Infinity HPLC system (AG Technologies, USA) and an LC-20AD Prominence HPLC system (Shimadzu, Japan). The chromatographic conditions have been optimized using the following columns - RP-18 endcapped Lichrocart 4 x250 mm, 5  $\mu$ m (Merck-Millipore) and Agilent SB-C18 4.6x250 mm, 5  $\mu$ m (AG Technologies, USA). System control, data collection and data processing for GC-MS and HPLC were accomplished using Chemstation software (Hewlett-Packard).

All developed methods for HPLC analysis of compounds (Rubashvili et al., 2018; Tsitsagi et al., 2018; Rubashvili et al., 2019) were validated according to guideline of the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use and other recommendations (Tsitsishvili et al., 2018) with respect to robustness – standard solution stability and filter compatibility test, system suitability test, specificity, linearity-range, accuracy, precision, limit of detection (LOD) and quantitation (LOQ) as well.

## RESULTS and DISCUSSION

### Grape Pomace Products

According to the data from the Department of Statistics of Georgia, the annual harvest of grapes in the country varies between 170 and 220 thousand tons, out of about 60% is processed at wineries producing up to 25 thousand tons of grape pomace. To establish the maximum possible yield of oil from Georgian grape seeds, control experiments were carried out by the Soxhlet (Table 1) and SC-CO<sub>2</sub> (Table 2) extraction.

**Table 2.** The yield of the oil after 8 hours of extraction with hexane and petroleum ether

Sample #	Grape variety	Place & Manufacturer	Yield (%)
1	Saperavi	Manavi winery	15.8-16.0
2		Kakabeti SE	14.6-15.9
3		Telavi winery	14.5-15.3
4	Rkatsiteli	Manavi winery	14.5-15.6
5		Manavi SE	14.1-15.5
6	Aladasturi	SE in Kakheti region	10.9-11.2
7		SE in Imereti region	9.8-10.8

**Table 2.** The highest yield of oil after SC-CO<sub>2</sub> extraction

Sample #	Temperature (°C)	Equilibrium		Dynamic time (min)	Yield (%)
		Pressure (atm)	Time (min)		
1	60	150	15	180	15.6
2	60	250 – 300	15	240	15.4
3	60	150	15	300	14.7
4	65	150	60	180	14.8
5	60	150	60	180	14.6
6	65	150	60	180	10.5
7	65	150	60	120	9.8

During the SC-CO<sub>2</sub> extraction, the temperature varied within 40-70°C, the equilibrium pressure from 150 to 300 atmospheres, the time from 15 to 60 minutes, the dynamic pressure from 250 to 300 atmospheres, and the time from 120 to 240 minutes. The maximum oil yield occurs at a dynamic pressure of 300 atmospheres, other optimal parameters are given in Table 2.

The highest content of oil is revealed for seeds of red grapes of the Saperavi variety, the lowest – for the seeds of red grapes of the Aladasturi variety. The obtained oil has a greenish-yellow color and a pleasant aroma. Its density  $d^{20}=928\pm 1 \text{ kg/m}^3$  is close to the density of the refined sunflower oil. The refractive index  $n_d^{20}$  varies from 1.4723 and 1.4726, and is typical for vegetable oils. The low-yield oil from the Aladasturi variety has the largest iodine (up to 144 g/100g) and acid (up to 4.1 mg/g) numbers, other samples are typical for vegetable oils indicators of unsaturation (126 – 131 g/100g) and the number of carboxylic acid groups (1.67 – 1.91 mg/g). According to the saponification value as a measure of the average molecular weight, the oil isolated from grape seeds of the Rkatsiteli variety is characterized by long chain fatty acids. The composition of extracted oil (% of fatty acid) is as follows: linoleic (72-76), oleic (15-16), palmitic (~7), stearic (~4),  $\alpha$ -linoleic (~1), and palmitoleic (~1).

The oil extracted from the Georgian grape varieties in terms of its characteristics and composition can be used both in the food industry and in perfumery. Results of feasibility study on production of oil by eco-friendly non-solvent technologies (pressing and SFE extraction) including financial analysis of investment, the creation and operation of a SME with annual capacity up to 2 thousand tons is given by Tsitsishvili et al. (2018).

Grape pomace contains phenolics due to an incomplete extraction during the winemaking process. Phenolics are secondary plant metabolites with potential beneficial effects on human health because of their antioxidant activity and antimicrobial, antiviral, and anti-inflammatory properties.

The extraction of phenolic antioxidants from the seeds of Georgian red grape varieties Saperavi (pomace samples 1-3) and Aladasturi (pomace samples 6,7) was performed using methanol, ethanol and mixture of ethanol to water 1:1 as solvents and under various conditions of pH, solvent to sample ratio and extraction period, at ambient temperature as described by Tsitsagi et al. (2015), and the SFE was carried out using CO<sub>2</sub> – ethanol – water mixtures as solvents. Ethanol has a higher critical temperature (513.9K) and lower critical pressure (60.6 atm) than carbon dioxide, while the density of critical ethanol is almost two times lower. Table 3 shows the highest phenol yields (mg/g GAE) obtained under optimal extraction conditions, the SC-CO<sub>2</sub> method (one hour static extraction at 60-65°C and 150 atm, followed by 300 atm at a flow rate 2 mL/min during 2 hr) is effective for samples with a relatively low content of phenols.

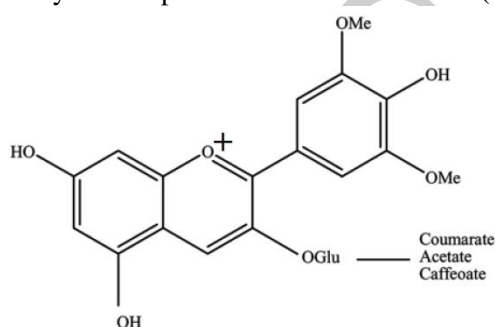
**Table 3.** Content of polyphenols extracted from Georgian red grape seeds by different solvents

Sample #	Methanol	Ethanol	Ethanol-water	SC-CO <sub>2</sub>
1	17.5	20.5	21.3	19.1
2	19.0	21.4	22.0	20.5
3	21.5	24.2	24.2	25.5
6	8.75	14.6	14.4	15.0
7	9.0	15.0	15.0	15.4

In another series of experiments the recovery of polyphenols from the Saperavi SC-CO<sub>2</sub>-deoiled grape seeds was carried out using SC-CO<sub>2</sub> modified with ethanol-water mixture (40%), varying temperature and extraction time. The maximum polyphenol yield, 285 mg/g GAE, was reached at the ethanol/water ratio 2:1, extraction time of 60 minute and temperature of 80°C. Polyphenols were also isolated from the skin of grape Saperavi, extraction with the ethanol : water mixture gives a slightly higher yield (~90 mg/g) than SFE (~80 mg/g).

#### Anthocyanins of Red Grape Saperavi

Anthocyanins attracted considerable attention because of their antioxidant activity. They protect against oxidative damage from radical reactive species by various mechanisms that ultimately result in the neutralization of free radicals. Owing to the anthocyanin's positive charge and aromatic hydroxyl groups (Figure 1), these compounds can easily donate protons to the free radicals (Huang et al., 2005).



**Figure 1.** Chemical structure of the major anthocyanins in red grape

The objective of the study was to develop and validate extraction procedures of anthocyanins from grape skin using the SFE, UAE, and magnetic stirring extraction (MSE) techniques.

The effect of the operating pressure and the temperature, extraction time, the flow rate of the SC-CO<sub>2</sub>, the sample size and the nature of solvent used was investigated to develop the sequential extraction procedure and establish their optimal parameters. The effect of pressure on the recovery of anthocyanins at a constant temperature is a function of amount of SC-CO<sub>2</sub>. The solubility of target analytes increased with increase of pressure. The content of total antocyanins decreases at the higher extraction temperature at a constant pressure, also the recovery of target compounds increases with increase of the extraction time at a constant temperature as well. The use of co-solvent – ethanol/water (50:50 v/v) at pH 4 increases the recovery of antocyanins.

The optimal parameters for SC-CO<sub>2</sub> extraction with co-solvents (acetone/water, ethanol/water, and ethyl acetate/ water acidified by hydrochloric acid) are: the extraction pressure – 200 atm, temperature – 50°C, the equilibrium extraction time – 180 min, the dynamic extraction time – 60 min, the flow rate of SC-CO<sub>2</sub> – 2 mL/min.

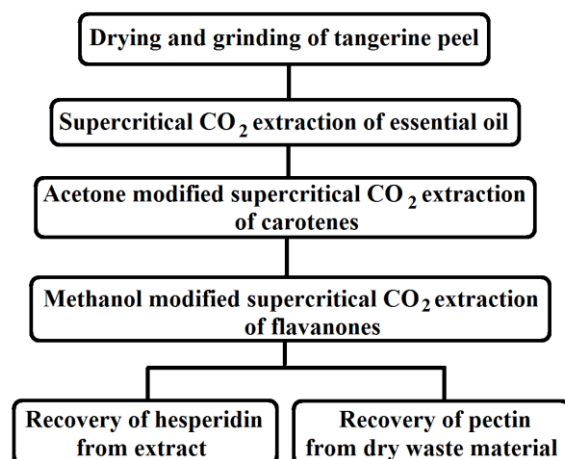
UAE and MSE result in exponential increase of antocyanins recovery, most of target products extracted during the <sup>2</sup>/<sub>3</sub> of total extraction time. It was observed that the influence of composition of solvents mixture (acetone/water, ethyl acetate/water and ethanol/ water, from 50 : 50 to 90 :10 v/v) was important. The optimal parameters for the *three-step extraction* UAE (37 kHz) and MSE procedures are as follows: the extraction time – 30 min, solvent mixtures – acetone/water (70 : 30 v/v) and ethanole/water (50 : 50 v/v) acidified by HCl, the temperature of UAE is 25 and 50 °C, respectively, and 60 °C for both mixtures at MSE.

The content of total anthocyanins in dried grape skin determined by developed HPLC analysis method (Rubashvili et al., 2019) varies from 2.5 to 52 µg/g for UAE, from 2.7 to 70 µg/g for SFE, and from 4.0 to 56 µg/g for MSE,. Used eco-friendly separation procedures provide high quality of target compounds and can be used to develop a standard technological process for utilization of agro-industrial waste material – grape skin.

#### Bioactive Compounds of Tangerine Peel

Essential oil (D-limonene), carotenes and flavanones were extracted from tangerine peel by increasing the polarity of the supercritical fluid using different co-solvents with the carbon dioxide in stepwise SC-CO<sub>2</sub>

extraction (Figure 2) followed by recovery of flavanone hesperidin ( $C_{28}H_{34}O_{15}$ ) from extract and vegetable agglutinate heteropolysaccharide pectin from dry residue (Tsitsagi et al., 2018).



**Figure 2.** The scheme of sequential SC stepwise processing of tangerine peel

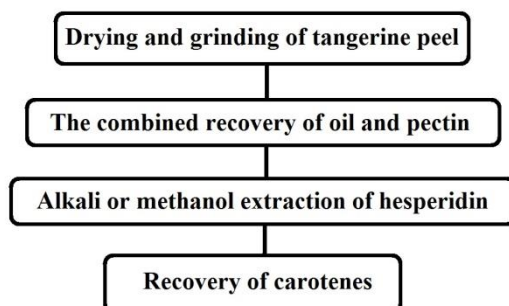
According to the GC-MS data, the yield of essential oil from dry tangerine peel at subcritical conditions is lowest, but most selective. As the temperature, pressure and extraction time increases, yield of oil increases, but selectivity drastically reduces. The essential oil found to extract carotenoids and imparting orange color to the extract. Optimal conditions for  $\beta$ -carotene free tangerine oil are 100 atm pressure and 35°C temperature at 15 min equilibrium time. The yield of the carotene free oil varies from 0.8%wt to 0.9%wt, the principal compound is D-limonene ( $C_{10}H_{16}$ ).

Optimal parameters of the  $\beta$ -carotene isolation at the second stage are: 1 hr equilibrium extraction at 150 atm, 40°C, followed by 1 hr dynamic extraction at a flow rate of 2.0 mL/min. Colorless residue indicated complete extraction of target product, the content of  $\beta$ -carotene varies from 0.445 to 3.972  $\mu$ g per 1 gram of the dried tangerine peel.

Optimal parameters for the SC- $CO_2$  extraction of hesperidin are: 1 hr at 250 atm pressure and 60°C temperature at static conditions, and 30 min of dynamic extraction at 2.0 mL/min flow rate. Extracts were collected in ice water pH-4.5, crude product was recrystallized in dimethyl sulfoxide, the yield of IR-identified hesperidin (melting point 252°C) – 1.6-1.8% wt.

Optimal operative conditions for recovery of pectin are pH=1.5, extraction time – 25 min, the temperature – 50°C. Purification of pectin was carried out via well known (Devi et al., 2014) alcohol- precipitation procedure (APP), and high quality product was obtained.

Alternative conventional low cost extraction procedure were used for extraction oil, pectin, hesperidin and carotene bioactive compounds from tangerine peel (Figure 3).



**Figure 3.** The scheme of sequential stepwise processing of tangerine peel

Unlike supercritical fluid extraction polarity of solvents decreases in sequential extraction of above mentioned. Pectin was extracted at the same time the hydrodistillation of oil from citrus peel took place. Citric acid was added for maintaining pH=1.5. Both alkali and methanol extraction method was used for recovery of hesperidin. Disadvantage of described method is low yield of carotenes in comparison to sequential supercritical  $CO_2$  extraction method.



### Major Carotenoids of Tomato and Citrus

The objective of the study was to develop sequential extraction procedures for the major carotenoids – beta-carotene and lycopene from tomato skin, tangerine and orange peels using the UAE and SFE techniques.

The effect of pressure on the extraction of carotenoids was investigated in a range of 100 – 250 atm at constant flow rate of SC-CO<sub>2</sub> (2 mL/min) and low temperature (40°C) selected to avoid thermal degradation of target analytes. The effect of temperature was studied up to 60°C, the effect of flow rate – from 1 to 5 mL/min, the effect of sample size in a range of 10 – 50 g per 0.5 L reactor vessel.

The optimal parameters for the *two-step extraction procedure* are: extraction step I – the sample size 40-45 g, the extraction pressure 150 atm, the extraction temperature 40°C, the dynamic extraction time 30 min, the flow rate of SC-CO<sub>2</sub> 2 mL/min; for the extraction step II the extraction pressure is 100 atm, the extraction temperature 40°C, the dynamic extraction time 60 min, the flow rate 2 mL/min, acetone (7%) was used as co-solvent. The obtained colorless residue indicates complete extraction of target compounds.

The results of UAE procedure indicate that the effects of the extraction time (30 – 90 min) and ultrasound power are significant for both analytes. As described above, the recovery of carotenoids increased exponentially in 5-10 minutes, then gradually in 25 minutes and then became constant. Thermal effect plays an important role, the high ultrasonic power (80 kHz) causes isomerization of thermally sensitive target substances. The optimal conditions for the three-step UAE procedure at 37 kHz are: extraction by acetone for 30 min (step I) and for 15 min (step II), extraction by ethyl acetate for 15 min (step III).

The organic extract solutions prepared using the developed supercritical fluid and sequential ultrasonic assisted extraction procedures and were analyzed using the validated HPLC method (Rubashvili et al., 2018), results are given in Table 4, the SC-CO<sub>2</sub> extraction has some advantage over UAE method.

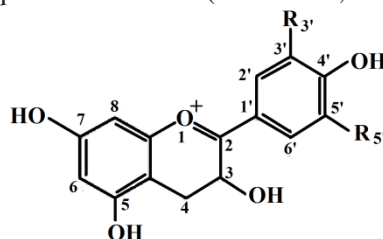
**Table 4.** The content of beta-carotene and lycopene in dried agro-industrial waste material

Material	Beta-carotene (mg/g)		Lycopene (mg/g)	
	UAE	SC-CO <sub>2</sub>	UAE	SC-CO <sub>2</sub>
Tomato skin	9.06 – 10.7	8.4 – 12.8	165 – 174	166 – 180
Tangerine peel	26.8 – 31.6	25.6 – 32.2	12.2 – 16.0	11.1 – 17.9
Orange peel	42.0 – 54.6	41.7 – 59.2	8.4 – 9.9	9.6 – 10.6

### Quercetin and Colorants from Red Onion Skin

According to literary data, maximum yield of flavonol quercetin (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) from onion skin, 0.024 g per kg of dry raw material, was obtained by SC-CO<sub>2</sub> using ethanol as a co-solvent at 40-50°C and 180 atm (Martino and Guyer, 2007), MAE and solid-phase separation (Kumar et al., 2014) give ~0.021 g/kg.

UAE was carried out using acetone, ethyl acetate, ethanol, and methanol as a solvent, the acetone was found to be the best solvent for the extraction of quercetin from the onion skin providing high yield (up to 0.030 g/kg) and best selectivity of target product. Eco-friendly SC-CO<sub>2</sub> using 6-7% of acetone as a modifier at 40-50°C and 140 – 150 atm gave a yield of 0.028 g/kg. SC-CO<sub>2</sub> modified with ethanol/acetic acid (80:1) at a pressure of 300 atm and temperature 80°C was used for extraction of anthocyanidin (Figure 4) colorants, listed in the Table 5. Total anthocyanins amount in onion skin quantified by Folin-Ciocalteu's method is in a range of 85 – 107 mg/g, in accordance with published results (Prior et al., 2005).



**Figure 4.** Basic structure of extracted anthocyanidins

**Table 5.** Anthocyanidins extracted from the red onion skin

Anthocyanin	Color	R <sup>3'</sup>	R <sup>5'</sup>
Cyanidin	Violet (at pH 7-8)	-OH	-H
Delphinidin	Blue-red	-OH	-OH
Pelargonidin	Orange	-H	-H
Malvidin	Blue	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Peonidin	Purplish-red	-OCH <sub>3</sub>	-H

Petunidin	Dark red	-OH	-OCH <sub>3</sub>
-----------	----------	-----	-------------------

#### Recovery of phenolics, lipophilic triterpenoids and pectin from apple pomace

Sequential ultrasonic-assisted solvent extraction method was used for recovery of phenolic compounds, triterpenoids (ursolic and oleanolic acids-predominant triterpenoids of apple peel) and pectin from apple pomace.

Aceton was used as a solvent for recovery of phenolic compounds during ultrasonic – assisted solvent extraction. Highly polar and non-polar solvents were not effective in extracting flavonols, Aceton is best choice because it's most selective and provides high yield of product. Optimal conditions are: the ratio of liquid/material 10:1, ambient temperature, 22 kHz, 1h extraction time. Both methanol and ethanol result high yield of ursolic and oleanolic acids, but methanol is more toxic solvent. Therefore, 96% ethanol was selected as an extraction solvent. Optimal conditions are: the ratio of liquid/material 10:1, temperature 40-45°C, 22 kHz, 1h extraction time. Optimal operative conditions for recovery of pectin are pH=1.5, extraction time – 1h, the temperature – 80°C. Production of these highly bioactive compounds from apple pomace is considered the most reasonable way of utilization.

#### REFERENCES

- Devi WE, Shukla RN, Abraham A, Jarpula S, Kaushik U 2014. Optimized extraction condition and characterization of pectin from orange peel. *International Journal of Research in Engineering and Advanced Technology*, 2(2): 1-9.
- Huang D, Ou B, Prior RL 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6): 1841-1856.
- Iriti M, Vitalini S 2011. Chemical diversity of grape products, a complex blend of bioactive secondary metabolites. *Natural Products Journal*, 1(1): 71-74.
- Kumar B, Smita K, Kumar B, Cumbal L, Rosero G 2014. Microwave-assisted extraction and solid-phase separation of quercetin from solid onion (*Allium cepa* L.). *Separation Science and Technology*, 49(16): 2502-2509.
- Kvartskhava G, Tsitsagi M, Chkhaidze M, Khachidze M, Jinikashvili I 2010. Utilization of winery wastes by using supercritical CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, chemical series*, 36(2): 149-152.
- Martino KG, Guyer D 2007. Supercritical fluid extraction of quercetin from onion skins. *Journal of Food Process Engineering*, 27(1): 7-28.
- Mohd Y 2017. Agro-industrial waste materials and their recycled value-added applications: review. In: Martínez LMT (ed). *Handbook of ecomaterials*. Springer International Publishing, pp. 1-11.
- Prior R, Wu X, Schaich K 2005. *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.
- Rubashvili I, Tsitsagi M, Ebralidze K, Tsitsishvili V, Eprikashvili L, Chkhaidze M, Zautashvili M 2018. Extraction and analysis of the major carotenoids of agro-industrial waste materials using sequential extraction techniques and high performance liquid chromatography. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 13(3, em06): 1-14.
- Rubashvili I, Tsitsagi M, Tsitsishvili V, Kordzakhia T, Ebralidze K, Buzariashvili M, Khachidze M 2019. Sequential extraction and HPLC analysis of total anthocyanins of grape skin. *The Chemist, Journal of the American Institute of Chemists*, 91(2): 33-41.
- Tsitsagi M, Chkhaidze M, Ebralidze K, Rubashvili I, Tsitsishvili V 2018. Sequential extraction of bioactive compounds from tangerine (*Citrus Unshiu*) peel. *Annals of Agrarian Science*, 16(2): 236-241..
- Tsitsagi M, Chkhaidze M, Khachidze M, Buzariashvili M, Ebralidze K, Ramishvili Ts, Tsitsishvili V 2015. Sequential supercritical fluid extraction of essential oil, carotenoids and bioflavonoids from tangerine (*Citrus Unshiu*) peel. *Proceedings of the Georgian National Academy of Sciences, chemical series*, 41(3): 248-250.
- Tsitsishvili V, Tsitsagi M, Rubashvili I, Ebralidze K 2018. Extraction of valuable products from agro-industrial waste materials. Lambert Academic Publishing, 90 pp.

## Effectiveness prebiotic and synbiotic from composite flour (*Canna indica* and *Spirulina platensis*)

Nita Noriko\*<sup>1</sup>, Alina Primasari<sup>2</sup>, Sheila Syaifiyah Istiqo<sup>3</sup>

<sup>1 2 3</sup> Universitas Al Azhar Indonesia (UAI) . Jln. Kompleks Mesjid Agung Al Azhar Jln. Sisingamangaraja, Kebayoran Baru Jakarta Indonesia

### Abstract

Prebiotic can stimulate growth of non pathogenic microflora in intestinal such as Bifidiobacteria and Lactobacillus with the result that prevent benefit of health. Sources of prebiotic that contain oligosaccharide were *Canna indica* and *Spirulina platensis*. Information about the effectiveness of *C. indica* and *S. platensis* as prebiotic and component of synbiotic based on in vivo treatment were minimal. Aims of the research were to know the effect of flour composite from *C. indica* and *S. platensis* (Cannalina) as prebiotic and synbiotic on ability to suppress total of microbe and support the growth and hold *Lactobacillus* (LAB) in intestine male *Sprague dawley*. The methodology was experimental design which divided for 4 groups for treatment. There were control, prebiotic, probiotic and sinbiotic groups. The division of control group which was mice fed up standard ration and 1 ml NaCl physiology. The prebiotic groups fed up pellet from *Cannalina* flour and 1 NaCl physiology, probiotic groups fed up pellet standard and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu / ml in 1 ml NaCl and synbiotic group fed up *Cannalina* formed as the pellets and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu/ml in 1 ml NaCl. The number of *S. dawley* in each groups were six mice. Bacteria from mice feces were isolated and analyzed to find the total of microbes and number of LAB. The results from in vivo treatment showed the highest total of microbe was found in control. probiotic, prebiotic and syntiotic have ability stimulated growth and hold of LAB in intestine compared with control in 10 days treatment and 5 days after treatment.. On 5 days after treatment synbiotic group was highest hold log 10,59 cfu/ml of LAB, and probiotic group was the lowest total of mecrobe log 9,21 cfu/ml.

**Keywords:** *Cannalina*, *in vivo*, *pebiotics*, *probiotics*, *synbiotic*,

### INTRODUCTION

Diabetes is one of the most metabolic disorder metabolic and significant decreasing health quality. Prevalence in low and middle income country in 2013 indicated from 130 country totally 382 million with over the next 22 years old and in 2035 was predicted 592 million. Indonesia people with 20-79 years old had diabetes total 14,1 million and 2035 included in top 10 countries for high prevalence (Guariguata *et al*, 2014). Probiotic and prebiotic have anti diabetic effect that improve insulin sensitivity. The other effect make the microbial community in the gut ecosystem and reducing intestinal endotoxin concentration (Kim *et al*, 2014). Lactobacillus in yogurt from goat has potency as anti diabetic food throught the mechanisme effect on bioactive peptide found to able to inhibit the activity  $\alpha$  glucosidase (Lacroix & Li Chan, 2013). Combination probiotic supplemented with rosella extraction had the highest ant diabetic effect with 36.7% inhibition of  $\alpha$  glycosidase before 15 days of cold storage (Wihansyah, *et al*). Flavonoid containing in rosella has link to  $\alpha$  glucosidase inhibitor activities (Zeng *et al* 2016). *C. indica* is one of the plants that produce tubers and flavonoid containing, and invitro treatment combination with *S. platensis* stimulate growth of *Lactobacillus rhamnosus*.

### MATERIAL AND METHODE

Research design study used an experimental method with a completely randomized design (CRD) using 24 mice which divided into 4 groups. The division of control group which fed up standard ration and 1 ml NaCl physiology, prebiotic groups fed up pellet *Cannalina* and 1 NaCl physiology, probiotic groups fed up pellet standard and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu / ml in 1 ml NaCl and synbiotic group fed up *Cannalina* pellets and LAB cultured  $6.5 \times 10^8$  log cfu/ml in 1 ml NaCl. The research was conducted in Laboratory of microbiology and animal Laboratory Universitas Al Azhar Indonesia from December 2017 to June 2018. White *C. indica* obtained from UAI garden. The LAB

cultured obtained from the Microbiology Laboratory, Bogor Agricultural University. The mice for the in vivo experiment using a 2-month-old male *S. dawley* strain of obtained from the Animal Laboratory of the Food and Drug Supervisory Agency. Media were used aquadest, 70% ethanol, Lactose Broth (LB) (HIMEDIA), MRS (de Mann Rogosa) broth (HIMEDIA), MRS agar (HIMEDIA), 0.85% NaCl, and McFarland solution.

### Procedure of the research

Ethical approval of test animals, material preparation, concert of Cannalina flour to Cannalina pellet, potential testing of prognostic in vivo, microbiological analysis (AOAC 2005). The Animal Ethics Approval got from the Health Research Ethics Committee of the Universitas Pembangunan Nasional Veterans Jakarta which was reviewed by Prof. Dr. M. Guritno Suryokusumo, Dr., SMHS, DEA with no B / 1413 / V / 2018 / KEPK (Appendix 1).

Preparation the cannalina flour was started by cleaned and washed the white *C. indica* tuber using running water and then peeling and slicing  $\pm$  1 mm thickness and were dried in an oven at 55<sup>0</sup> C for 20 hours. The sliced of dry *C. indica* tuber was blended. Making Cannalina pellet was carried out by *C. indica* flour mixed with *S. platensis* powder with a ratio of 10: 1, mixed with corn oil, sacatonic, tropicana slim salt and sweetener with a ratio of 97%: 1.2%: 0, 1%: 0.9%: 0.8%. All ingredients were stirred and add distilled water until the dough and could be formed according to the standard ration form (pellet) and put in the oven at 70 ° C for 2 hours. The standard ration used was a standard ration with the brand "HATORY", HATORY has the following composition:

**Table 1. Composition of Hatory brand feeds**

No	Composition	Percentage
1	Protein	20.5 %
2	Fat	9.6 %
3	Minerals	15.9 %
4	Rough fiber	20 %
5	Vitamin	20 %
6	Water	11 %
7	Salt	0.7 %

As supporting information chemical analysis used proximate test included analysis of water and ash content by the gravimetric method, protein content used the Kjeldahl method, lipid content used Soxhlet method, and analysis of carbohydrate levels by the method of difference. Refresher Culture of LAB used preserved LAB culture 1 ml was added to 9 ml of MRSB and was incubated at 37 ° C for 2 days for the culture refreshment period. After 2 days the refreshed LAB can be used immediately. BAL culture is refreshed then dilution is done and compared to McFarland's solution using a Spectrophotometer to obtain a cell count of 6.5 x 10<sup>8</sup> log cfu / ml. The McFarland solution used in this study was a McFarland solution with the composition 0.2 mL 1.0% Barium Chloride (BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) in 9.8 mL 1.0% Sulfuric Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Furthermore the culture was centrifuged to obtain sediment. The sediment was dissolved with 1 ml of physiological solution of NaCl. LAB cultures will be given to groups of probiotic and synbiotic .. The research were carried out in 3 stage namely the adaptation period for 10 days, the treatment period 10 days and the post-treatment period for 5 days. Rations and drinking water are given for 25 days in ad libitum. The adaptation period only providing 20 gram and 50 ml drinking water adlibitum once a day.. Cannalina pellets were given to every rat in the prebiotic and sinbiotic groups every day as much as 20 grams for 10 days of treatment. The post-treatment period was carried out for 5 days by stopping administration rats were only given standard rations.

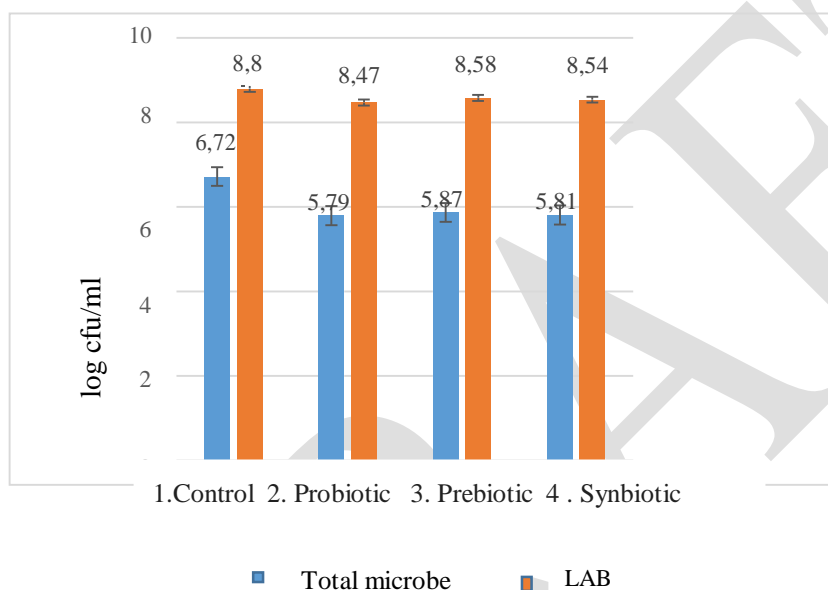
Sample preparation was found from 0.5 gram fecal samples diluted with Lactose Broth (LB) media as much as 4.5 ml and crushed with Mortar. Dilution 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> dilution was made until the appropriate dilution rate with expected results 30-300 colonies. It was obtained and in 1 ml sample into 9 ml of physiological solution of NaCl . Then the sample suspension was used to analyze the total microbes and the amount of LAB. The feces from all groups were taken aseptically on 0, 1, 5, 10 days in treatments period and the fifth after treatment. Some feces will come out after the tail section and stored in sterile aluminium foil. Microbiology analysis based on AOAC. Total Microbes

was found by 1 ml aseptically and poured into 3 sterile cups (triplo) added PCA medium and shaken to be homogeneous, and then incubated at 37 ° C for 48 hours. Calculation of the amount of LAB was carried out by the pouring method from the appropriate dilution level was piped 1 ml and poured into 3 petri dishes (Triplo)). After that, MRSA media was poured and shaken to be homogeneous and incubated at 37 ° C for 48 hours. The growing bacterial colonies were counted as LAB with characteristics of having milky white colonies but not slimy. Body weight of mice used in the study will be taken on days 0,10 and 15. Colony counts Total microbes, amount of LAB, and body weight obtained will be analyzed to know distribution and homogeneity and continue to parametric analysis using one way ANOVA or non parametric.

## RESULTS

### Total of microbe and LAB before treatment

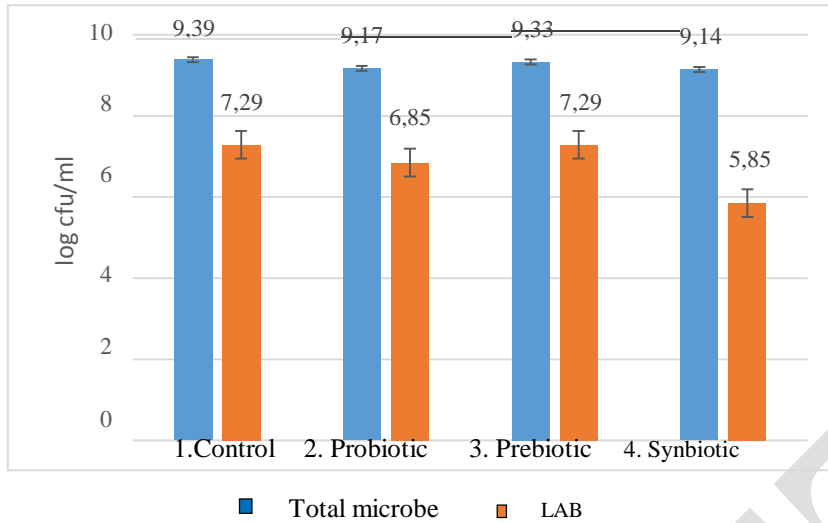
Total of microbe on fecal at 10<sup>th</sup> days adaptation (0 day) phase day for all groups based on Kruskal-Wallis (KS) analysis were not significantly different of 0.82 at P<0.05 in average of 6.05 log cfu / mL. The amount of LAB based on ANOVA analysis was not significantly different 0.37 at P<0.05. The average number of colonies issued was 8.59 log cfu/ml ( Graph. 1)



Graph 1. Total Microbes and LAB in 0 day in fecal *S.dawley*

### Total of microbe and LAB in 1<sup>th</sup> day treatment

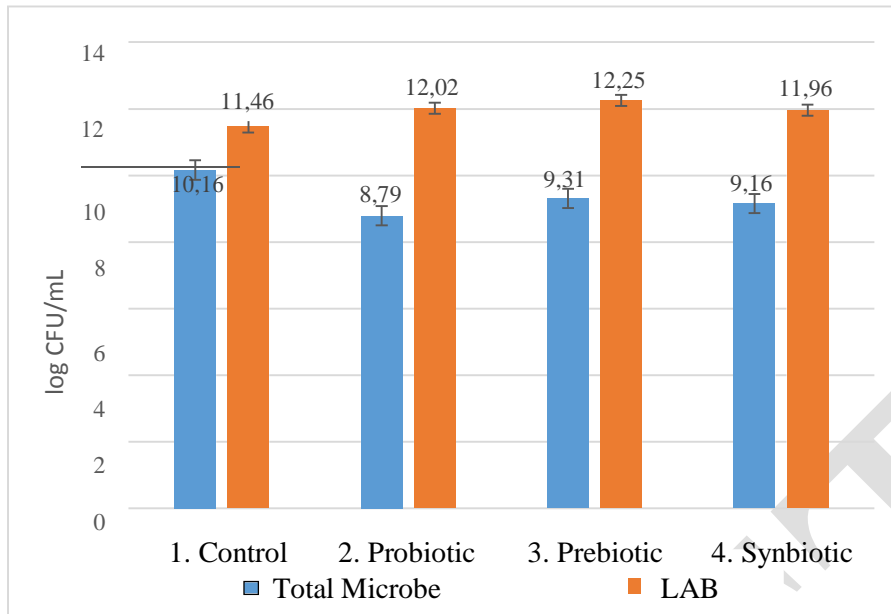
The results of the KS analysis of total microbe all groups after treatment showed significant difference 0.033 at P<0.05. The highest microbial total in fecal was shown by control group and prebiotic group 7.29 Log cfu/mL. The second group was given probiotic 6.85 Log cfu / mL and the lowest in the group synbiotic which was 5.85 Log cfu/mL. The results of KS analysis of the amount of LAB fecal showed no significant difference 0.68 at P<0.05 in all groups with an average LAB colony released at 9.027 Log cfu / mL (Graph 2).



Graph 2. Total Microbes and LAB in 1<sup>st</sup> day treatment in fecal *S. dawley*

### Total of microbe and LAB in 5<sup>th</sup> day treatment

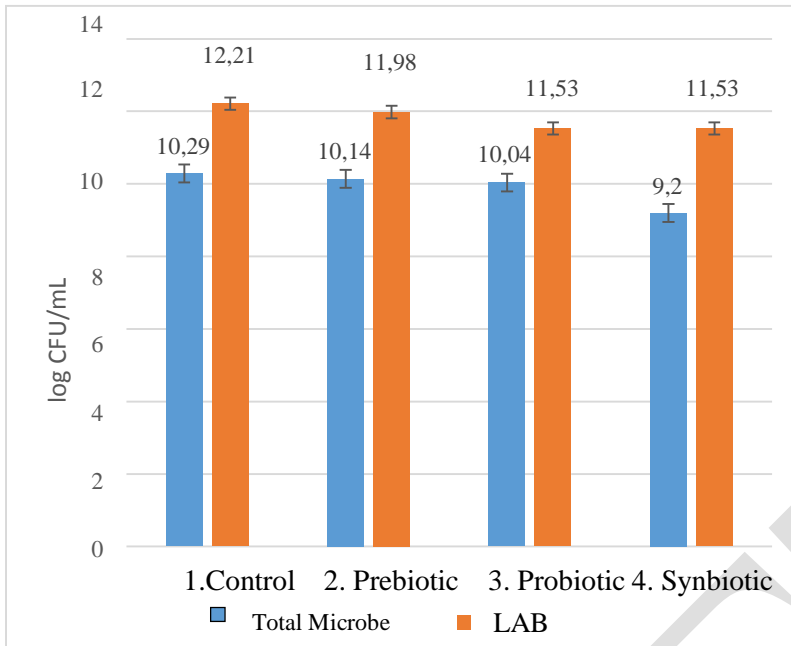
The results of ANOVA analysis on 5<sup>th</sup> day showed that there were significant differences in total of microbe between treatment groups 1, 2, 3 and 4, however in groups 3 and 4 did not show significant differences with a significance value of 0,168 with  $P < 0.05$ . Number of LAB in the KS test showed no a significant difference 0.33 with  $P < 0.05$  (Graph. 3).



Graph 3. Total Microbes and LAB in 5<sup>st</sup> day treatment in fecal *S. dawley*

#### **Total of microbe and LAB in 10<sup>th</sup> day treatment**

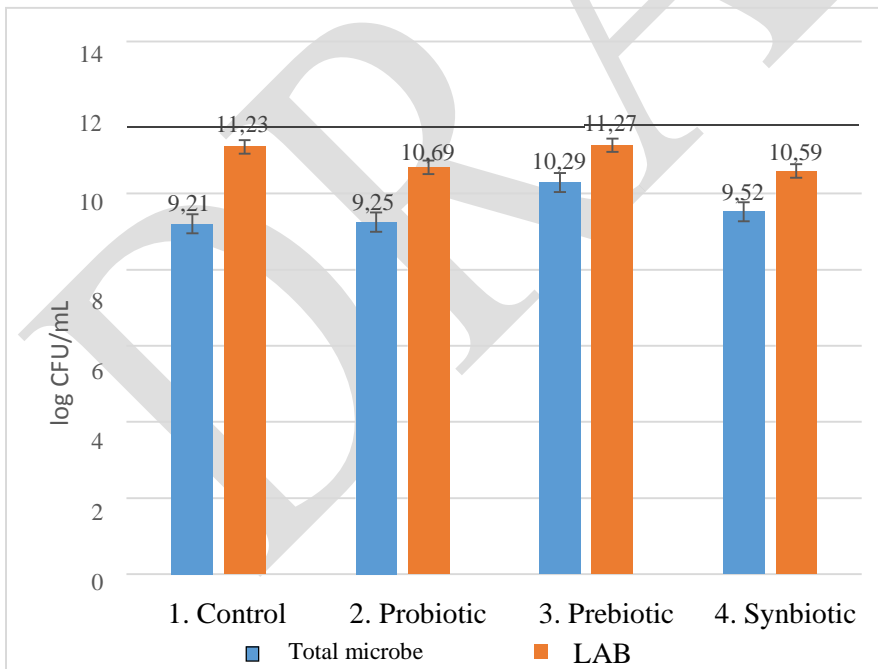
On 10<sup>th</sup> day of the total of microbe based on ANOVA test showed significant differences 0.00 at  $p < 0.05$ . On the 11<sup>th</sup> day the results of the KS test for the number of LAB showed significant differences in each treatment group with a significance value of 0.029 with  $p < 0.05$ . The highest number of LAB was found from the 1<sup>st</sup> group with colonies of 12.21 Log cfu / mL. Then the second group with the number of colonies of 11.98 Log cfu / mL. Meanwhile groups 3 and 4 had the lowest number of LAB with colonies amounting to 11.53 Logs cfu / mL (Graph 4).



Graph 4. Total Microbes and LAB in 10<sup>th</sup> day treatment of mice in fecal *S. dawley*

#### Total of Microbe and LAB in 5<sup>th</sup> day post treatment

The KS test results showed no significance number of 0.83 at  $p < 0.05$ . This shows that from day 0 to day 15 the total number of microbes similar. The results of the LAB showed significant differences 0.050 at  $p < 0.05$ , it mean the synbiotic treatment has ability to hold LAB (Graph 5).

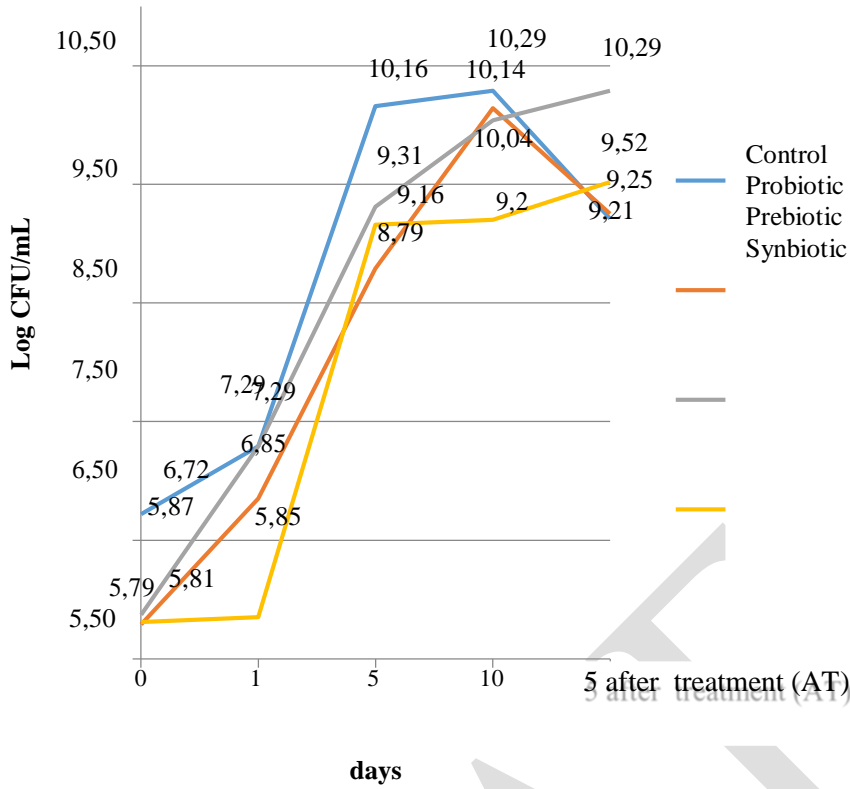


Graph 5. Total Microbes and LAB in 5<sup>th</sup> day posttreatment in fecal *S. dawley*

#### Analysis of total of microbe dan LAB

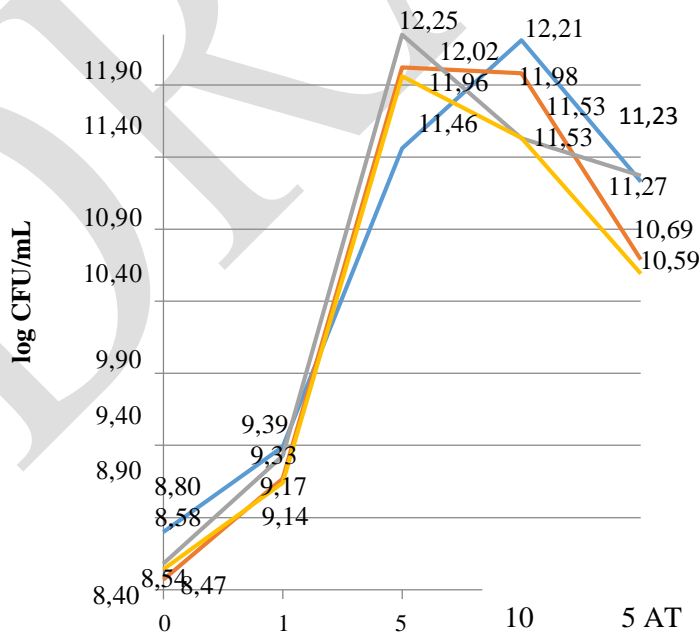
Trend of total microbe in 1 until 10 days treatment showed increasing, but in control group was the highest. In 1 and 5 days after treatment probiotic group is the lowest total of microbe (Graph 6)..





Graph 6. Total microbe control and treatment groups in 0 until 5 days after treatment

Total LAB in 10 days treatment and 5 days control groups was the highest but synbiotic group was lowest and followed in probiotic (Graph 7).



Graph 7. BAL control and treatment groups in 0 until 5 days after treatment

## DISCUSSION

Total of microbe and LAB isolation from *S.dawley* fecal on day 0 for all groups were not significantly different. This indicated health conditions the digestive animal was similar with the mean total microbe released 6.05 log cfu / mL and LAB 8.59 log cfu/mL. The highest microbe total in 1 day treatment was occurred in control group followed by the prebiotic, probiotic and synbiotic groups. The second group was given probiotic 6.85 Log cfu / mL and the lowest in the group synbiotic which was 5.85 Log cfu/mL. LAB was the highest total in control group. It means that the intestinum in control did not effective to retain LAB and more exited from digestive system. The data indicated probiotic, prebiotic and synbiotic effective to suppress pathogen microbe by stimulated growth of LAB. The function of LAB in digestives attack of pathogenic microbe by secreted ant microbe substances such as lactic

acid, peroxide, and bacteriocin (Sankarankutty and Palav 2016). According to Martin *et al.* (2013) prebiotics provide competitive advantages to specific native micro flora in the digestive tract such as LAB and Bifidobacteria which are the group of probiotics that can reduce pathogenic bacteria. When the probiotic bacteria fermentation process will produce active compounds such as lactic acid and bacteriocin (Syukur, et al, 2014). Bactericin protein substance has antimicrobial properties such as protease K and trypsin (Mukherjee, *et al* 2019). The other antimicrobial components are as diacetyl and hydrogen peroxide (Omemu, 2011). The highest LAB in prebiotic group was influenced by Cannalina rations which has a higher carbohydrate containing rather than the standard ration. C flour carbohydrate containing in cannalina 75,66% and standart ration 58.86%. LAB requires easily soluble carbohydrates to meet energy by broken down by the amylase enzyme (Paul, 2016).

Analysis on 5<sup>th</sup> day showed total microbe in control group is the highest and significant differences with 2, 3 and 4 group. It means that probiotic, prebiotic and synbiotic effective supress pathogen microbe by stimulate growth of LAB. The results of the analysis of the number of LAB on the 5<sup>th</sup> day showed a significant difference. The highest number of LAB was in the prebiotic group with the number of colonies of 12.25 Log cfu / mL. Followed by probiotic group 12.02 Log cfu / mL and synbiotic . Meanwhile the lowest number of LAB was in control group of 11.46 Log cfu / mL colony and stimulate growth of LAB. It was caused the mice decreasing of eating activity on the fifth day of treatment day due to saturation in consuming rations containing probiotic, prebiotic and synbiotic. Decreasing of eat activity influenced decreasing the amount of LAB in the digestive system in prebiotic and probiotic and synbiotic group. After 5 days the rats in treatment groups adapted with their ration.

On the 10<sup>th</sup> day the lowest total number of microbes was found in the synbiotic group group with colonies of 9.70 Log CFU / mL. This shows that the standard ration ability to suppress the number of microbes lower compared with the other groups . The highest number of LAB was found also in the control with colonies of 12.21 Log cfu / mL. Then the probiotic group with the number of colonies of 11.98 Log cfu / mL. Meanwhile groups prebiotic and synbiotic LAB with colonies 11.53 Logs cfu / mL. Both of groups received Cannalina pellet commonly given effect to attach LAB on intestinal epithelial cells and forming colonization of the the number of LAB (Brito *et al*, 2012).

On the 15<sup>th</sup> day (post treatment) the four groups showed total microbe were no significant difference. After 10 days treatment the consumption of mice only standard rations. The results of the KS test for the number of LAB showed a significance value of 0.038 with  $P < 0.05$ . the lowest number of LAB is in the synbiotic group with a colony number of 10.59 log cfu / mL

## CONCLUSIONS

LAB as probiotic, prebiotic from Cannalina flour and syntiotic from Cannalina flour and Lactobacillus have ability to suppress microbe specially pathogenic microbe. The others effect stimulate and hold LAB in intestine in 10 days treatment and 5 days after treatment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like gratefully acknowledge and the kind support of Research and Public Service Aboard and Biology Department University of Al Azhar Indonesia and Indonesia Minister of Research and Higher Education

## REFERENCES

- Brito, B., Diaz, P., Quezada, M., Liorente, G (2012) Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr metab* 61: 160-174
- Guariguata, L. Whiting, D.R. Hambleton, I, Beagley, J, Linnenkamp, U., Shaw, J.E. global estimate of diabetes prevalence and projection for 2035 *Diabetes* (2014). *Research and clinical Practice* 103 : 137-149
- Kim Y.A., Keogh, J.B., Clifton, P.M (2018). Probiotic, prebiotic, synbiotic and insulin sensitivity. *Nutrition Research Review.*, 31: 35-51
- Lacroix, I.M. & E.C.Y. Li-Chan (2013) Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsintreated whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* 61:7500–7506. <https://doi.org/10.1021/jf401000s>
- Martin, R., Miquel, S., Ulmer, J., Kechau, N, Lengella, P, and Humaran, L., B (2013) Role of commensal and probiotic bacteria in human health: a focus on inflammatory bowel disease *Microbe cell fact* 12 : 71
- Mukherjee, A., Manerjee, G. Mukherjee. P. Ray, A.K, Chandra, G., Ghost, K (2019) Antibacterial substances produced by pathogen inhibitory gut bacteria in *Labeo rohita*: Psysico-chemical characterization purification and identification through MALDI-TOF mass spectrometry. *Microbial Pathogenesis* volume 130: 146-155
- Omemu, Mobolaji, A., Faniran, Wuraola (2011) Assessment the antimicrobial of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize product- ogi and kunnu-zaki. *Malaysia Journal of Microbiology*, Vol 7(3) : 124-128
- Paul, D (2016). Microorganisms and alfa amylase : a concise review. *Innovare Journal of Science* vol 4 issue 4
- Sankarankutty & Palav (2016) Research and Reviews: *Journal of food and diary Technology*. Isolation of lactic acid Bacteria (LAB) producing Bacteriocin from Piyush and Aagal (Kokum Concentrate). *RRJFPDT* Vol 4 issue 2
- Syukur, S., Fachrial., and Jamsari (2014) Isolation, antibicrobial activity and protein bacteriocin Characterization of lactic acid bacterial isolated from dadih in solok, west Sumatera, Indonesia. *Research Journal of Pharmaceurical, Biological and Chemical Sciences*:1096-1104
- Wihansah, R.R.S., Arief, I., Bara, I (2018) Anti-diabetic Potency and characteristics of probiotic goat Lik yogurt supplemented with Roselle Extract during Cold storage *Tropical Science Journal* 41(30):191-199
- Zeng, Z., J. Luo, F., Zuo, Zhang, H. Ma and S. Chen (2016) Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase iv and a-glucosidase inhibitory activity. *J. Funct. Food.* 20: 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.030>

## Performance evaluation on vanadium transport through functionalized polymer membrane by Tris 2-aminoethyl amine as a carrier

Imane Touarssi<sup>1\*</sup>, Y. Chaouqi<sup>1</sup>, I. Mourtah<sup>1</sup>, T.Eljaddi<sup>1</sup>, N.Sefiani<sup>1</sup>, L. Lebrun<sup>2</sup>, M. Hlaibi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Génie des Matériaux pour Environnement et Valorisation (GeMEV), Equipe I3MP, Faculté des Sciences Aïn Chock, B.P. 5366, Maârif, Casablanca, Maroc.

<sup>2</sup> Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS), UMR 6270 du CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France.

PPR2 and ERANETMED3-166 Projects (MESRSFC/CNRST)

\*Corresponding author e-mail: touarssi.imane@gmail.com

### Abstract

Over the years, the development of mechanically stable synthetic or natural polymeric membranes having advanced or novel functions in the various membrane separation processes for liquid and gaseous mixtures has increased significantly. One of the important techniques explored is related to the affinity membranes, by the introduction of extractive agents directly or by covalent grafting, for the extraction of rare metals such as vanadium from industries acid leaching solution, in order to solve the problem of the depletion of the main natural resources and the huge consumption of vanadium in different industries. The present study aimed to describe the phenomenon of facilitated extraction of vanadium ions ( $\text{VO}_2^+$ ); through a functionalized polymer membrane (FPM) and to evaluate its performance. This membrane based on polysulfone (PSU) and Tris 2-aminoethyl amine (TREN) as an extractive agent has been characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and Energy-dispersive X-ray spectroscopy. The performance of the elaborated membrane was quantified by determining the macroscopic parameters; permeabilities  $P$  and initial fluxes  $J_0$ . The diffusion of  $\text{VO}_2^+$  ions substrate through the organic phase as a function of formation and dissociation reactions of the unstable entity ( $\text{VO}_2^+\text{-TREN}$ ) was determined by calculating microscopic parameters; apparent diffusion coefficient  $D^*$  and association constant  $K_{ass}$ . In order to explain the obtained results for the studied processes, thermodynamic and activation parameters (activation energy  $E_a$ , activation enthalpy  $\Delta H^\ddagger$ , activation entropy  $\Delta S^\ddagger$  and thermodynamic enthalpy  $\Delta H_{th}$ ) have been evaluated, the analysis of their values makes it possible to identify which of the *kinetic or energetic aspect* controls the mechanism of oriented processes performed through the elaborate membrane.

**Keywords:** Vanadium, functionalized polymer membrane, Tris 2-aminoethyl amine, microscopic and macroscopic parameters, Activation parameters.

### 1. INTRODUCTION

Recently, the toxicity of vanadium ions with high concentrations in the ecologic system presents a danger to man and animal's health and environment, their detection and disposal in industrial effluents is particularly relevant to pollution and the nutrition field.

Although many remediation techniques have been developed, such as microbial transformation, adsorption, solvent extraction, etc., which consume too much of the chemicals and energy and / or require additional treatment to eliminate unwanted by-products. Membrane technologies with the facilitated extraction processes, present interesting qualities, including simplicity of manufacture and process, modular design, compactness and economic which make the membranes more convenience for most industrial purpose.

Two main technologies were involved in facilitated extraction processes: supported liquid membranes (SLMs) and inclusion polymer membranes (PIMs) (M. Shamsipur et al. (2003), A. Zaghbani et al. (2005), C. Fontas (2005). Recently, a new approach consists of the introduction of functional groups as  $-\text{CONH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , etc into membranes. Functionalized membrane based on suitable solid supports containing a specific carrier, is capable of extracting species through the membrane phase and has shown a substantial interest in research.

The objective of the present work was to synthesize and characterize a polymer membrane based on the polysulfone support chemically functionalized with the TREN agent and which was adopted to carry out the facilitated extraction oriented processes of  $\text{VO}_2^+$  ions, according to the flat sheet mode. The influence of factors such as substrate initial concentration, and temperature, that affect the diffusion of metal ions through the membrane phase, has been studied. Different parameters, macroscopic, Permeability ( $P$ ) and initial Flux ( $J_0$ ), microscopic, apparent diffusion coefficient ( $D^*$ ) and association constant ( $K_{ass}$ ), activation and thermodynamic  $E_a$ ,  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  and  $\Delta H_{th}$ , were determined in order to quantify the studied processes, the membrane performance,

and to elucidate the energetic and kinetic aspects that control the mechanisms of the oriented processes carried out..

## 2. METHODOLOGY

### 1.1 Materials

The used polymeric support is “polysulfone UDEL 1700” (M<sub>w</sub>= 35,000) provides by Solvay Advanced Polymer, Polyvinylpyrrolidone (PVP) (MW:40000) and N,N-Dimethylformamide (DMF) from Sigma-aldrich were used as additive and solvent respectively, for membrane preparation. The vanadium solution is obtained from Sigma-Aldrich by hydrolysis of ammonium metavanadate (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>). The concentrated mineral acids are hydrochloric acid HCl (37%) and nitric acid HNO<sub>3</sub> (69%) all of the analytical grades and were purchased from Aldrich.

### 1.2 Synthesis of the PSU/PVP/TREN membrane.

Functionalized polymer membranes are developed using the Loeb-Sourirajan technique (B. Chakrabarty et al. (2008)), using 20 wt % polysulfone Udel® polymer in DMF under vigorous agitation during 24 hours at 25°C, an appropriate quantity of PVP (5%) was introduced as copolymer. Subsequently, a well-defined quantity of extractive agent was added to the polymer solution, after intense agitation during several hours until the total dissolution of extractive agent (TREN). The resulting polymer-extractive agent solution was spread on a glass plate. The membrane is obtained by immersion of the glass plate in a water bath maintained at room temperature (phase inversion method), the obtained membrane was thoroughly washed and stored with distilled water.

### 1.3 Membrane characterization

In order to analyze the relation between the composition and the morphology of the membrane and its behavior and its extraction capacity of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions substrate, their characterization was carried out by different non destructive techniques, scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (FEI-FEG 450), The attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) by THERMO SCIENTIFIC, The measurements were made in a wavelength range of 650 to 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 1.4 Facilitated extraction process experiments

The extraction experiments were carried out using an extraction cell with two compartments. The membrane (dia. = 5.5 cm) was placed between two glass compartments, having 150 mL volume in each one. The device has been sealed and tightens vigorously. The feed phase compartment was filled with a solution containing a dominated form VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions obtained by dissolving NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in concentrated solution of HNO<sub>3</sub> acid. The second compartment (receiving phase) was filled with HCl solution 1M. The feed and receiving phases were continually stirred with a magnetic stirrer to reduce the concentration gradient at the membrane-solution interfaces. The extraction process of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions was monitored as a function of time at different temperatures (298, 303 and 308 K) by taking a sample from receiving phase and analyzing it with UV-VIS spectroscopy at 250 nm

Kinetic and thermodynamic models (T. Eljaddi et al. (2015)) based on Fick's laws, a saturation law of the extractive agent by the substrate and the interaction of the substrate with the extractive agent during its diffusion through the membrane phase; make it possible to establish the following relations:

$$J = P \Delta C / E \quad (1)$$

If the substrate concentration **Cr** in the receiving phase at each instant is known. The concentration in the source phase is **Cs = C<sub>0</sub> - Cr** (thin membrane), and the difference in concentration between two phases is:

$$\Delta C = C_s - C_r = C_s = C_0 - 2 C_r \quad (2)$$

On the other hand, the expression of the diffusion rate of the substrate as a function of the flux through the membrane is written:

$$dC_r/dt = J \times S / V \quad (3)$$

S: active surface of the membrane and V: volume of the receiving phase. The combination of equations (1), (2) and (3) and after integration, allows writing the following kinetic equation (4):

$$P \times (t - t_0) = (E \times V/S) [1/2 \text{Ln} (C_0 / C_0 - 2C_r)] \quad (4)$$

Macroscopic and microscopic parameters of the extraction oriented processes of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions from feed to receiving compartments at a given time was calculated by application of kinetic and thermodynamic models according to the equations (5),(6),(7), and (8):

$$P = a \times V \times E / 2S \quad (5)$$

$$J_0 = P C_0 / E \quad (6)$$

**P** is the permeability, **a**: is the slope of the straight segment obtained by study and verification of kinetic function  $-\text{Ln} (C_0 - 2C_r) = f(t)$  **S**: is membrane active area, **V**: is receiving phase volume, **E**: is membrane thickness and **J<sub>0</sub>**: initial flux.

$$K_{ass} = (OO) / p \quad (7)$$

$$D^* = E / (OO) \times [T]_0 \quad (8)$$

$p$ : the slope and  $(OO)$ : the intercept of the line segment obtained from the lineweaver-burk presentation of  $1/J_0 = f(1/C_0)$  function provided by the thermodynamic model.

The Arrhenius empirical relation applied to the initial flux ( $J_0$ ) makes it possible to study the influence of the temperature factor according to the following relation:

$$J_0(T) = A_j \exp(-E_a/RT) \quad (5)$$

$A_j$ : is the term proportional to the favorable substrate interaction numbers with the extractive agent.  $E_a$ : is the activation energy for the formation of the transition state relating to the kinetically determining step of the mechanism which is the diffusion step of the unstable entity ( $ST$ ) across the membrane phase. The adoption of the theory of transition state (Eyring's theory) makes it possible to calculate the values of the activation parameters, enthalpy  $\Delta H^{\#}_{ass}$ , and entropy  $\Delta S^{\#}$ , according to the following expressions:

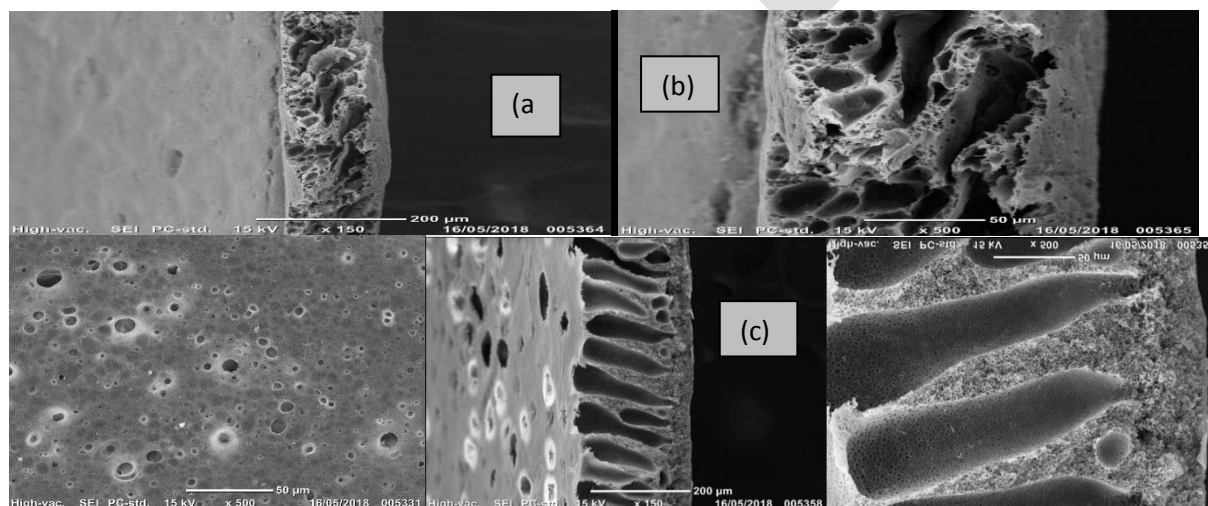
$$\Delta H^{\#}_{ass} = E_a - 2500 \text{ J.mol}^{-1} \text{ at } 298 \text{ K} \quad (6)$$

$$\Delta S^{\#} = R [(\ln(A_j) - 30,46)] \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \text{ à } 298 \text{ K} \quad (7)$$

### 3. RESULTS and DISCUSSION

#### 3.1 Morphological modifications

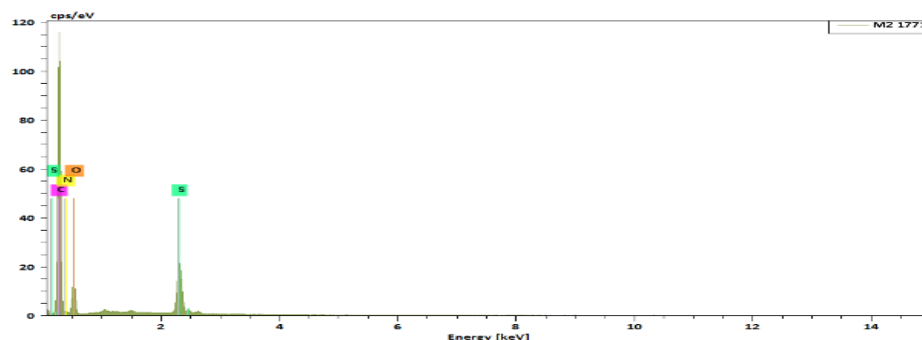
SEM micrographs were used to examine changes in the membrane surface when changing the composition of the cast polymer solution. Figure 1 shows the surface and cross-section of a PSU-PVP polymer support and PSU-PVP-TREN membranes, The surface and the cross-section micrographs of the functionalized membrane show a porous homogenous structure with cavities in cone form with much better interconnected pores compared to the PSU-PVP support which presents a random voids due to the non solvent-induced phase separation.



**Figure 1:** SEM micrographs: **a)** Cross-section of PSU/PVP polymer support, **b)** Surface of PSU/PVP/TREN membrane, **c)** Cross-section of PSU/PVP/TREN membrane

Further information on membrane structure can be taken from the EDX analysis. Figure 2 shows the EDX spectroscopy results of the functionalized membrane, indicating that it consists of carbon (C) oxygen (O), sulfur (S) and nitrogen (N) elements. EDX results provided in table 1 confirm the grafting of TREN into the matrix polymeric.

**Figure 2:** EDX Spectra of the PSU/PVP/TREN membrane

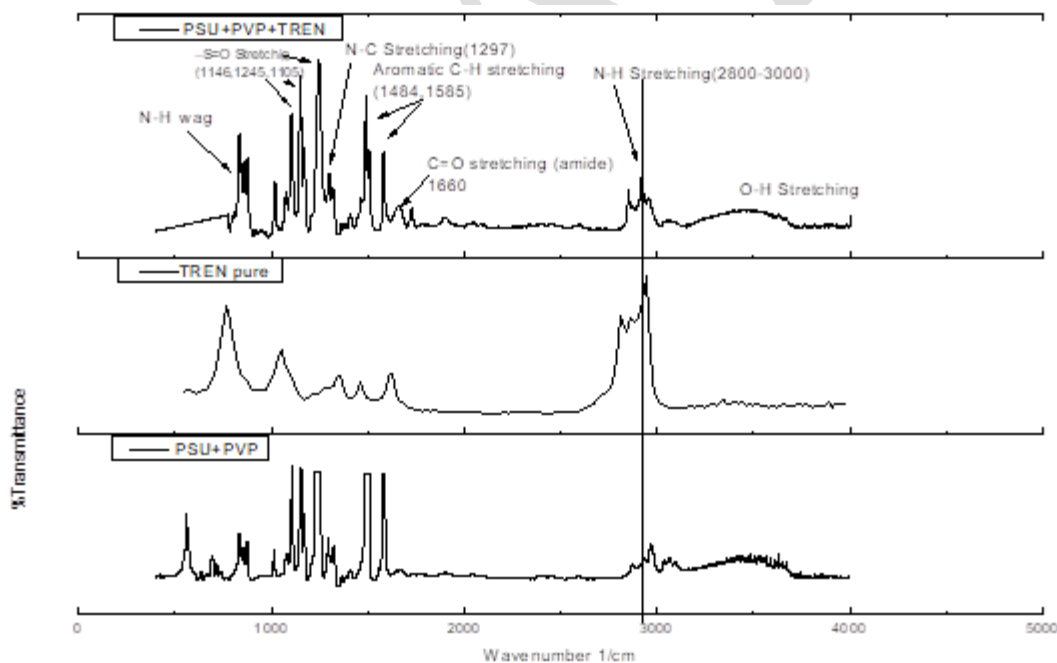


**Table 1:** Chemical elements of elaborated functionalized membrane

Element	Line s.	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]
Carbon	K-Serie	70.06	70.64	77.47
Nitrogen	K-Serie	5.75	5.79	5.45
Oxygen	K-Serie	17.79	17.94	14.77
Sulfur	K-Serie	5.58	5.63	2.31
		<b>99.17</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

### 3.2 Structural Composition

The ATR-FTIR technique was used to elucidate the membrane composition and identify the presence of the adopted TREN agent (Fig. 3). The broad peak within the range 3490 to 3330  $\text{cm}^{-1}$  is owing to  $-\text{OH}$  groups stretching vibration of residual water remaining in the membrane matrix. The N-H stretching vibration of amine function shows in the range 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ . The C=O vibration groups show a prominent peak at 1660  $\text{cm}^{-1}$  correspondent to amide carbonyl of PVP. The absorption bands at 1245, 1146 and 1105  $\text{cm}^{-1}$  are appointed to the symmetric and asymmetric stretching vibrations of  $-\text{S}=\text{O}$  present in the polymer support.



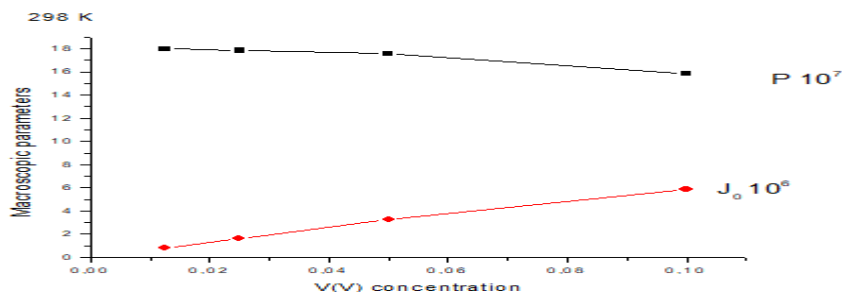
**Figure 3:** ATR-FTIR spectra for PSU / PVP / TREN functionalized membrane, PSU / PVP support and TREN extractive agent.

### 3.3 Application of the kinetic and thermodynamic model for determining of macroscopic and microscopic parameters to experimental extraction data

The experimental data collected and processed using the kinetic and thermodynamic models, show that the representations of the functions  $-\text{Ln}(C_0-2Cr) = f(t)$  and  $1/J_0 = f(1/C_0)$  are linear, whose slopes and intercepts make it possible to determine different macroscopic and microscopic parameters for the extraction oriented processes of  $\text{VO}_2^+$  ions through the developed membrane.

### 3.3.1 Effect of carrier nature and VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions concentration

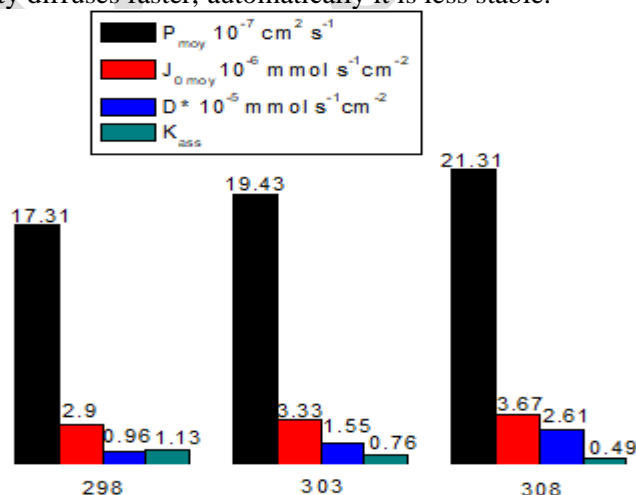
In much previous research (P. Sun et al. (2015), Pu Xiong et al. (2017)), indicate that primary and tertiary amine could extract VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions after their immersion in the acid solution (namely amine salts), the protonated form RNH<sub>3</sub><sup>+</sup> has good extracting ability on vanadium ions because of its inductive effect due to the load carried by the nitrogen atom. In the present study, extraction experiments of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions were carried out for different initial concentrations C<sub>0</sub>, ranging in 0.0125 to 0.1 M, The graph in Figure 4 shows obviously that the membrane permeability *P* varies inversely with the initial flux *J*<sub>0</sub> and it enhances with decreasing the VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions concentration. Most importantly, the initial flux *J*<sub>0</sub> through the membrane decreases with the initial concentration C<sub>0</sub> of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions.



**Figure 4:** The evolution of macroscopic parameters *P* and *J*<sub>0</sub> versus VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions concentration at T=298 K, and [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>]=1mol/L

### 3.3.2 Effect of the temperature factor

The histogram of Figure 5 below, described the experimental performance of the functionalized membranes tested in this work in a temperature range in 298 to 308 K. A preliminary analysis of these results reveals that this functionalized membrane is more efficient at high temperature. Actually, some research (C. A. Kozłowski et al. (2007)) reports that temperature factor significantly influences the permeability of various polymer membranes used in the process of facilitated transport. An increase in temperature leads to an increase in the membrane permeability, thus, higher fluxes. Therefore, these facilitated processes are controlled by two terms, energetic and structural. To clarify this important effect of temperature factor on the performance of the used membrane and to identify these two terms that control the mechanism of the studied processes, we determined from slopes and intercepts of lineweaver-burk straight lignes, the values of the apparent diffusion coefficient *D*\* and the association constant *K*<sub>ass</sub>. The results indicate that these two parameters evolve inversely, which means, when the formed entity diffuses faster, automatically it is less stable.



**Figure 5:** The temperature effect on macroscopic and microscopic parameters of facilitated transport of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions across PSU/PVP/TREN membrane

In order to explain the performance evolution of the prepared membrane and to identify the mechanism of the studied processes, we have examined the influence of energetic aspect on the facilitated transport process of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions, by using equations (5), (6) and (7). According to the obtained values (Table 2) the activation energy parameter *E*<sub>a</sub> is relatively low which indicates that the formation of the transition state of the association reaction of the VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions with the interactions sites of the TREN agent is easy and requires a small amount of energy and it is ordered state ( $\Delta S^\ddagger$  negative). Therefore the passage by this state is easy through the developed



functionalized membrane, and the movement of the VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ion substrate across the membrane phase is not a pure diffusion, but it is *an apparent diffusion movement* by *successive jumps* according to reactions (association / dissociation), of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions on fixed interaction sites of the extractive agent immobilized in membrane phase.

**Table 2:** Values of activation and thermodynamic parameters related to the facilitated extraction oriented processes of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions across PSU/PVP/TREN membrane.

$E_a$	17.89 KJ mol <sup>-1</sup>
$A_j$ (pre-exponential factor)	0.4018
$\Delta S^\#$	260.70 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
$\Delta H^\#$	15.41 KJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta H_{diss}$	<b>79,43</b> KJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta H_{th}$	-64.01 KJ mol <sup>-1</sup>

The high value of the activation dissociation enthalpy ( $\Delta H_{diss}$ ) relative to the dissociation reaction necessary for the passage by the transition state, indicates that the rate of this reaction is very slow, which strongly limits the diffusion of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions through the membrane phase. This important result explains the important influence of the temperature factor and makes it possible to affirm that *the energetic aspect perfectly controls* the mechanism of these oriented processes carried out through the developed membrane.

#### 4. CONCLUSION

The composition and the morphology of the developed membrane have been characterized by different techniques, and the functionalization of the PSU polymer support by the TREN agent has been verified. The presence of amine groups in the membrane phase allowed a better extraction of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions through this PSU / PVP / TREN membrane type and a better performance of the membrane for the studied processes, especially at high temperature.

According to the analysis of collected results, an apparent diffusion mechanism ( $D^* 10^{-5} \text{ cm}^2, \text{ s}^{-1}$ ) by successive jumps on fixed sites, controlled by energetic aspect has been elucidated for the extraction oriented processes of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions through the elaborate membrane. In fact, the results show that the apparent diffusion coefficient parameter  $D^*$  varies moderately with the temperature factor whereas the association constant parameter  $K_{ass}$  is strongly influenced by this temperature factor, which explains the good performance of the membrane at high temperature. .

#### References

- M. Shamsipur, S.Y. Kazemi, G. Azimi, S.S. Madaeni, V. Lippolis, A. Garau, F. Isaia, Selective transport of silver ion through a supported liquid membrane using some mixed aza-thioether crowns containing a 1,10-phenanthroline sub-units as specific ion carriers, J. Membr. Sci. 215 (2003) 87.
- A. Zaghbani, R. Tayeb, I. Bonnamour, C. Felix, F. Vocanson, R. Lamartine, M. Dhabbi, P. Seta, Affinity membranes for the extraction of Cd<sup>2+</sup> ions by facilitated transport ensured by a new thiacalix[4]arene complexing agent incorporated in supported liquid membranes (SLM), J. Membr. Sci. 258 (2005) 5.
- C. Fontas, R. Tayeb, S. Tingry, M. Hidalgo, P. Seta, Transport of plat- inum(IV) through the supported liquid membrane (SLM) and polymeric plasticized membrane (PPM), J. Membr. Sci. 263 (2005) 96.
- B. Chakrabarty, A.K. Ghoshal, M.K. Purkait, Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties, J. Membr. Sci. 309 (2008) 209–221.
- T. Eljaddi, O. Kamal, El H. El Atmani, I. Touarssi, L. Lebrun and M. Hlaïbi, Effective Supported Liquid Membranes for Facilitated Extraction Phenomenon of Cadmium (ii) Ions from Acidic Environments: Parameters and Mechanism, The Canadian Journal Of Chemical Engineering volume 9999 (2015)
- P. Sun, K. Huang, H. Liu, Separation of V and Cr in alkaline aqueous solution using acidified primary amine N1923, Hydrometallurgy (2015).
- Pu Xiong, Yimin Zhang, Jing Huang, Shenxu Bao, Xiao Yang, Chun Shen, High-efficient and selective extraction of vanadium (V) with N235-P507 synergistic extraction system, chemical engineering research and design 1 2 0 ( 2 0 1 7 ) 284–290.
- C. A. Kozłowski, Facilitated transport of metal ions through composite and polymer inclusion membranes, Ind. Eng. Chem. Res. 2007, 46, 5420.

## Annual rings of woody plants as indicators of climatic environmental conditions

Ainur Utebekova<sup>1\*</sup>, Zhanera Adilbaeva<sup>1\*</sup>, Bagila Maisupova<sup>2</sup>, Kurmankul Abaeva<sup>1\*</sup>  
Botagoz Kentbayeva<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup>Kazakh National Agrarian University, Forest, land resources and phytosanitary, Forest resources and forestry, Almaty, Kazakhstan.

<sup>2</sup>Kazakh Research Institute of Forestry and Agroforestry, Almaty branch, Almaty, Kazakhstan.

Corresponding author e-mail: arunia190482@mail.ru

### Abstract

Currently, the problem of changes in the natural environment and climate has become an important area of research. Large amounts of instrumental meteorological observations have been accumulated, the analysis of which shows that indeed over the last century there have been significant climate changes both on the whole planet and on the territory of Kazakhstan. However, there is a problem of comparing the state of the environment and climate of the last 100 years with those of the past centuries and millennia. Thus, to give a correct assessment of modern changes in the historical aspect or to make reliable forecasts of the development of the natural environment and climate system, based on short series of instrumental observations, seems problematic.

Indirect information sources help to solve the problem of climate and natural environment data of the past. One of such sources - annual rings of trees. The lifespan of trees can reach several thousand years in the annual rings of trees contains information about the climate, hydrological regime and other environmental changes, while woody vegetation can be a reliable indicator of the environmental conditions and natural processes. The most complete indicator capabilities of trees are used in the tree-ring analysis, which allows to estimate the magnitude of the radial growth of trees changes in the main climatic variables - air temperature and precipitation, as well as hydrological, geomorphological, permafrost and seismic processes and changes. Dendrochronology (obtaining and analyzing tree-ring chronologies) is the most accurate method of research, which allows us to restore the weather sequence of changes in climate and environmental conditions of the past years within a specific territory, a large region or even on a global scale for several centuries and millennia (Esper, Schweingruber, Winiger, 2002).

Woody communities in the inland mountains grow in extreme conditions and are highly sensitive to even minor changes in climatic factors, relatively small anthropogenic impact. The organization of the database of dendrochronological geodata and analysis of factors limiting the growth of tree rings, makes it possible to trace the long history of spatial and temporal variability of various landscape components in a complex mountainous terrain and mosaic climatic conditions, as well as to predict future changes (Mazepa, 2000).

**Keywords:** Dendrochronology, core, annual growth, growth index, dating of rings

### INTRODUCTION

Understanding the processes that determine climate variability is one of the most urgent tasks of modern science. In recent decades, due to the heated discussions about the nature and causes of modern climate fluctuations, this issue has acquired unprecedented urgency and went beyond a purely scientific problem.

In recent years significantly increased the interest of the world community to study the reaction of ecosystems and their individual components on changes of climate in connection with the need to evaluate the consequences of the ongoing warming in many parts of our planet and the development of a global model of the possible changes of the biosphere in the continuation of these processes. According to the intergovernmental panel on climate change (IPCC, 2007), the average surface temperature of the entire planet increased by 0.74°C between 1906 and 2005.

Information on climate change can be obtained in a variety of ways. Instrumental observations at meteorological stations provide the most reliable weather information for the study area, but this information usually covers a short period of time (usually less than 100 years), and the network of existing weather stations is rare, especially in mountainous areas.

Dendroclimatology - the most important tool of modern paleoclimatology, which allows the reconstruction of hydrometeorological series with high accuracy and reliability. This method makes it possible

to reconstruct the temperature, precipitation, river flow with annual or seasonal resolution, and thus to extend the number of observations, to assess the frequency and severity of extreme events, trends and rhythm of changes in climatic parameters and related natural processes. The reconstructed data can also be used to predict intra-century climate fluctuations.

The ecology of mountain forests is dynamic and changes under the influence of climate, forest fires, insect outbreaks, anthropogenic factors and extreme natural phenomena. One of the effective methods of monitoring the ecological state of coniferous forests is the method of dendrochronological analysis. The experience of foreign forest agencies in the USA, Canada, China and Russia shows that the inclusion of dendrochronological observations in the forest monitoring system significantly increases the effectiveness of practical measures for the protection and management of forest resources. Tien Shan spruce is an ideal object for dendrochronological studies, its annual rings are cross-dated and radial growth is sensitive to climate change. Weather variability in the width of annual rings well registers changes in the dynamics of stands caused by outbreaks of mass reproduction of insects defoliators of spruce and bark beetles.

## **MATERIALS AND METHODS**

One of the most promising methods for studying the dynamics of individual climatic factors and the frequency of climatic extremes in the past outside the period of instrumental observations is the dendrochronological method.

The study of climate variability in Tien Shan using one of the indirect methods of indication - dendrochronology, is thus one of the urgent tasks of paleoclimatology. This work is devoted to the study of the reaction of the width and density of annual rings of Schrenk spruce to climatic fluctuations in the Tien Shan, the creation of long-row quantitative reconstructions of interannual and intra-century variability of summer air temperature for the area.

The object of research was the natural forest plantations of Shrenka spruce growing on the Northern slope of the TRANS-ili Alatau, the territory of the Ile-Alatau state national natural Park of Almaty region (the gorge "Big Almaty lake", "Tuyuksu", "Gorelnik").

The proposed study is to develop a Protocol for the organization of a network of dendrochronological polygons to monitor the impact of climate and insect outbreaks on the state and dynamics of forest stands of spruce forests in South-East Kazakhstan. It is supposed to lay two types of polygons: dendroclimatic and dendroecological along the height profiles from the upper to the lower boundary of spruce forests in Zailiyskiy Alatau.

Collection of wood samples is carried out by an age drill from living trees and a circular chainsaw – from dead trees. The width of the tree rings will be measured at the Lennox measuring unit with an accuracy of 1 micron. The annual ring width series will be used to cross-date individual trees on the sample area, between areas and climatic areas. The obtained tree-ring series are standardized (i.e. the age trend is estimated and the proportion of radial growth variability associated with the age of the tree is eliminated in order to highlight the climate-related variability of the radial growth of spruce in the studied habitats (comin, 1990).

In addition to gathering the collection of cores and cut down on landfill plan field work includes conducting entomological observations of forest insects with pheromone traps.

## **RESULTS**

Samples were taken in the territories of Ile-Alatau GNPP in Tuyuksu gorges, Big Almaty lake and Gorelnik. Three sample areas (TAO, BAO and GOR) are located within 60 km radius of Almaty, i.e. the study area is located between the lakes Issyk-Kul and Balkhash in the Western Tien Shan (Figure 1).

Conducted by laying sample plots, i.e. 3 of the landfill in the canyons "Big Almaty lake", "Tuyuksu", "Gorelnik" in the spruce forest at different altitude belts. Old-age stands were selected for dendrochronological polygons and dendro samples (cores) of Schrenk spruce in the amount of 49 specimens were selected.

At present, age-related drills of predominantly Swedish (Haglof) or Finnish (Suunto) production are used to take wood images, especially from live trees, by means of which radial cores of wood 4-5 mm in diameter and 10-50 cm in length are drilled.



Figure 1. Location of sampling sites

Cores were taken at the height of 1,0-1,3 m from the surface of the earth. To construct a single generalized chronology of selected wood samples with 15-30 trees of the same species, and each tree – two radii. The drilled cores were placed in specially prepared paper or polyethylene containers, the inner diameter of which is 2-3 mm larger than the diameter of the sample. In containers, the samples are easy to transport, dry and store before the work on the Dating and measurement of the rings.

In dendrochronology the most widely used encoding, consisting of six characters. Therefore, each wood sample was coded, i.e. code was written on the surface of the sample. The first three characters are a combination of letters of the Latin alphabet, which denote the habitat code (for example, VAO – Big Almaty lake; Tuy-Tuyuksu; Gor – Gorelnik). The next two numeric characters (from 01 to 99) represent the model tree number, and the last character (A and B) represents the radius number.

In addition, the sample or container indicates the type of tree, the date of collection, the name of the collector, etc. In each test area (polygon), the coordinates of the terrain, growing conditions, soil, vegetation of model trees and taken samples of wood were described. Before taking measurements of the width of annual rings, prepared samples of wood to the measurements, i.e. prepared slats (wooden base) with a width and a height of approximately 1 cm and a length somewhat greater length of the sample. Then, these samples were glued to the rails with PVA glue for the convenience of their coding, processing (polishing, Stripping, increasing the contrast of the rings), Dating and measurement, as well as to prevent loss and break into small pieces. In order for the boundaries of the cells and annual rings to be clearly visible during measurements in reflected light, it is necessary to thoroughly clean the end surface of the wood sample. Grinding and polishing was performed using sandpaper. This treatment of the end surface of the sample gives good results in cases where the annual rings are relatively wide (more than 1 mm), and the wood is healthy, i.e. it has not been subjected to rotting processes. To make more visible the boundaries of narrow rings and the boundaries of the cells, the surface is better cleaned with a sharp cutting tool (razor or office knife). In dendro samples, the upper part of the core is cut (1-1.5 mm thick). It is necessary to pre-moisten the treated part of the core with water.

To increase the contrast of the boundaries between the cells and the annual rings, a method of wetting the surface with water was used. And for Dating and measuring the width of the annual rings used a dry method, that is, rubbed on the cleaned surface of powdered chalk with a piece of cotton. The dry method is convenient because there is no need to constantly maintain the sample in a wetted state, and eliminates distortions associated with swelling of the wood.

Further, in the measuring system LINTAB, made the measurement of the characteristics of the gain on the cores. This device is accompanied by a computer program TSAP 3.5, which allows you to enter the measurement data into the computer, correct and analyze the data, to present them in tabular and graphical forms.

The width of the annual rings was measured under a binocular microscope with the conversion of the number of divisions of the measuring scale in millimeters or semi-automatic installation LINTAB-6 (with an accuracy of 0.01 mm).

According to the results obtained on the trial areas of Tuyuksu, Big Almaty lake and Gorelnik, the characteristics of individual chronologies on the width of the annual rings of Shrenka spruce trees are given (table 1).

Table 1 shows that the sample number 3 Tuy 2a – the largest number of rings (229pcs.) because it is an old tree, and it begins in 1787 with an average width of 5.42 mm rings.

And the maximum width of the rings was 9.40 mm in the sample №1 Toy 1a. The third tree had one radius measured, i.e. Tuy 3a (3b is missing). The average width of the rings of all samples was 1.71 mm. Total counted rings 934 PCs.

On this sample area, the "Big Almaty lake" tree No. 3 bao 3b – the largest number of rings, i.e. it is limited to 205 pieces, this tree is the formation of the rings began with 1811. This tree had only one radius measured. The rest of the samples along two radii were taken from the cores. On the trial area "Big Almaty lake" 22 samples were to be measured, and the maximum width of the rings was 7.05 mm for the sample №1 bao 1b. The average width of the rings of all samples was 2.15 mm. Total counted rings 2778 PCs.

**Table 1.** Characteristics of individual chronologies on the width of annual rings of Schrenk spruce trees on three sample areas

Sample	Interval (years)	Number of rings (pieces)	Average width of rings (mm)	Maximum ring width (mm)
<b>The Tract "Tuyuksu" (Tuy)</b>				
Tuy 1a	1898-2015	118	2,62	9,40
Tuy 1b	1950-2015	66	2,07	3,27
<b>Tuy 2a</b>	<b>1787-2015</b>	<b>229</b>	5,42	1,14
Tuy 2b	1807-2015	209	6,13	1,42
Tuy 3a	1944-2015	72	4,13	2,74
Tuy 4a	1883-2015	133	5,70	1,51
Tuy 4b	1909-2015	107	6,50	1,79
TOTAL:		934	1,71	9,40
<b>Big Almaty lake (bao)</b>				
bao 1a	1859-2015	157	2,18	4,53
bao 1b	1885-2015	131	2,57	7,05
bao 2a	1953-2015	63	2,47	5,05
bao 2b	1947-2015	69	2,98	5,46
<b>bao 3b</b>	<b>1811-2015</b>	<b>205</b>	1,35	5,64
bao 4a	1905-2015	111	1,37	3,07
bao 4b	1843-2015	173	1,67	4,66
bao 5a	1879-2015	137	1,72	2,89
bao 5b	1885-2015	131	1,62	2,67
bao 6b	1863-2015	153	2,03	3,87
bao 8a	1898-2015	118	2,35	3,86
bao 8b	1878-2015	138	1,90	3,40
bao 9a	1893-2015	123	2,30	4,21
bao 10a	1915-2015	101	2,33	4,62
bao 10b	1935-2015	81	3,38	5,86
bao 11a	1884-2015	132	2,44	5,91
bao 11b	1898-2015	118	2,85	4,83
bao 13a	1870-2015	146	2,34	6,38
bao 14a	1913-2015	103	1,75	2,68
bao 14b	1916-2015	100	2,10	3,41
bao 15a	1876-2015	140	2,08	3,88
bao 15b	1868-2015	148	1,56	3,38
TOTAL:		2778	2,15	7,05
<b>Tract "Gorelnik" (gor)</b>				
gor 1a	1957-2015	59	2,97	5,58
gor 1b	1955-2015	61	3,63	6,24
gor 2a	1951-2015	65	2,66	5,29
gor 2b	1910-2015	106	1,36	3,93
gor 3a	1976-2015	40	4,41	6,42
gor 3b	1968-2015	48	4,56	<b>6,99</b>
gor 5a	1967-2015	49	3,41	5,58
gor 5b	1958-2015	58	2,02	4,78

gor 6a	1959-2015	57	3,22	5,78
gor 6b	1960-2015	56	3,21	5,57
gor 8a	1955-2015	61	2,77	4,48
gor 8b	1954-2015	62	2,85	4,73
gor 9a	1973-2015	43	3,60	4,85
gor 9b	1976-2015	40	3,88	5,57
gor 10a	1968-2015	48	3,61	5,48
gor 10b	1953-2015	63	3,04	5,02
gor 11a	<b>1890-2015</b>	<b>126</b>	1,38	2,97
gor 11b	1909-2015	107	1,50	3,35
gor 12a	1903-2015	113	2,34	2,67
gor 12b	1902-2015	114	1,41	3,09
TOTAL:		1376	2,89	6,99

And on the third trial area "Gorelnik", at a tree No. 17, the sample gor 11a – is considered the oldest tree, the number of annual rings makes 126 pieces, at this tree formation of rings began since 1890. On the trial area "Gorelnik" 20 samples were subject to measurement. Of these, the maximum width of the rings was 6.99 m in the sample number 6 gor3b. The average width of the rings of all samples was 2.89 mm. Total counted rings 1376 PCs.

## DISCUSSION

The annual rings of Schrenk spruce are sensitive to drought, they are one of the best sources for past hydro-climatic information and provide an accurate tool for determining climate change in arid areas. In the last decade, many hydro-climatic reconstructions of annual rings in Central Asia have been developed by many scientists from different countries. However, the density of tree-ring research in Kazakhstan remains low, and the high amount of precipitation and drought reconstructions poorly marked.

Forests in the field of research are typical open coniferous forests with a predominance of spruce (*Picea schrenkiana* Fisch. et Mey.). Spruce spruce is often found on hills, so there was laid the plot.

The growth of old trees reacts equally from year to year. Some external factor affects trees equally. And in young trees, the phytocenotic factor has a great influence, so cross-Dating is difficult. In samples № 5A, 5b, and № 10A, 10 b, taken in the tract "Gorelnik" found narrow rings in a row, since 2011, ie trees are gradually dying. The narrowest annual rings in woody plants are observed in extreme conditions, such as a hurricane, fire and so on. As an example, we can refer to the natural disaster, manifested in the form of a strong hurricane that occurred in 2011 near Almaty, in the tract "Medeu". As a result of the hurricane the area of the windfall amounted to 480 ha with wood volume of 96 thousand cubic meters of forest spruce.

Also, weather and climatic conditions contribute to the spread of natural epizootics among stem pests caused by entomopathogenic microorganisms, that is, the provoking factors of the outbreak of mass reproduction of the bark beetle are drought, forest fires and strong hurricane winds. The fight against bark beetles should be carried out only by specialists-forest pathologists, because during the treatment of insecticides should be properly selected drugs, their concentrations, dosages, methods and technologies, and most importantly - the timing of treatment. This is due to the fact that insecticides are effective only in a very short period of summer of the pest, otherwise the desired effect will not be.

## CONCLUSION

Schrenka spruce is a good object for dendroclimatological studies, as it grows in a large range of heights (from 1400 to 2900 m above sea level and above) [52], has a clear concentric annual rings with distinct zones of early and late wood, indices, the width of which is well correlated with climatic indicators. The study of ecological and biological features of Schrenk spruce was carried out on the basis of direct observations and published literature.

According to our observations, the state of the trees of the spruce Schrenk in the territories of the TRANS-ili Alatau belongs to 1 school, i.e. without signs of weakening. In all zones of the crown Schrenka spruce from the bottom to the top of the dense needles of green, the growth of the current year, normal size for age, season, habitat conditions; the stem and root of the paws have no external signs of damage.

## **REFERENCES**

- Esper J, Schweingruber F, Winiger M 2002. 1300 years of climatic history for Western Central Asia. The Holocene, Vol. 12, 3: 267-277.
- Mazepa In 2000. Methods of dendrochronology. Part I. Basics of dendrochronology. Collection and receipt of wood-ring information. Educational and methodical manual. Krasnoyarsk: Krassu, 80 p.
- Comin G 1990. Application of dendrochronological methods in ecological monitoring of forests. Forestry, 2: 3-11.

DRAFT

## Chemical synthesis and quality control of a cardioactive substance

Beghdadi Sara El Mansouria<sup>1\*</sup>, Abed Amine<sup>2</sup>, Dellaoui Yahia<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> University of Abou Bekr Belkaid, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Tlemcen, Algeria.

<sup>2</sup> University of Oran 1 Ahmed Benbella, Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, Oran, Algeria.

\*Corresponding author e-mail: pharma.sara@yahoo.fr

### Abstract

Phenytoin, an anti-arrhythmic substance, is synthesized by a direct process. Its quality is then determined by control of characters, identification by thermal analysis (differential scanning calorimetry DSC) and spectroscopic analysis (infrared IR and proton nuclear magnetic resonance <sup>1</sup>H NMR), its purity is tested by searching related substances with High Performance Liquid Chromatography HPLC and a dosage is realized by a volumetric titration assay in a non-aqueous medium. The control is realized by processes of the European Pharmacopoeia, then extended to other processes extra-pharmacopoeia such as <sup>1</sup>H NMR and DSC.

In the stemming of the laboratory tests, an impurity was isolated and identified by thermal and spectroscopic analysis. The results concluded that its structure corresponds to the impurity D entered in the monograph of the European pharmacopoeia, hence its usefulness as a standard substance in the purity control of phenytoin synthesized by HPLC.

The synthetic process of phenytoin has resulted in an active substance of comparable quality that meets current requirements for the production and control of the pharmaceutically active substances.

**Keywords:** Phenytoin, synthesis, analytical, control, impurity, quality.

### INTRODUCTION

- Phenytoin is one of the most potent anti-arrhythmic, used in the treatment of ventricular intolerant and refractory arrhythmias. This property is added to an anti-epileptic effect. [5]
- Chemically, phenytoin is imidazolidine-2,4-dione. It is registered in European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> Edition, British pharmacopoeia 2018, United States Pharmacopoeia USP 40- NF 35 and Japanese Pharmacopoeia 17<sup>th</sup> Ed.
- The objective of our work is the synthesis of phenytoin by a direct process and determination of its quality by pharmacopoeial and extra-pharmacopoeial procedures. Particular attention has been paid to an impurity, isolated, in the stemming of another laboratory tests, in significant quantity. Its structural identification makes it possible to use it as a standard substance to control, by HPLC, the purity of the active substance synthesized.
- 

### MATERIALS AND METHODS

The experimental study focuses on chemical synthesis of phenytoin by a direct process.

In another work, an impurity of buff color (it is the impurity D which appears in the Phenytoin monograph of the European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition) was isolated during a synthesis. It is analyzed by Differential Scanning Calorimetry DSC (since its melting point was greater than 250° C). Its structural identification is realized by spectroscopic analysis (Infrared absorption spectrophotometry IR and proton nuclear magnetic resonance <sup>1</sup>H NMR). Once identified, it will serve as a standard when analyzing the purity of synthesized phenytoin by High Performance Liquid Chromatography HPLC.

The substances of phenytoin is analytically controlled by Pharmacopoeial methods (Infrared absorption spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography HPLC and dosage by Potentiometry titration) and Extra-Pharmacopoeial methods (Thermal Analysis: DSC, Spectroscopic analysis: <sup>1</sup>H NMR).

The European Pharmacopoeia (Eur. Ph.) 9<sup>th</sup> edition was chosen for the previous manipulations except for the dosage which, for practical reasons, was carried out according to the Japanese Pharmacopoeia 16<sup>th</sup> edition[6,7].



## Chemical synthesis

Solvents and chemical reagents were purchased from commercial vendors in the appropriate grades. They were used without prior purification.

In a 250 ml flask, dissolve 10 g benzophenone, 4 g potassium cyanide and 16 g ammonium carbonate in 100 ml ethanol 60%. The flask is surmounted by Davies double-surface refrigerant and reflux for 10 hours at 58-62° C, preferably without stirring the contents during heating. After that, concentrate the reaction mixture to 2/3 of the original volume. Acidify at room temperature with hydrochloric acid until the pH paper turns. The solid obtained after filtration is treated with a dilute solution of sodium hydroxide. After filtration, the alkaline solution is acidified to precipitate the phenytoin, which will be filtered under vacuum. The crude product was recrystallized from 90% ethanol. [1,2]

## Identification of the impurity D

An impurity of buff colour isolated, in an other synthesis, was identified by melting point measurement and thermal analysis (differential scanning calorimetry) with heat flow device type NETZSCH Phoenix 204F1 and spectroscopic analyzes: infrarouge with Jasco FT\IR-4200 (with KBr) and <sup>1</sup>H NMR with spectrometer Bruker Avance (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

## Analytical control of synthesized phenytoin

The analytical Control of phenytoin is realised by Pharmacopoeial and Extra-Pharmacopoeial Methods.

The European Pharmacopoeia 7th edition was chosen for the control as it is harmonized with the BP, allows a better control of purity because it treats a profile of impurities more widened. The Japanese Pharmacopoeia 16th edition was chosen, for practical reasons, for the control of the content of active substance.

Control consisted of characters, identification, purity test and assay

## Characters

Phenytoin is in the form of white crystalline powder. the solubility was tested in water, ethanol 96%, methylene chloride and NaOH solution 0.1 N.

## Identification

The synthesized phenytoin is identified by thermal analysis (differential scanning calorimetry) with heat flow device type NETZSCH Phoenix 204F1 and spectroscopic analysis: infrarouge with Jasco FT\IR-4200 (KBr) and <sup>1</sup>H NMR with spectrometer Bruker Avance (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

## Purity test

Search for related substances by HPLC-DID method, with Dionex UltiMate 3000 HPLC system, UHPLC + focused. A diode-array detector (DAD) was used for separation and detection. Chromeleon (c) Dionex software (version 6.8) was used to control the instrument and collect the data. Separation was performed on a column C18 (4.6×250 mm, 5 µm, STABILITY BASIC de Cluzeau Info Lab).

The search for related substances is done according to the monograph listed in the European Pharmacopoeia 9th edition, subject to some modifications. Knowing that the impurity D was isolated and identified on the structural plane.

## Mobile phase preparation

Mix 20 volumes of HPLC methanol (Sigma Aldrich), 35 volumes of HPLC acetonitrile (Sigma Aldrich) and 45 volumes of buffer solution (it is aqueous solution 5.75 g / l of ammonium dihydrogenphosphate (Biochem Chemopharma) and adjusted to pH 2.5 with orthophosphoric acid (Prolabo)).

## Sample preparation

- **Test solution** : Dissolve 50 mg of phenytoin in the mobile phase and dilute to 50.0 ml with the mobile phase.

**Standard preparation:** control solution (a) and (b).

- **Control solution (a):** this is the 1/1000th dilution of the test solution.

Dilute 1.0 ml of test solution to 100.0 ml with the mobile phase. Dilute 1.0 ml of this solution to 10.0 ml with the mobile phase.

- **Control solution (b):** this is the impurity D.

Dissolve 10 mg of impurity D (isolated and previously identified) in the mobile phase and dilute to 10.0 ml with the mobile phase.

### **Chromatographic conditions**

Mobile phase: 100% isocratic elution mode.

Flow rate: 1.5 ml / min.

Column: C18. Stationary phase: octadecylsilyl silica gel post-grafted for chromatography.

Detection: UV spectrophotometer at 220 nm.

Injection: 20 µl of test solution, control solution (a) and control solution (b). Each solution was injected twice.

Run time: 4 times the retention time of phenytoin.

### **Identification by HPLC of Impurities**

The identification of the specified impurity D is done by comparing the chromatogram of the test solution with that of the reference substance (control solution (b)).

### **Limit in individual impurities by HPLC**

According to the Pharmacopoeia General Tests chapter, the liquid chromatography for the purity test is performed by comparing the peak area of the analyzed impurity of the test solution (sample) with the area of the main peak of a standard solution (control solution (a)), which is prepared by diluting the test solution to a concentration corresponding to the specified limit of the impurity, or by calculating the area of impurity by the use of the test method. Percentage of peak areas.

### **Total limit of impurities by HPLC**

As for the limit for individual impurities, the total limit of impurities is verified by one of the methods described above.

### **Assay**

Phenytoin is dosed by protometric titration, a method adapted according to the 16th edition of the Japanese Pharmacopoeia. It consists of dosing insufficiently acidic derivatives with a basic ethanolic solution in the presence of silver nitrate and pyridine.

Phenytoin is a very weak acid ( $PK_a = 8.3$ ), this acidity cannot be titrated in water with a solution of sodium hydroxide, when pyridine is present with the silver ions in an ethanolic medium, the reaction becomes easier.

**Protocol:** Weigh accurately about 0.5 g of phenytoin, previously dried, dissolve in 40 ml of ethanol (95%) with the aid of gentle heating, add 0.5 ml of thymolphthalein immediately, and titrate with 0.1 mol/l sodium hydroxide solution until a light blue color develops. Then add 1 ml of pyridine, 5 drops of phenolphthalein and 25 ml of 0.1 mol/l silver nitrate and titrate with 0.1 mol/l sodium hydroxide until a light red color, which persists for 1 minute, develops.

Each ml of 0.1 mol/l sodium hydroxide = 25.23 mg of phenytoin.

## **RESULTS and DISCUSSION**

### **Synthesis of phenytoin**

Phenytoin is in the form of needle-shaped white crystals. The yield is 10.25%.

According to "Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia 3rd edition", a net yield of 95% is obtained by this method of synthesis; it can be improved by lengthening the heating time.

The efficiency of the handling is much lower than this value (10.25%). Indeed, there was a rapid degradation (in the first half-hour) of the ammonium carbonate to ammonia which condensed on the coolant neck wall.

The Replacing, for lack, of Davies double-surface refrigerant with a bulb condenser during reflux heating may be the cause.

## Identification of the isolated impurity (impurity D)

the isolated impurity is in the form of crystalline powder of buff color.

### -Thermal analysis: Differential Scanning Calorimetry

The DSC thermogram of the isolated impurity is shown in Figure 1.

The thermogram shows an endothermic peak that starts at 311.7 °C corresponding to the melting point of the impurity. And another endothermic peak at 56.1 °C. corresponding to the desolvatation of the product.

The peak at 311.7 °C is wide, this indicates that the melting of the product was made over a wide range of temperature: the impurity analyzed is then contaminated by other impurities.

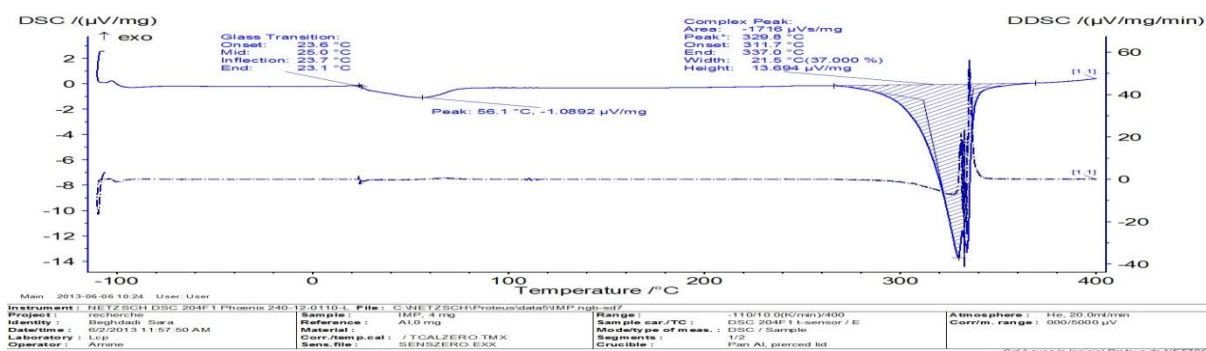


Figure 2. Thermogram of the DSC analysis of the isolated impurity.

### -Structural identification by spectroscopic analyzes

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3235 (N-H primary amide), 1716 and 1676 (C=O), 1493 and 1447 (aromatic C=C), 1074 and 1028 (aromatic C-H), 694 (aromatic C-H). **RMN H<sup>1</sup>: (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm):** 7.07 (s, 10H, 10x Ar-H), 7.78 (s, 4H, 4x NH).

The RMN H<sup>1</sup> spectrum of the isolated impurity is shown in figure 2.

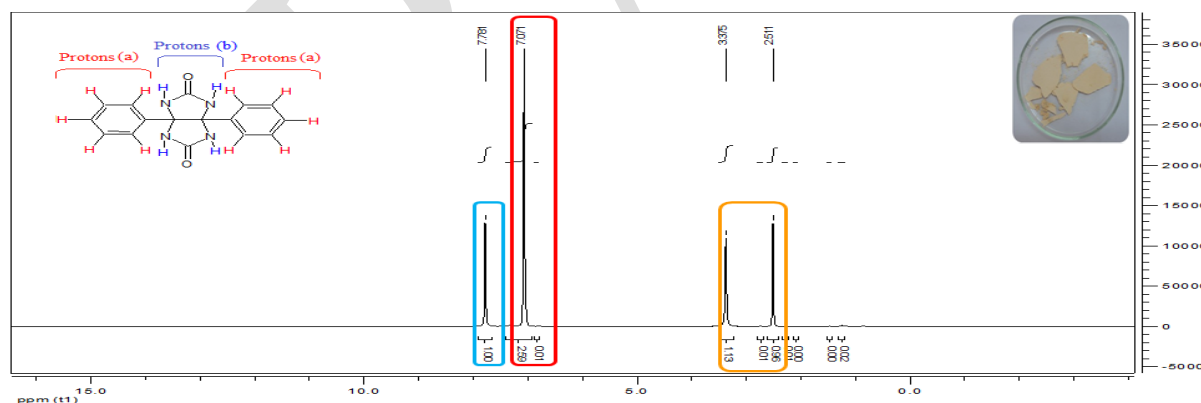


Figure 2. RMN H<sup>1</sup> spectrum of the isolated impurity.

The ratio of the integrated area of the 2 peaks (2.59 / 1.00 = 2.59) is equal to the ratio of the number of protons equivalent (a) to (b) (= 10/4).

The correlation of the IR and H NMR spectra thus made it possible to identify the structure of the impurity which corresponds to the impurity D described in the Eur. Ph 9<sup>th</sup> Ed monograph.

### Analytical control of synthesized phenytoin

**Characters:** The phenytoin substance is practically insoluble in water, fairly soluble in 96% ethanol, very slightly soluble in methylene chloride. and dissolve in dilute solutions of alkali hydroxides.

The results obtained meet the standards of the monograph described in the European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> edition.

## Identification

### -Thermal Analysis: Differential Scanning Calorimetry

The thermograms of the DSC of synthesized active substance, phenytoin, is shown in figure 3.

The thermogram obtained during a heating cycle each show an acute endothermic peak which corresponds to the melting point of the molecule, the area under the curve (melting enthalpy) of the peak is small (270.3  $\mu\text{V}/\text{mg}$ ), reflecting the purity of the product. Another larger endothermic peak appears at higher temperatures, corresponding to the decomposition of the molecule.

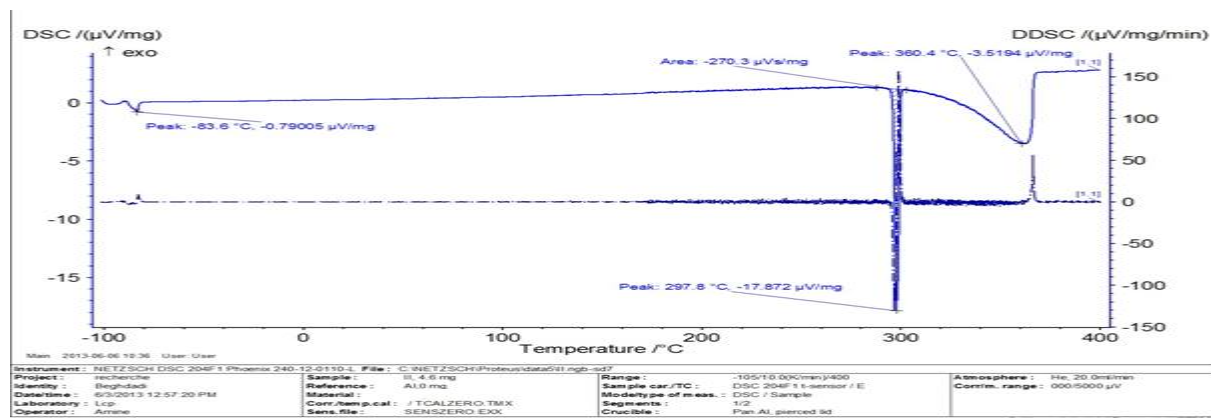


Figure 3. Thermogram of the DSC analysis of phenytoin.

### -Structural identification by spectroscopic analyzes

**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3477 (N-H), 3275 and 3209 (N-H), 3072 (aromatic C-H), 1773 (C=O aromatic of hydantoin), 1717 (combinaison C=O and N-H of imide), 1492 and 1449 (aromatic C-C), 1401 (C-N). **RMN  $\text{H}^1$ : (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm):** 7.33 to 7.43 (m, 10H, 10x aromatic C-H), 9.32 (s, 1H,  $\text{N}_3$ -H), 11.11 (brs, 1H,  $\text{N}_1$ -H).

The presence of a broad signal at 11.11 ppm oriented toward the presence of a mobile proton responsible for the tautomerism of the phenytoin molecule, the value of its chemical shift is not deterministic because the region of the signals due to protons of alcohols or amides is strongly shifted to the left when it comes to moving protons.

we might think that the mobile proton is the one linked to the nitrogen in position 3 (the most acidic proton), which is not the case. Indeed, the mobility of the proton (very acidic) in position 3 is blocked by the deuterated DMSO which forms a hydrogen bond between its oxygen and the proton in  $\text{N}_3$ .

Therefore the 11.11 ppm wide signal corresponds to the proton at  $\text{N}_1$ , a proton more deblinded because it is surrounded only by a single carbonyl group.

### Purity test: Search for Related Substances by HPLC

The chromatograms obtained for the various analyzes of the "related substances" section of the monograph listed in Eur. Ph. 9th ed. are reported as follows:

Phenytoin : Test solution: 1st and 2nd injections: Figure 4. Control solution (a): 1st and 2nd injections: Figure 5.

Impurity D: Control solution (b): 1st and 2nd injections: Figure 6.

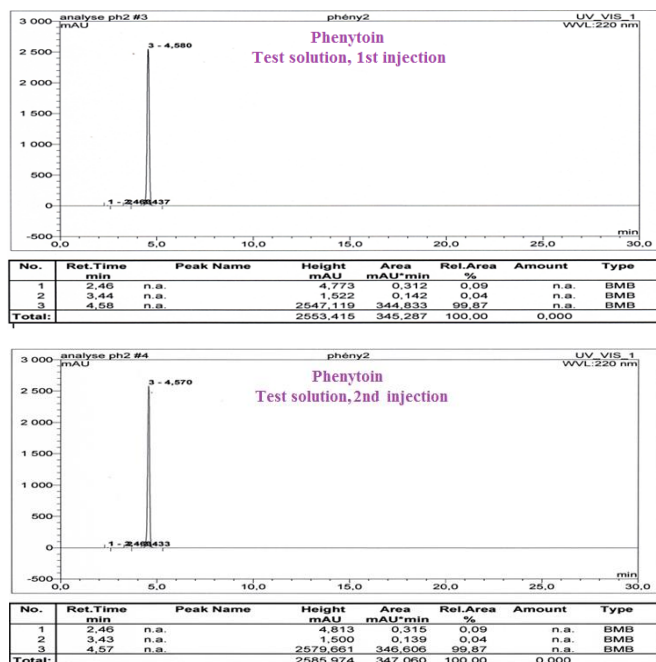


Figure 4. Chromatograms of the test solution of phenytoin (1st and 2nd injections).

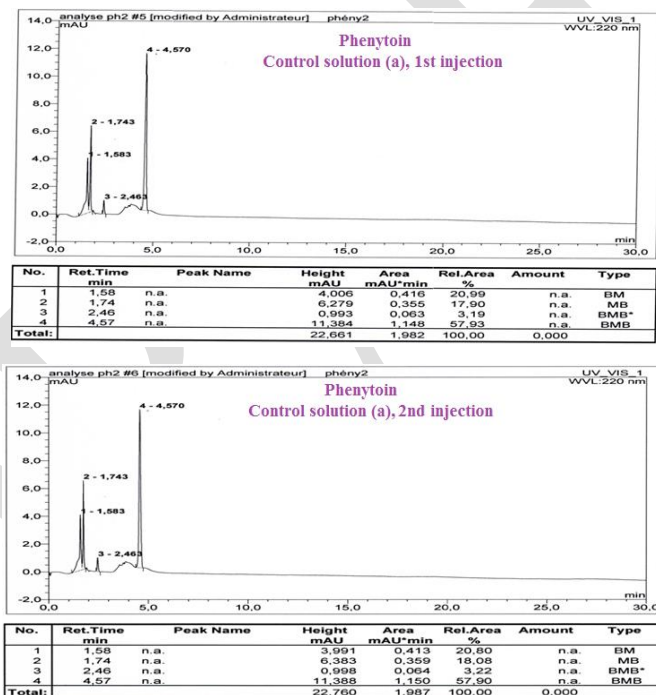


Figure 5. Chromatograms of the control solution (a) of phenytoin (1st and 2nd injections).

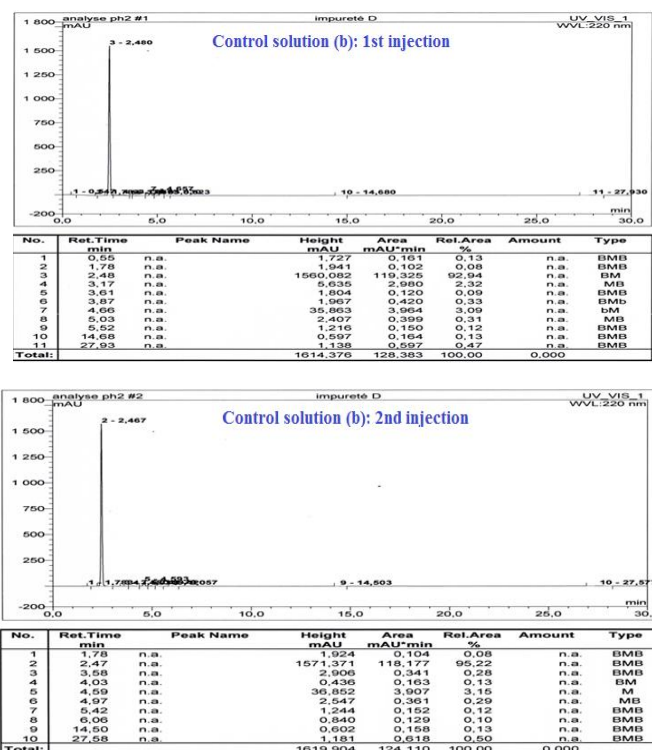


Figure 6. Chromatograms of control solution (b) representing impurity D (1st and 2nd injections).

**Attribution of the peaks:** each solution was injected twice, and we took the average.

**Identification of phenytoin:**

Chromatographic data on phenytoin is shown in table 1.

The monograph of Eur. Ph. 9th Ed. recommends a retention time of phenytoin about 4 min.

Table 3. Chromatographic data on phenytoin

	Phenytoin (Test solution)	
	Retention time (min)	4,58
	<b>4,575</b>	
Area under the curve (mAU/min)	344,833	346,606
	345,719	

**Identification of impurity D:**

The calculated retention times correspond to those of the impurity D present in the control solution (b) prepared from the impurity isolated during the synthesis, in the test solution for phenytoin.

They make it possible to identify the impurity D present in the active substance synthesized.

Table 2. Chromatographic data on impurity D

	Impurity D (Control solution (b))		Test solution	
Retention time (min)	2,48	2,47	2,46	2,46
	<b>2,475</b>		<b>2,46</b>	
Relative retention*	<b>0,535</b>		<b>0,537</b>	
Area under the curve (mAU/min)	119,325	118,177	0,312	0,315
	118,751		0,3135	

\* Relative retention (also known as unadjusted retention) of impurity D compared to phenytoin.

### Limit in individual impurities

Peak corrected area is calculated as follows:

$$\text{Corrected area of the peak} = \text{Area of the peak} \times \text{correction factor defined by the Eu. Ph. (1)}$$

According to the European Pharmacopoeia, the impurity correction factor  $D = 1.7$

**Table 3.** Limits of the two active substances in impurity D.

Synthetic active Substance	Area of the peak of impurity D (Test solution)		Corrected area of the peak of impurity D	Area of the main peak of the control solution (a)	
	0,312	0,315		1,148	1,150
Phenytoin	Average= 0,3135		0,53295	Average= 1,149	

### Total limit of impurities

Exclusion limit: 0.5 times the area of the main peak of the chromatogram obtained with the reference solution (a) Exclusion limit of the chromatogram of phenytoin =  $0.5 \times 1.149 = 0.5745$ . The area of all peaks, other than the main peak corresponding to phenytoin, of the chromatogram of the control solution (a) of phenytoin is below the exclusion limit.

### Discussion

The monograph of the European Pharmacopoeia 7th edition recommends the following values:

Relative retention with respect to phenytoin (retention time = approximately 4 min) of impurity D is about 0.6.

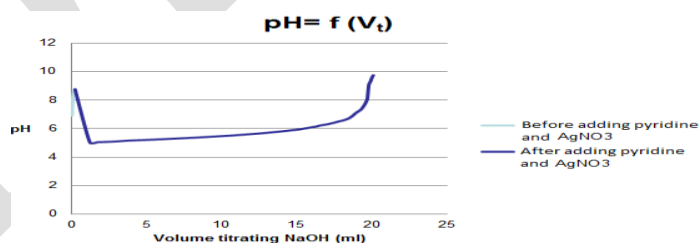
Limits of presence of related substances:

- Impurity D: at most the surface of the main peak of the chromatogram obtained with the reference solution (a) (0.1%).
- Total impurities: not more than 5 times the area of the main peak of the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5%).
- Exclusion limit: 0.5 times the area of the main peak of the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05%).

The results of the experimental analysis are appropriate to the standards of the European Pharmacopoeia 9th edition monograph subject to other specified impurities that could not be identified with certainty.

### Assay

The potentiometric titration curve for phenytoin is shown in figure 7.



**Figure 7.** Potentiometric titration curve of phenytoin.

According to the monograph of the Japanese Pharmacopoeia 16th edition:

1 ml of 0.1 M sodium hydroxide corresponds to 25.23 mg of C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Table 4.** results of the assay of phenytoin.

Synthetic active substance	Desiccated test sample	Equivalent volume (ml)	Content (%)
Phenytoin	500 mg	19,9	100.41%

The monograph the Japanese Pharmacopoeia 16th edition requires a minimum content of 99.0% calculated from the dried substance. The calculated content of the synthesized phenytoin is appropriate to Japanese Pharmacopoeia standard.

## CONCLUSION

The synthesis of phenytoin was effective but the yield was low.

Pharmacopoeial and extra pharmacopoeial methods have proved their importance in the control of synthesized phenytoin.

The synthetic process of phenytoin has resulted in an active substance of comparable quality that meets current requirements for the production and control of the pharmaceutically active substances.

## REFERENCES

- [1] Agarwal O.P 2009. Advanced practical organic chemistry. 26<sup>th</sup> edition. India: By Satyendra Rastogi "mitra" for Krishna.
- [2] Ashutosh K. Advanced Practical Medicinal Chemistry 2004. New Delhi : By New Age International.
- [3] Bruno T. Svoronos N 2006. CRS Handbook of fundamental Spectroscopic Correlation Charts. By Taylor and Francis Group, LLC.
- [4] Coblenz Society, Inc. "Evaluated Infrared Reference Spectra" in : WebBook of chemistry NIST, Standard Database NIST. [online]. N°69. National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg MD, RL : <http://webbook.nist.gov>, (2018).
- [5] Enguehard-Gueiffier C. Gueiffier A. chapter 1. Antiépileptic. in : Treatise on Therapeutic Chemistry: Drugs active on the central nervous system. France : Lavoisier; 2011. P. 3- 91.
- [6] Kinugasa S, Tanabe K, Tamura T. Spectral Database for Organic Compounds SDBS . [En ligne]. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). Japan. l'URL: [http://sdb.sriodb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdb.sriodb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)
- [7] Mistry BD. A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry. Jaipur: by Oxford Book Company; 2009.



## Kalayın kromatografik tayini için metot geliştirme

Kuddusi Karaboduk

Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ankara, Türkiye

kuddusi@gazi.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, uzun yıllardır toksik özellik gösterdiği bilinen kalayın (Sn) kromatografik analizi için kuarsetin (Q) ile oluşturmuş olduğu kompleks kullanılmış ve HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) ile analizi gerçekleştirilmiştir. Q/Sn kompleksinin stokiyometrik oranı spektroskopik ve kromatografik olarak (Q/Sn) 1:1 olarak bulunmuştur. Kompleks oluşum süresinin 1 saat olduğu belirlenmiştir. Q/Sn kompleksinin maksimum adsorpsiyon yaptığı dalga boyu 440 nm'dir. UV-Visible detektör ve ODS 80TS (4,6 mm ID, 25,0 cm uzunluk) kolon kullanılarak yapılan analizde diğer kromatografik şartlar; dalga boyu: 440 nm, akış hızı: 0,8 mL/dk, mobil faz: metanol (pH= 4,0, fosforik asit ile) ve enjeksiyon miktarı: 25 µL şeklindedir. Optimize edilen şartlar altında, yöntemin tayin aralığı 0,05-8,00 µM, tayin sınırı ise 0,012 µM olarak belirlenmiştir. Yöntem, Ankara'da bulunan bir gölün üç farklı bölgesinden alınan su numunelerine uygulanmıştır. Sonuçlar atomik absorpsiyon spektroskopisi ile elde edilen sonuçlarla uyum içindedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kalay; Kuarsetin; Kompleks; HPLC

### Method development for the chromatographic determination of tin.

#### Abstract

In this study, the complex formed by quercetin (Q) for the chromatographic analysis of tin (Sn), which is known to have toxic properties for many years, was used and analyzed by HPLC (high pressure liquid chromatography). The complex formation time was determined to be 1 hour. The stoichiometric ratio of the Q/Sn complex was found as spectroscopic and chromatographic (Q/ Sn) 1:1. The maximum adsorption wavelength of Q/Sn complex is 440 nm. Other chromatographic conditions in the analysis using UV-Visible detector and ODS 80TS (4.6 mm ID, 25.0 cm length) column; wavelength: 440 nm, flow rate: 0.8 mL/min, mobile phase: methanol (pH = 4.0, with phosphoric acid) and injection amount: 25 µL. Under optimized conditions, the determination range of the method was 0.05-8.00 µM and the limit of determination was 0.012 µM. The method was applied to water samples taken from three different regions of a lake in Ankara. The results are consistent with the results obtained by atomic absorption spectroscopy.

**Keywords:** Tin; Quercetin; Complex; HPLC

### GİRİŞ

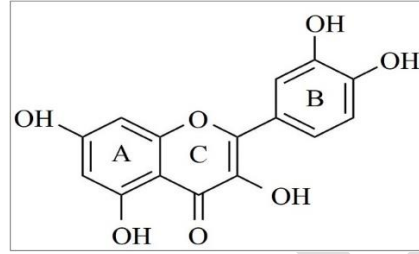
Ağır metaller, doğrudan ya da biyobirikim yoluyla insan sağlığını tehdit eden toksik gruplardan biridir (Zhang ve ark., 2019). Ağır metaller, çevrede yüksek biyobirikim potansiyeline sahip oldukları için toksisiteleri de gün geçtikçe artar (Guo ve ark., 2017, Xu ve ark., 2018). Günümüzde, madencilik, çelik üretimi ve galvanizlemenin meydana getirdiği ağır metal kirliliği, insan sağlığını ve ekosistemi tehdit eder hale gelmiştir. Ağır metal iyonları çok eser miktarda da olsa hücresel organelleri veya bileşenleri etkileyebilir ve oksidatif strese neden olabilir (Yin ve ark., baskıda).

Kalay 5000 yıldır insanoğlu tarafından kullanılan bir elementtir. Günümüzde, alaşımlarda, gıda kaplarında, pillerde ve pigmentlerde yoğunlukla kullanılmaktadır. Eğer ortam asidikse kalayın gıdaya ya da suya geçmesi oldukça kolaylaşır. Böylece ortamdaki derişimi artan kalay, memelilerde zehirlenmelere sebep olabilir, zehirlenme belirtileri arasında, kusma, ishal, göz ve burunda oluşan tahriş vardır. Ayrıca, yüksek derişimlerdeki kalay, DNA'ya da zarar verebilmektedir (Deplonde ve ark., 2018; Eisler, 1989; Panhwar ve Memon, 2013). Antimon ve talyum gibi toksit etkiye sahip olan kalayın hızlı, hassas ve seçici analizi oldukça önemlidir (Biata ve ark., 2019).

Kuarsetin (3,3',4',5,7-pentahidroksi flavon), sebze (örneğin; soğan, brokoli), meyve (örneğin; elma, yaban mersini) ve tahıllarda bol miktarda bulunur (Ghayour ve ark., 2019). Birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde rol oynar (Li ve ark., 2019). Modern farmakolojik çalışmalar kuarsetinin insan sağlığı üzerine birçok faydalı etkisi olduğunu göstermiştir. Kuarsetinin faydalı etkileri arasında, kardiyovasküler koruma,

ülseri önleme, anti-alerjik, anti-enflamatuar ve anti-diyabetik etkiler gösterme ve katarakt tedavisi vardır (Shi ve ark., 2019). Kuarsetin ayrıca mide kanseri, kolon kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde çok çeşitli apoptotik etkiler göstermektedir. Spesifik olarak, kuarsetin hücre ölümünü artırır ve hormon düzenlemesi ile ilişkili olan meme kanseri, yumurtalık kanseri ve rahim ağzı kanserinin hücre çoğalmasını önler (Park ve ark., 2019).

Kuarsetin etkili bir kompleksleştiricidir (Şekil 1), kobalt, bakır, lantanit, kadmiyum, magnezyum ve alüminyum gibi birçok metalle olan kompleksleri sentezlenmiş ve antioksidan etkileri incelenmiştir. (Fang ve ark., 2019; Ghosh ve ark., 2015; Mahar ve ark., 2018; Ravichandran ve ark., 2014; Yılmaz ve Pekin, 2017; Vimalraj ve ark., 2018). Ayrıca, Dehghan ve Khoshkam (2012) tarafından Q/Sn kompleksi sentezlenmiş ve antioksidan özelliklerini incelemiştir. Lian ve ark.'ları (2004) alüminyumun kuarsetin ile olan kompleksinden faydalanarak, HPLC ile alüminyum analizi yapmışlardır. Yapılan literatür taramasında çalışmaların Q/Sn kompleksinin analizi üzerine yoğunlaştığı görülmüştür.



Şekil 1. Kuarsetinin moleküler yapısı

Bu çalışmanın amacı, toksik etkiye sahip kalayın, insan için faydası kanıtlanmış kuarsetin ile oluşturduğu kompleksten faydalanarak hassas, seçici ve basit bir şekilde analizini yapmaktır. Bu amaçla HPLC-vis kullanılmıştır. Gerçek numunelere standart madde ekleme yoluyla kalay analizi başarılı bir şekilde yapılmıştır. Ayrıca aynı numuneler AAS ile analiz edilmiş ve yöntemin su numunelerine uygulanabilirliği yapılan istatistiksel çalışmalarla gösterilmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### Kimyasallar

Kuarsetin (HPLC saflıkta) Sigma-Aldrich, kalay (1000 ppm, ICP standart madde, %2'lik nitrik asit içerisinde) Merck firmasından temin edilmiştir. Metanol (HPLC saflıkta) ve diğer tüm kimyasallar Sigma firmasından temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Tüm çözeltilerin hazırlanmasında distile saf su (18,2 MΩ cm) kullanılmıştır.

### Cihazlar

Spektroskopik analizler BioTek Epoch 2 (microplate reader) ile kromatografik analizler ise Agilent 1200 series marka modelli HPLC-vis cihazı ile yapılmıştır. Kolon olarak TSK jel ODS 80 TS kullanılmıştır (TOSOH Bioscience).

### Q/Sn kompleksinin hazırlanışı

0,0302 g Q (2 mM) tartılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve toplam hacim metanolla 50 mL yapılmıştır, 2 mM kalay çözeltisi ise 1000 ppm'lik kalay çözeltisinden metanolla seyreltilerek elde edilmiştir. Daha sonra stokiometrik oran 1:1 olacak şekilde aynı hacimde alınarak başka bir tüpte 1 saat süreyle kompleksleşme sağlanmıştır. 1 mM Q/Sn çözeltisi metanolla seyreltilerek kullanılmıştır.

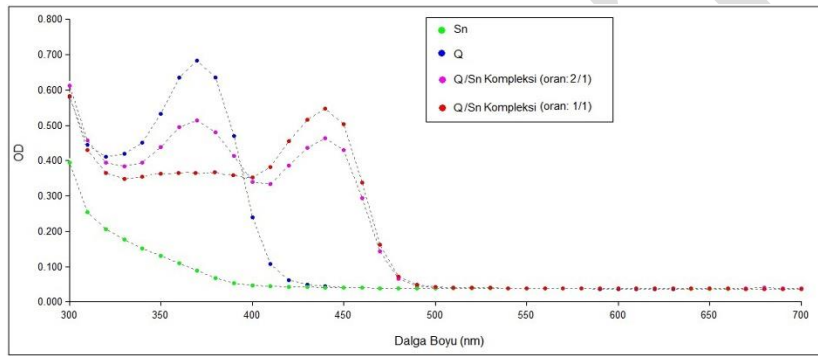
## Analitik Prosedür

Kromatografik analiz için UV dedektör kullanılmıştır. Dedektör, Epoch 2 cihazından elde edilen veriler doğrultusunda maksimum absorbasın elde edildiği 440 nm'ye ayarlanış ve 0,8 mL/dk akış hızında, ODS kolonunda ve pH=4,0 metanol mobil fazında ile analiz yapılmıştır. Q/Sn kompleksinin kolondan çıkış zamanı 4,15 dk civarındadır.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Q/Sn Kompleksinin Spektroskopik Olarak Belirlenmesi

Q/Sn kompleksinin spektroskopik olarak incelenmesi için Q (0,1 mM), Sn (0,1 mM) ve stokiometrik oranları (Q/Sn) 2:1 (0,1 mM:0,05 mM) ve 1:1 (0,1 mM:0,1 mM) olan komplekslerin 300-700 nm dalga boyu arasında dalga boyu taraması yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 2'de ki gibidir.



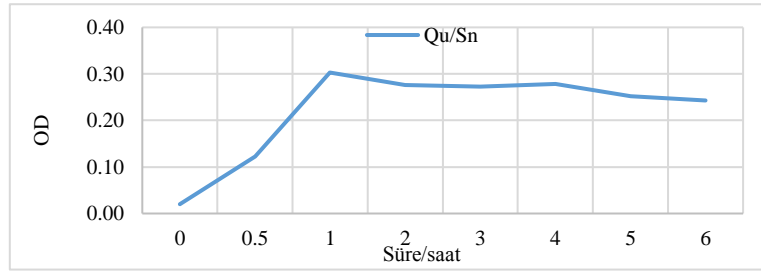
Şekil 2. Q, Sn ve Q/Sn komplekslerinin dalga boyu taramaları,

Q: 0,1 mM, Sn: 0,1 mM, Q/Sn: 1:0,5 (0,1 mM: 0,05 mM) ve Q/Sn: 1:1 (0,1 mM: 0,1 mM)

Şekil 1 incelendiğinde, 300-700 nm dalga boyu arasında kalaya ait bir absorpsiyon piki gözlenmemiştir. Kuarsetin ise 370 nm'de bir pik vermiştir. Ortama kalay ilave edildiğinde 370 nm'de olan kuarsetine ait absorpsiyon pikinin OD değerinde bir azalma ile eş zamanlı olarak 440 nm'de yeni bir pik oluşmuş ve dalga boyunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu pik Q ve Sn arasında bir kompleks oluştuğunu göstermektedir (Dehghan ve Khoshkam, 2012). Ayrıca farklı oranlarda kalay ilavelerine rağmen absorpsiyon pikinin dalga boyunda bir değişimin olmaması ortamda tek bir türün varlığını belirtmektedir. Kalay, kuarsetine C halkasında bulunan 3-hidroksi ve 4-karbonil grubundan bağlanmıştır (Takamura ve Sakamoto, 1978). Kalay ilavesi ile molar oran 1:1 olduğunda 370 nm'de olan kuarsetin pikinin yok olması ve Q/Sn pikinin 2:1 oranından daha fazla OD'ye sahip olması, 1:1 stokiometrik oranı destekler niteliktedir. Bundan sonraki çalışmalarda 1:1 stokiometrik oran kullanılmıştır.

### Kompleksleşme Süresinin Spektroskopik Olarak Belirlenmesi

İdeal kompleksleşme süresinin belirlenmesi için 1:1 molar oranda hazırlanmış Q/Sn kompleksinin farklı sürelerde OD değerleri Epoch 2 cihazıyla okunmuş ve sonuçlar Şekil 3'de verilmiştir.

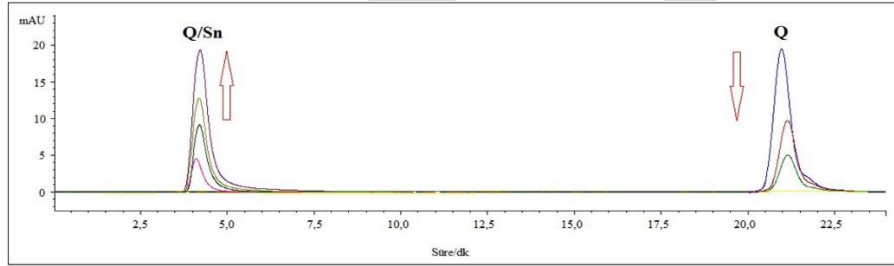


Şekil 3. Q/Sn (0,1 mM:0,1mM) kompleksinin OD değerinin zamanla değişimi

Şekil 3’de de görüldüğü gibi Q/Sn kompleksi  $t_0$  anında bir OD değerine sahiptir. Bu değer 1 saate kadar artmakta ve 1 saatte maksimum değere ulaşmaktadır. 1 saatten sonra çalışma 6 saate kadar devam ettirilmiştir. Ancak 1 saatten sonra çok az da olsa bir azalma meydana gelmiş ve bu azalmanın devam ettiği görülmüştür. Bu durumda Q/Sn kompleksinin oluşum süresi 1 saat olarak belirlenmiştir.

### Kromatografik Olarak Q/Sn Kompleksinin İncelenmesi

Q ve Q/Sn kompleksinin kromatografik olarak incelenmesi için spektroskopik olarak elde edilen maksimum dalga boyları kullanılmıştır. Bu dalga boyları, Q ve Q/Sn için sırasıyla 370 ve 440 nm’dir. Kromatografik şartlar her iki dalga boyu için aynıdır (mobil faz: pH=4 metanol çözeltisi (fosforik asit ile), kolon: ODS 80TS, akış hızı: 0,8 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 25  $\mu$ L). Şekil 4’de verilen kromatogram kuarsetin (370 nm) ve farklı oranlarda kalay ilaveleri ile elde edilen Q/Sn kompleksine (440 nm) aittir.



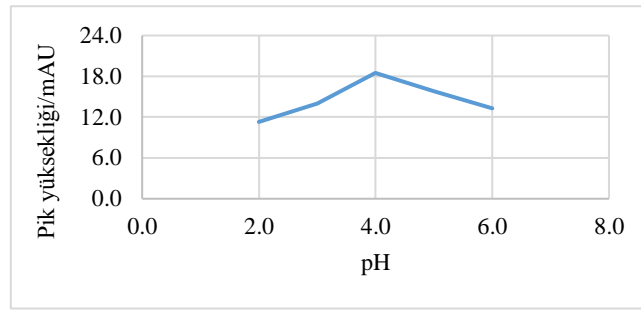
Şekil 4. Kuarsetin ve kalay ilaveleri ile oluşan Q/Sn kompleksine ait kromatogram,

Q: 2,0  $\mu$ M; Sn: 0,5  $\mu$ M, 0,67  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M; Q için dalga boyu:370 nm; Q/Sn için dalga boyu: 440 nm; kolon: ODS 80TS; mobil faz: pH=4,0 metanol (fosforik asit ile), akış hızı: 0,8 ml/dak; sıcaklık: 25  $^{\circ}$ C; enjeksiyon miktarı: 25  $\mu$ L

Şekil 4 incelendiğinde kuarsetinin maksimum absorpsiyon dalga boyunda (370 nm) 21. dk’da pik verdiği gözlemlenmiştir ve 2  $\mu$ M kuarsetine ait kromatogram en yüksek pik yüksekliği değeri (mAU) ile elde edilmiştir. Ancak 440 nm’de kuarsetine ait bir pik gözlenmemiştir. 2  $\mu$ M kuarsetin 0,5  $\mu$ M, 0,67  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M, 2,0  $\mu$ M kalay ile muamele edildiğinde 440 nm’de 4,15. dk civarında artan bir pik elde edilmiştir. Aynı çözeltiler 370 nm’de incelendiğinde ise 21. dk’da elde edilen pikin azaldığı ve oran 1:1 olduğunda yok olduğu görülmüştür. Bu sonuç spektroskopik olarak elde edilen değerle aynı değerdedir.

### Q/Sn Kompleksinin Kromatografik Analizine pH’nın Etkisi

Bu çalışma için 1,75  $\mu$ M Q/Sn kompleksinin analizinde mobil faz olarak kullanılacak olan metanolün pH değerinin Q/Sn pikine olan etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 5’de verilmiştir.

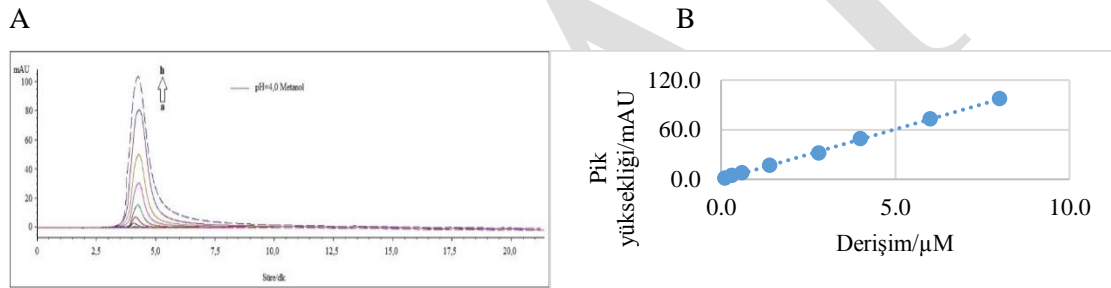


Şekil 5. Q/Sn kompleksinin pik yüksekliğinin mobil faz pH'sı ile değişimi

pH=2,0-6,0 arasında yapılan çalışmada, artan pH değeri ile pik yüksekliğinin (mAU) pH=4,0'a kadar arttığı ve maksimum değer pH=4,0'da elde edildiği görülmüştür. pH değeri 4,0'ın üzerine çıktığında ise daha düşük yükseklikte pikler elde edilmiştir. Q/Sn kompleksinin analizi için mobil fazın pH değerinin 4,0 olmasına karar verilmiştir.

### Tayin Aralığının Belirlenmesi

Kalayın kromatografik analizi için doğrusal çalışma aralığını belirlemek için artan derişimlerdeki Q/Sn kompleksinin kromatogramları alınmış ve daha sonra derişime karşı pik yükseklikleri (mAU) grafiği çizilmiştir (Şekil 6A ve Şekil 6B)



Şekil 6. Artan derişimlerdeki Q/Sn kompleksine ait kromatogram (A), Q/Sn derişimi ve pik yüksekliği arasındaki lineer ilişki (B), Q/Sn kompleksi derişimleri (a→h): 0,05 ,0,30, 0,60, 1,40, 2,80, 4,0, 6,0 8,0 µM

Çalışma sonunda 0,05-8,0 µM arasında Q/Sn kompleksinin derişim ve pik yükseklikleri arasında lineer bir ilişki olduğu bulunmuştur. Bu lineer ilişkiye ait doğru denklemi aşağıdaki (1) gibidir.

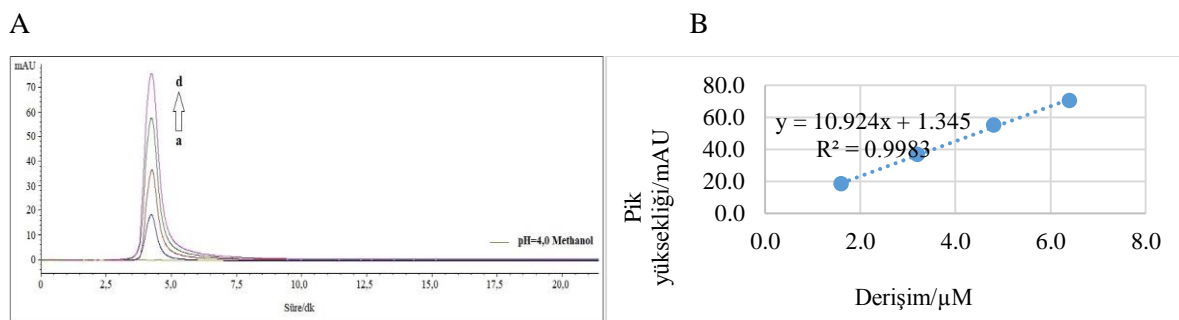
$$y = 12,173x - 0,3516 \quad (R^2 = 0,9992) \quad (1)$$

Bu çalışmaya ait tayin sınırı (LOD) 0,012 µM'dır.

Literatür taramasında kalayın kuarsetin ile analizine rastlanılmamıştır. Ancak, kalayın, ortamdan ekstraksiyon yapılmak suretile bir analizi söz konusudur. Hu ve ark. (2003) tarafından yapılan bu çalışmada, kalay, tetra-(2-klorofenil)-porhidrin (T2-CPP) ile ekstrakte edilmiş ve ters faz-HPLC ile analiz edilmiştir.

### Kalayın Kromatografik ve Spektroskopik Analizi

Öncelikle derişimi bilinen kalay çözeltileri kuarsetin ile 1 saat süre ile kompleksleştirildikten sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz için 1,6-6,4 µM arasındaki kalibrasyon grafiği, Q/Sn kompleksi derişimine karşı pik yükseklikleri ile oluşturulmuştur elde edilen kromatogram ve kalibrasyon grafiği Şekil 7A ve Şekil 7B'deki gibidir.



Şekil 7. Farklı konsantrasyondaki Q/Sn kompleksine kromatogram (A), Q/Sn kompleksine ait kalibrasyon grafiği (B); Q/Sn derişimleri (a→d): 1,60 μM, 3,2 μM, 4,8 μM, 6,4 μM,; dalga boyu: 440 nm; kolon: ODS 80TS; akış hızı 0,8 mL/dk; mobil faz: pH=4,0 metanol (fosforik asit ile); enjeksiyon miktarı: 25 μL

Elde edilen kalibrasyon grafiği ile derişimi bilinen üç farklı sentetik numunenin analizi yapılmış ve istatistiksel değerlendirmesi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Sentetik numunelerdeki kalay analizi sonuçları ve sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Numune no	Sn derişimi (μM)	Bulunan ortalama Sn derişimi* (μM)	Standart sapma	% RSD	% Geri kazanım	Güven aralığı (μM) (%95)
1	1,80	1,84	0,04	2,02	101,94	1,84±0,03
2	3,00	3,11	0,08	2,68	103,72	3,11±0,07
3	5,00	5,14	0,06	1,20	102,70	5,14±0,05

\*n=5

Sentetik numunelerdeki kalay analizlerinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde yüzde geri kazanımın %101,94 ile %103,72 arasında olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlardan sonra gerçek numune analizine geçilmiştir. Gerçek numune olarak Ankara’da bulunan bir gölün üç farklı bölgesinden alınan numunelere belli derişimde kalay ilave edilmiş ve kuarsetinle kompleksleştirilen kalay hem kromatografik hem de spektroskopik olarak analiz edilmiştir. Önerilen yöntemin doğruluğu AAS’den elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Su numunelerindeki kalay miktarının HPLC ve AAS ile analizlerine ait sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmesi

Göl lokasyonu	Eklenen Sn Derişimi (μM)	Önerilen metot ile bulunan ortalama* Sn derişimi (μM)	AAS ile bulunan ortalama* Sn derişimi (μM)	%RSD (HPLC)	%RSD (AAS)	F testi	F testi tablo değeri (%95)
1	3,50	3,54	3,51	1,54	2,49	2,56	2,78
2		3,53	3,53	3,19	2,12	2,25	
3		3,53	3,52	1,38	2,07	2,23	

\*n=5

HPLC ve AAS kullanılarak göl sularında yapılan kalay analizi sonuçları incelediğinde sonuçların birbirleri ile tutarlı olduğu görülmüştür. Elde edilen % RSD değerleri en fazla 3,19 mertebesinde kalmıştır. Ayrıca yapılan F testi ile de HPLC ile elde edilen sonuçların referans metot olarak kullanılan AAS ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buradan elde edilen sonuçlar, su örneklerindeki kalayın kuarsetinle kompleksleştikten sonra HPLC ile analiz edilebileceğini göstermektedir.

### Girişim Çalışmaları

3 µM kalay analizine hangi anyon ya da katyonun etki ettiğinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, öncelikle Q/Sn kompleksine ait pik yükseklik (mAU) değeri HPLC ile belirlenmiştir, daha sonra ortama, su numunelerinde bulunması muhtemel anyon ve katyonlar teker teker artan derişimlerde ilave edilmiştir. Pik yüksekliğinde %5 civarında bir değişiklik ya da 4,15. dakikada çıkan Q/Sn pikinin morfolojik olarak bozulması ilave edilen anyon ya da katyon için üst sınır olarak kabul edilmiştir. Buna göre 3 µM kalay analizine etki eden anyon ve katyonların tolerans limitleri; 300 kat K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, (NO<sub>3</sub>)<sup>-</sup>, (SO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> ve F<sup>-</sup>, 15 kat Cd<sup>2+</sup>, 10 kat Co<sup>2+</sup>, 5 kat Cu<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup>, 2 kat Al<sup>3+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> şeklindedir.

Önerilen metot ile kalayın kromatografik olarak analiz edilebileceği ortaya konulmuştur. HPLC bulunan laboratuvarlar için metal analizine yeni bir bakış getirilmiştir. Ayrıca düşük miktarlarda yapılan analiz, önerilen metodun hassasiyetini de ortaya koymuştur. Ayrıca daha önce yapılan HPLC ile kalay analizi ile karşılaştırıldığında daha basit bir yöntem önerilmiştir. Kolaylıkla temin edilebilecek bir kompleksleştirici (kuarsetin) sayesinde sadece bir saat oda sıcaklığında uygulanacak bir ön işlem ile kalayın analiz edilebilmesi mümkündür.

### KAYNAKLAR

- Biata NR, Mashile GP, Ramontja J, Mketi N, Nomngongo PN, 2019. Application of ultrasound-assisted cloud point extraction for preconcentration of antimony, tin and thallium in food and water samples prior to ICP-OES determination. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76: 14-21.
- Deblonde GJP, Lohrey TD, An DD, Abergel RJ, 2018. Toxic heavy metal – Pb, Cd, Sn – complexation by the octadentate hydroxypyridinonate ligand archetype 3,4,3-LI(1,2-HOPO). *New Journal of Chemistry*, 42: 7649-7658.
- Dehghan G, Khoshkam Z, 2012. Tin(II)–quercetin complex: Synthesis, spectral characterisation and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 131: 422-426.
- Eisler R, 1989. Tin hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. *Biological Report*, 85(1.15): 1-53.
- Fang Y, Zhang Y, Han Q, Jia M, Zhang M, Wang L, Tan Y, Cao Z, Deng Y, 2019. Complexation and solvent extraction behaviour towards lanthanide ions with quercetin. *Inorganic Chemistry Communications*, 100: 70-74.
- Ghayour Y, Hosseini SMH, Eskandari MH, Esteghlal S, Nekoei AR, Gahruei HH, Tatar M, Naghibalhossaini F, 2019. Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 87: 394-403.
- Ghosh N, Chakraborty T, Mallick S, Mana S, Singha D, Ghosh B, Roy S, 2015. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151: 807-813.
- Guo J, Kang Y, Feng Y, 2017. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. *Journal of Environmental Management*, 203 278-285.
- Hu Q, Yang G, Ma J, Liu J, 2003. Simultaneous determination of tin, nickel, lead, cadmium and mercury in cigarette material by solid phase extraction and HPLC. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 24(10): 1433-1436.

- Li Y, Chen M, Wang J, Guo X, Xiao L, Liu P, Liu L, Tang Y, Yao P, 2019. Quercetin ameliorates autophagy in alcohol liver disease associated with lysosome through mTOR-TFEB pathway. *Journal of Functional Foods*, 52: 177-185.
- Lian H, Kang Y, Bi S, Arkin Y, Shao D, Li D, Chen Y, Dai L, Gan N, Tian L, 2004. Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Talanta*, 62: 43-50.
- Mahar N, Hulio AA, Panhwar QK, Afridil HI, Mahar I, Mallah SA, 2018. Synthesis and antioxidant activity of mixed ligand complex of quercetin and aspartic acid with cobalt(II). *Medicinal Chemistry*, 8(9): 253-258.
- Panhwar QK, Memon S, 2013. Synthesis, characterization and antioxidant study of Tin(II)-rutin complex: Exploration of tin packaging hazards. *Inorganica Chimica Acta*, 407: 252-260.
- Park S, Lim W, Bazer FW, Whang K-Youn, Song G, 2019. Quercetin inhibits proliferation of endometriosis regulating cyclin D1 and its target microRNAs in vitro and in vivo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 63: 87-100.
- Ravichandran R, Rajendran M, Devapiriam D, 2014. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chemistry*, 146: 472-478.
- Shi G-J, Li Y, Cao Q-H, Wu H-X, Tang X-Y, Gao X-H, Yu J-Q, Chen Z, Yang Y, 2019. In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109: 1085-1099.
- Takamura K, Sakamoto M, 1978. Spectrophotometric studies on flavonoid-copper(II) complex in methanol solution. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8): 2291-2297.
- Vimalraj S, Rajalakshmi S, Preeth DR, Kumar SV, Deepak T, Gopinath V, Murugan K, Chatterjee S, 2018. Mixed-ligand copper(II) complex of quercetin regulate osteogenesis and angiogenesis. *Materials Science & Engineering C*, 83: 187-194.
- Xu Y, Seshadri B, Sarkar B, Wang H, Rumpel C, Sparks D, Farrell M, Hall T, Yang X, Bolan N, 2018. Biochar modulates heavy metal toxicity and improves microbial carbon use efficiency in soil. *Science of the Total Environment*, 621: 148-159.
- Yin K, Wang Q, Lv M, Chen L, 2019. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 360: 1553-1563.
- Yılmaz DÇ, Pekin M, 2017. Potentiometric and Chromatographic Study of Cu(II) and Al(III) Complexes of Quercetin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2): 330-337.
- Zhang Y, Ren T, He J, Tian H, Jin B, 2019. Acute heavy metal toxicity test based on bacteria-hydrogel. *Colloids and Surfaces A*, 563: 318-323.



## Diptera fauna distribution and its relation with some physico-chemical parameters of Göksu Stream (Istanbul/Turkey)

Esra Albayrak<sup>1\*</sup>, Serap Kosal Şahin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istanbul University, Institute of Science, Department of Basic Sciences, Beyazıt Istanbul/Turkey

<sup>2</sup> Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Department of Marine and Inland Water Resources Management Laleli Istanbul/Turkey

\* Corresponding author e-mail: albayrakesra28@gmail.com

### Abstract

This study was carried out seasonally between December 2017 and September 2018 by selecting five stations from Göksu Stream. In order to determine the diptera fauna of the Göksu Stream. pH, water temperature (°C), dissolved oxygen (mg/L), electrical conductivity (µS/cm), salinity (‰), depth (cm), flow rate (m/s), NH<sub>4</sub>-N (mg/L), NO<sub>2</sub>-N (mg/L), NO<sub>3</sub>-N (mg/L), PO<sub>4</sub> (mg/L), TP (mg/L), BOD (mg/L), TSS (mg/L) physicochemical parameters were measured. As a result of this study, a total of 6 family and 10 species were determined in Göksu Stream. Detection of pollution indicator species of diptera fauna and measurement physicochemical parameters results shows that Göksu Stream is threatened by intensive pollution effects.

**Keywords:** Diptera fauna, Physicochemical parameters, Göksu Stream, Istanbul

### INTRODUCTION

Fresh water resources in the world are under the influence of rapid population growth, urbanization pressure and industrial activities. To protect water resources, it is very important to determine physicochemical parameters and fauna composition.

The Göksu Stream is located within the borders of Istanbul-Beykoz district near the Anatolian side of the Bosphorus. The source of the stream is the first Elmalı Dam. The Göksu Stream is poured in to the Istanbul Bosphorus from Anadoluhisarı site (Albay, 1991)

Göksu Stream is an important water source for the Anatolian side of Istanbul. This stream is one of the rivers directly reaching the Bosphorus and the largest of the stream pouring into the Bosphorus. The other streams poured into the Bosphorus are Küçüküsu, Çubuklu, Ayı and Sülükhane (Oral, 2002; Tarakçı et al., 2012). Göksu Stream feeds the Elmalı Dam, which is effective in the supply of drinking and potable water of the Asian side of Istanbul (Yılmaz, 2017). Finding of the high number of settlement around the Göksu Stream is a important factor in terms of providing an understanding of the effects of urbanization on water resources. All these factors is shown that Göksu Stream is a very important water source for both people of Istanbul and our country.

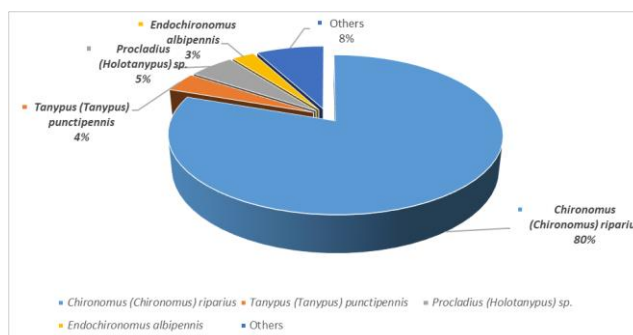
In this study, it is aimed to find out the diptera fauna of the Göksu Stream (Istanbul/Turkey). This study, we will aim to contribute our biological inventory. Also, this study is the first study to determined diptera fauna of the Göksu Stream by using physicochemical parameters.

### MATERIALS AND METHODS

Göksu Stream is located on the Anatolian side of the Bosphorus and within the boundaries of the Beykoz district of Istanbul. The district of Beykoz is covered the northeastern part of the Bosphorus and north of Beykoz district is located in the Black Sea. The rugged terrain of Beykoz, which rises up to 270 meters starting from sea level, is disintegrated by Riva, Küçüküsu and Göksu Streams (Şahin, 2013). Dörtkardeşler, Göztepe and Yenimahalle settlements are found around the Göksu Stream (Albay, 1991). Göksu Stream length is 4,46 km. Total 5 stations were detected and seasonal sampling was done.

Sampling was done at 5 different stations in Göksu Stream by using hand net (20x20 cm). Diptera samples were preserved in 75 % ethanol. Water temperature (°C), pH, dissolved oxygen (DO mg/L), electrical conductivity meter (EC meter µS/cm), biological oxygen demand (BOD mg /L), salinity (‰) were measured

by using YSI 556 model multi-parameter instrument as in situ. Flow rate were measured by using flow meter. The levels of NH<sub>4</sub>-N (ammonium nitrogen mg /L), NO<sub>2</sub>-N (nitrite nitrogen mg /L ), NO<sub>3</sub>-N (nitrate nitrogen mg /L), PO<sub>4</sub> (phosphate; mg /L), TSS (total suspended solid material mg /L), TP (total phosphorus mg /L) were measured in the Istanbul University inland waters biology laboratory according to standarts methods (APHA, 1998). Also depth was measured with tape meter. Geographical data (coordinates) were recorded with geographical positioning system (Garmin e-trex-GPS) unit. Diptera samples were identified at the lowest possible level under a stereomicroscope (family, genus or species) (Table 1). The minimum, maximum and average 14 physicochemical parameters of Göksu Stream were estimated (Table 2). Dominance values of Chironomidae taxa were determined (Figure 1). Also, dominance (% D) of diptera fauna at the five stations of the Göksu Stream were estimated (Table 3).



**Figure 1.** Dominance values of Chironomidae taxa.

**Table 1.** List and individual/m<sup>2</sup> of Diptera fauna which are determined from sampling stations of Göksu Stream

	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	Station 5
<b>Insecta</b> Linnaeus, 1758					
<b>Diptera</b> Linnaeus, 1758					
<b>Chironomidae</b> Newman, 1834			89		
<i>Chironomus (Chironomus) riparius</i> (Meigen,1804)		1822	578	311	
<i>Endochironomus tendens</i> (Fabricius,1775)		44			
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen,1830)		89			
<i>Cricotopus (Cricotopus) bicinctus</i> (Meigen 1818)		44			
<i>Cricotopus (Cricotopus) cylindraceus</i> (Kieffer, 1908)			44		
<i>Tanypus (Tanypus) punctipennis</i> (Meigen,1818)		133			
<i>Procladius (Holotanypus) sp.</i>		178			
<i>Zavreliomyia melanura</i> (Meigen,1804)			44		
<b>Sciomyzidae</b> larvae Macquart, 1846			89		44
<b>Dolichopodidae</b> larvae (Latreille ,1809)		44			
<b>Ephydriidae</b> larvae (Zetterstedt,1837)			44		
<b>Tipulidae</b> (Latreille,1802)					
<i>Tipula sp.</i>			89	44	
<b>Simuliidae</b> (Newman,1834)					
<i>Simulium sp.</i>					89
<b>TOTAL</b>				<b>3819</b>	

**Table 2.** Measured pH, water temperature (°C), DO (dissolved oxygen mg/L), EC (electrical conductivity μS/cm), salinity (‰), depth (cm), flow rate (m/s), NH<sub>4</sub>-N (ammonium nitrogen mg/L), NO<sub>2</sub>-N (nitrite nitrogen mg/L), NO<sub>3</sub>-N (nitrate nitrogen mg/L, PO<sub>4</sub> (phosphate mg/L), TP (total phosphorus mg/L), BOD (*biochemical oxygen demand* mg/L), TSS (total *suspended solid* mg/L) physicochemical parameters of Göksu Stream

Stations		Water Temp. °C	pH	DO mg/L	EC µS/cm	Depth cm	Flow rate m/s	NH <sub>4</sub> -N mg/L	NO <sub>2</sub> -N mg/L	NO <sub>3</sub> -N mg/L	PO <sub>4</sub> -P mg/L	TP mg/L	BOD mg/L	TSS mg/L	Salinity (‰)
1	Min.	8.1	6.56	4.90	131	29	0.1	0	0.0123	0.0176	0.0034	0.0132	5.62	0.3	9.6
	Avg.	17.2	7.3	6.15	289.94	38.5	0.35	0.269	0.1208	0.3988	0.0113	0.0306	10.81	1.095	10.1
	Max	26.3	8.04	7.41	418.89	48	0.6	0.538	0.2294	0.78	0.0192	0.0481	16	1.89	10.6
2	Min.	9.8	6.6	6.02	275	26	0.1	0	0.0280	0.0674	0.0016	0.0159	4.62	0.03	0.1
	Avg.	15.8	7.3	8.21	465.5	35.5	0.45	0.283	0.0906	0.8487	0.0116	0.2884	21.025	0.48	0.15
	Max	21.8	8	10.4	656	45	0.8	0.567	0.1532	1.63	0.0216	0.5610	37.43	0.93	0.2
3	Min.	7.7	7.02	6.06	158	10	0.7	0	0.0294	0.0698	0.0013	0.0090	11.8	0.05	0.0
	Avg.	14.8	8.21	7.96	382	13.5	1.0	0.306	0.096	0.6349	0.0078	0.242	24.085	0.425	0.0
	Max	21.9	9.4	9.87	606	17	1.3	0.612	0.1626	1.20	0.0144	0.4750	36.37	0.8	0.0
4	Min.	7.9	6.62	5.28	331	29	0.9	0	0.0163	0.0031	0.0034	0.0077	1.25	0.03	0.0
	Avg.	18.55	7.29	7.92	487.5	30.5	1.3	0.345	0.078	0.6115	0.059	0.0686	13.185	0.175	0.0
	Max	29.2	7.97	10.57	644	32	1.7	0.690	0.141	1.22	0.115	0.1295	25.12	0.32	0.0
5	Min.	9.2	6.28	4.33	176	21	0.8	0	0.0025	0.084	0.0042	0.0032	1.25	0.02	0.0
	Avg.	11.7	7.00	6.17	422	25.5	1.55	<0.25	0.0071	0.397	0.0178	0.0319	4.28	2.04	0.0
	Max	14.2	7.73	8.02	668	30	2.3	<0.5	0.0118	0.71	0.0315	0.0607	7.31	4.06	0.0

**Table 3.** Dominance (% D) of Diptera fauna at the five stations of the Göksu Stream

	1	2	3	4
<b>5</b>				
<b>Insecta</b>				
<b>Diptera</b>				
Chironomidae		9.09		
<i>Chironomus (Chironomus) riparius</i> Meigen,1804	77.35	59.09		87.5
<i>Endochironomus tendens</i> Fabricius,1775	1.88			
<i>Endochironomus albipennis</i> Meigen,1830	3.77			
<i>Cricotopus (Cricotopus) bicinctus</i> Meigen 1818	1.88			
<i>Cricotopus (Cricotopus) cylindraceus</i> Kieffer, 1908		4.54		
<i>Tanypus (Tanypus) punctipennis</i> Meigen,1818	5.66			
<i>Procladius (Holotanypus) sp.</i>	7.54			
<i>Zavrelimyia melanura</i> Meigen,1804		4.54		
Sciomyzidae		9.09		
33.33				
Dolichopodidae	1.88			
Ephydriidae		4.54		
<i>Tipula sp.</i>		9.09		12.5
<i>Simulium sp.</i>				
66.66				

## RESULTS

As a result of this study, a total of 3819 individual, 6 family (Chironomidae, Sciomyzidae larvae, Dolichopodidae larvae, Ephydriidae larvae, Tipulidae, Simuliidae) and 10 species (*Chironomus (Chironomus) riparius*, *Endochironomus tendens*, *Endochironomus albipennis*, *Cricotopus (Cricotopus) bicinctus*, *Cricotopus (Cricotopus) cylindraceus*, *Tanypus (Tanypus) punctipennis*, *Procladius (Holotanypus) sp.*, *Zavrelimyia melanura*, *Tipula sp.*, *Simulium sp.*) were found in Göksu Stream (Table 1).

The levels of DO (dissolved oxygen mg/L) were between 4.33-10.57 mg/L, pH levels were between 6.28-9.4, water temperature (°C) levels were between 7.7-29.2 (°C), electrical conductivity levels were between 158-668 µS/cm, salinity levels were between 0-10.6 (‰), flow rate levels were between 0.1-2.3 m/s, biochemical oxygen demand were between 1.25-37.43 mg/L, depth levels were between 10-48 cm. The levels of NH<sub>4</sub>-N (ammonium nitrogen) levels were between 0-0.690 mg/L, NO<sub>3</sub>-N (nitrate nitrogen) levels were between 0.0031-1.63 mg/L, NO<sub>2</sub>-N (nitrite nitrogen) levels were between 0.0025-0.2294 mg/L, PO<sub>4</sub>-P (phosphate) levels were between 0.0013-0.115 mg/L, total phosphorus levels were between 0.0032-0.5610 mg/L, total suspended solid material levels were between 0.02-4.06 mg/L (Table 2).

According to distribution of Chironomidae taxa, when the Göksu Stream was evaluated. *Chironomus (Chironomus) riparius* was determined as the most dominant species (80%). *Procladius (Holotanypus) sp.* was detected as the second dominant species (5 %) and *Tanypus (Tanypus) punctipennis* was determined as the third dominant species (4 %) (Fig.1).

The highest dominance (87.5 %) value was found at station 4 and while the lowest dominance (1.88 %) value was seen at station 2 (Table 3).

## DISCUSSION

According to environmental parameters results, in aquatic systems, each organism has a tolerance to a certain pH range and creatures in the pH range of 6.4-8.6 can show development (Tanyolaç, 2004). Also, electrical conductivity and pH variables are particularly effective in the rapid determination of water quality in aquatic ecosystems (Dow and Zampella, 2000). In this study, the pH values were measured between 6.28-9.4 and electrical conductivity values were seen at between 131-668 µS/cm. (Table 2). In terms of these values, there is no negative situation that prevents of live development.

Dissolved oxygen values are particularly important for providing information on the level of pollution, organic matter concentration and habitat quality (Wetzel, 1983). The dissolved oxygen values of Göksu Stream were measured between 4.33 -10.57 mg/L. The highest dissolved oxygen value was found at winter season in station 4 (10.57 mg/L). Generally, the flow rate at station 4 is higher than the other stations (Table 2). The low water temperature and the high water flow rate at 4 stations had been a positive effect on the amount of dissolved oxygen.

Egemen and Sunlu (1996) stated that non-ionized ammonium between 0.4-2.5 mg/L will have negative effects on many fish species and may even be fatal at a concentration of 3.4 mg/L. Tanyolaç (2004) states that ammonium nitrogen is generally below 1 mg/L in clean waters. The levels of NH<sub>4</sub>-N (ammonium nitrogen) levels were found between 0-0.690 mg/L in Göksu Stream (Table 2). According to measured ammonium nitrogen levels, Göksu Stream does not have ammonium nitrogen values that threaten living life.

The value of nitrite nitrogen in clean water is less than 0.03 mg/L. Values higher than this concentration are indicative of domestic wastewater pollution (U.S.Environmental Protection Agency, 2001; Doğanay, 2014). In our study, nitrite nitrogen values were measured between 0.0025 -0.2294 mg/L (Table 2). Measured values indicate that waste participation to the Göksu Stream was realized.

The final product of nitrification is nitrate nitrogen (Egemen and Sunlu, 1996). Nitrate nitrogen is very little in the clean waters (Tanyolaç, 1993). In this study, the highest nitrate nitrogen value was determined at 1.63 mg/L (Station 2) while the lowest nitrate nitrogen value was seen at 0.0031 mg/L (Station 4) (Table 2). The negative effects of the settlements located near the 2nd station and the dense sludge accumulated at the bottom caused the nitrate nitrogen value to be higher than the other stations.

According to Girgin and Kazancı (1996) phosphorus input into rivers depends on chemical wastes and anthropogenic effects. The highest phosphate value was determined at 0.115 mg/L (Station 4) and the lowest phosphate value was found at 0.0013 mg/L (Station 3) (Table 2). Agriculture and ovine livestock are done around the 4th station. The effect of agricultural and animal wastes on this station caused a high amount of phosphate.

The presence of bioindicator species in an environment, their abundance, good development, and their disappearance under certain conditions are very effective in determining the characteristics of the environment (Zeybek, 2007). In our study, a large number of taxa belonging to the Diptera groups were found. Also, pollution indicator species were detected intensely (Table 1). The presence of large numbers of pollution indicator species confirmed our opinion about the pollution of the Göksu Stream.

This study is very important in terms of providing information about the pollution status of the Göksu Stream by using diptera fauna. It is also very important in terms of ensuring the determination of what kind of measures can be taken for this stream which is under the threat of pollution.

## CONCLUSION

There is no other studies based on the determination of the Diptera fauna in Göksu Stream. Therefore, all taxa identified for the region have been recorded for the first time. Göksu Stream is threatened by intensive pollution effects, so such studies should be done in this stream in periodically.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Research Assistant Gazel Burcu AYDIN for their contributions in this study

## REFERENCES

- Albay M 1991. Göksu Deresi'nin algolojik özellikleri, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 57s.
- APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association.
- Doğanay E 2014. AB su çerçeve direktifine göre ülkemiz sularının fizikokimyasal ve kimyasal parametreler açısından izlenebilmesi için kullanılacak analiz metotlarının değerlendirilmesi, T. C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Uzmanlık tezi, 228 s.
- Dow CL, Zampella RA 2000. Specific conductance and pH as indicators of watershed disturbance in streams of the new jersey pinelands, USA. *Environmental Management* 26:437-445.
- Egemen Ö, Sunlu U 1996. Water quality (second edition) (in Turkish). İzmir: Ege University Press.
- Girgin S, Kazancı N 1996. Kirmir Çayında taban büyük omurgasızlarının dağılımı üzerine bir araştırma, XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Hidrobiyoloji Seksiyonu, 17-20 Eylül, İstanbul, s.53-62.
- Oral Ü 2002. İlçemiz Beykoz, İstanbul Publication.
- Şahin V 2013. Nüfus coğrafyası açısından bir değerlendirme: Beykoz'da nüfus artışının seyri ve mekansal dağılışı *Marmara Coğrafya Dergisi*, s.319-330.
- Tanyolaç J 1993. Limnoloji. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 263 s.
- Tanyolaç J 2004. Limnology (3rd edition) (in Turkish). Ankara: Hatipoğlu Press.
- Tarakçı S, Altay V, Keskin M, Sümer S 2012. Beykoz ve çevresi (İstanbul)'nin kent florası, *The Black Sea Journal Of Sciences* 2(7):47 - 66.
- U.S.Environmental Protection Agency (EPA), İrlanda, 2001. Parameters of water quality, Interpretation and Standards.
- Wetzel RG 1983. *Limnology* W.B. Saunders Co., 767 p., Philadelphia.
- Yılmaz N 2017. Elmalı Baraj Gölü (İstanbul, Türkiye) fitoplanktonik alg florası, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (1) :78-89.
- Zeybek M 2007. Çukurca Dere ve Isparta Deresi'nin su kalitesinin makrozoobentik organizmalara göre belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 111 s.

## Oligochaeta and Chironomidae fauna in Dam Lake Büyükçekmece (Istanbul/Turkey) and their relationship with some environmental variables

Serap Kosal Sahin<sup>1\*</sup>, Esra Albayrak<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Department of Marine and Inland Water Resources Management, Laleli Istanbul/Turkey

<sup>2</sup> Istanbul University, Institute of Science, Department of Basic Sciences, Beyazıt Istanbul/Turkey

\* Corresponding author e-mail: serap@istanbul.edu.tr

### Abstract

In this study, Oligochaeta and Chironomidae fauna collected seasonally from Dam Lake Büyükçekmece were investigated between July 2010 and April 2011. Five stations were selected for sediment sampling with Ekman Birge grab. Each sampling includes two subsamples. During sampling, some of the physico-chemical variables such as pH, water temperature (°C), dissolved oxygen (mg/L), electrical conductivity (µS/cm), total hardness (FS<sup>0</sup>), salinity (‰), secchi disk depth (m), NO<sub>2</sub>-N (µg/L), NO<sub>3</sub>-N (µg/L), PO<sub>4</sub> (µg/L) were analyzed. As a result of this study a total of 19 taxa were detected. 8 taxa belong to Oligochaeta, 11 taxa belong to Chironomidae. Jaccard and Sorenson similarity indices displayed high similarities between, station 2 and station 5 while stations 3 and 5 were found to be the most different from each other for the oligochaeta fauna.

**Keywords:** Chironomidae, Oligochaeta, Dam Lake Büyükçekmece, Istanbul

### INTRODUCTION

Lake Büyükçekmece located north of the Marmara Sea coast of Turkey is the third largest water resources among the six main freshwater reservoirs of a megacity Istanbul, providing 17% water demand. Büyükçekmece basin is accepted as an important and attractive area by industry financiers and investors because of its nearness to Ambarlı harbor, and residential areas containing workforce. That is why there are small industrial facilities in protection zones. Population of Istanbul has been increasing by 300,000– 500,000 people in every year by immigration (ISKI, 2006). While the rate was 5.3% population in 1985–1990, 19.79% increase in or nearby the watersheds was recorded (Yüksel et al., 2004; TUIK, 2013). Today 1.2 billion people (20 % of the world population) already have no secure access to clean drinking water and 2.4 billion people do not dispose of access to sanitary installations. In this respect, studies on water sources with quality are important to increase the awareness of more efficient use of water and water resources that are the most precious treasure of humankind (Lozan et al., 2007). Even though Turkey is not one of the water-poor countries, there is still shortage of water. Also, to minimize the adverse impact of climate change, existing water resources should be used wisely. Hence, sources supplying freshwater to mega cities such as Istanbul must be closely monitored and biologically investigated to ensure the quality (Zekai, 2009).

In recent years, numerous publications have critically reviewed the use of benthic macroinvertebrates as bioindicators as well as the appropriateness and shortcomings of certain indices. Insect larvae, worms, crustaceans, and molluscs live within the sediments and consume organic matter that sinks from surface production. These benthic macroinvertebrates are an important part of the diet of many fish species so that they represent a crucial link between phytoplankton and fish. The abundance and composition of the zoobenthic communities tell us a lot about how well the ecosystem is functioning. Some indicator species are very sensitive to pollutants whereas other species can tolerate a wide range of conditions. Macrobenthic invertebrates that they relatively long lived and sessile have been much used for biological monitoring of environmental quality in aquatic ecosystems (Kazancı et al., 2008; Halfman et al., 2008; Mooraki et al., 2009). In the present study, it was aimed to determine the Oligochaeta and Chironomidae fauna and to gether with physical and chemical parameters by the use of these organisms to make a biological monitoring. Water Framework Directive requires (WFD) all member states to protect, enhance and restore, and prevent deterioration of aquatic ecosystems. All water bodies need to achieve good ecological status or potential under the Directive. Consequently, all water bodies should be classified according to their ecological status by using some of the quality elements. In this process, to assign water body types, to set objectives, and to select

implemented parameters are the most important steps. This biological monitoring approach contains the biological water quality determination indices which are used in Europe.

## MATERIALS AND METHODS

Büyükçekmece watershed is used as drinking water resources, located (41°06'89''N, 28°55'65''E) approximately 30 km to the southwest of Istanbul. The lake's bar was reinforced in 1988 by a dam. The area of the lake is 28.47 km<sup>2</sup> and lies in a 620 km<sup>2</sup> watershed. The lake is 7 km long and 2 km wide (Zekai, 2009). The maximum depth is 8.6 m following deepening works carried out by the Ministry of Environment and Forestry of Turkey (Lozan et al., 2007). The largest stream feeding the lake is Karasu Stream, which is connected to Tepekent and Hamza streams.

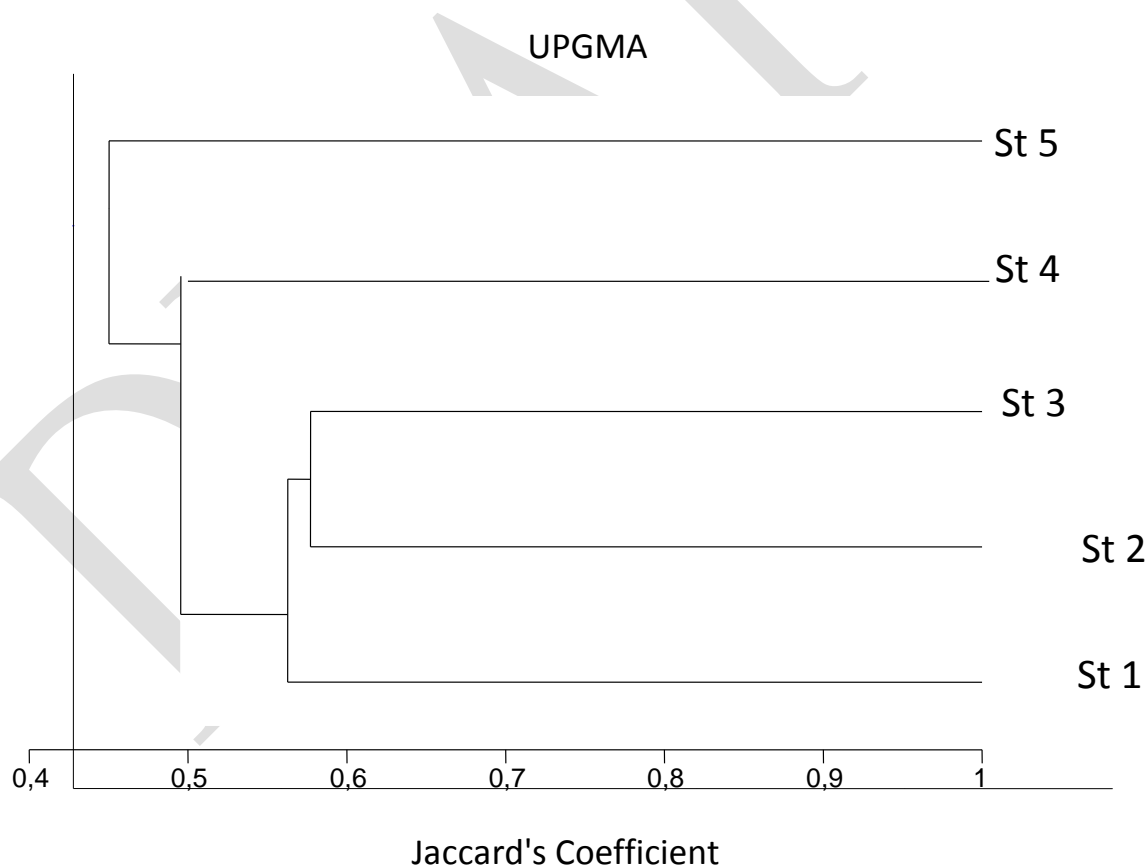
In order to determine the relationships between Oligochaeta and Chironomidae fauna and environmental variables, sampling was made at five different stations seasonally interval between July 2010 and April 2011. The sampling stations were sampled for Oligochaeta and Chironomidae fauna by using an Ekman-Birge grab (15 cm \*15 cm), sieved on a 0.5 mm mesh sized of sieve and kept individually in plastic bottles in 75% ethanol. Five major water variables temperature (C°), dissolved oxygen (DO/mg/L), pH, electrical conductivity (µS/cm) and salinity (‰) were measured with YSI 556 model multiparameter instrument. The levels of NO<sub>2</sub>-N (µg/L), NO<sub>3</sub>-N (µg/L), and PO<sub>4</sub>-P (µg/L) were measured in the laboratory according to the standard methods (APHA, 1998). Geographical data (coordinates) were recorded with geographical positioning system. Oligochaeta and Chironomidae samples were identified at the lowest possible level under a stereomicroscope (family, genus or species) (Table 1). The minimum, maximum and average physicochemical parameters of Dam Lake Büyükçekmece were estimated (Table 2). Sorensen and Jaccard similarity index values (Kovach, 1998) were estimated to understand similarity values among the stations (Figure.1; Figure.2).

**Table 1.** List and individual/m<sup>2</sup> of Oligochaeta and Chironomidae fauna which are determined from sampling stations of Dam Lake Büyükçekmece

	Sta.1	Sta.2	Sta.3	Sta.4	Sta.5
<b>CHIRONOMIDAE</b>					
<i>Cladotanytarsus mancus</i> (Walker, 1856.)	89	89	0	44	44
<i>Chironomus viridicollis</i> Wulp, 1877	44	0	44	0	0
<i>Tanypus punctipennis</i> Meigen, 1818	133	44	0	44	0
<i>Chironomus reductus</i> Gasiūnas 1959	178	89	222	178	133
<i>Chironomus plumosus</i> (L., 1758)	178	578	222	155	133
<i>Cryptotendipes holsatus</i> Lenz, 1941	44	44	0	133	222
<i>Chironomus anthracimus</i> Wulp,1987	0	44	44	44	0
<i>Polypedilum convictum</i> Chern., 1949	44	399	110	242	222
<i>Polypedilum aberrans</i> Chern., 1949	0	44	0	44	0
<i>Dicrotendipes nervosus</i> (Staeger, 1839)	0	0	44	44	0
<i>Crytochironomus defectus</i> K., 1921	110	133	89	44	0
<b>OLIGOCHAETA</b>					
<i>Psammoryctides albicola</i> (Michaelsen, 1901)	464	533	267	132	89
<i>Tubifex tubifex</i> (Müller, 1774)	400	311	533	133	178
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparede, 1862	267	154	178	44	44
<i>Nais communis</i> Piguët, 1906	0	222	0	0	44
<i>Stylaria lacustris</i> (L., 1967)	0	89	0	0	44
<i>Limnodrilus udekemianus</i> Claparede, 1862	0	133	44	0	0
<i>Limnodrilus</i> sp.	0	44	0	0	0
<i>Nais</i> sp.	44	0	89	0	0

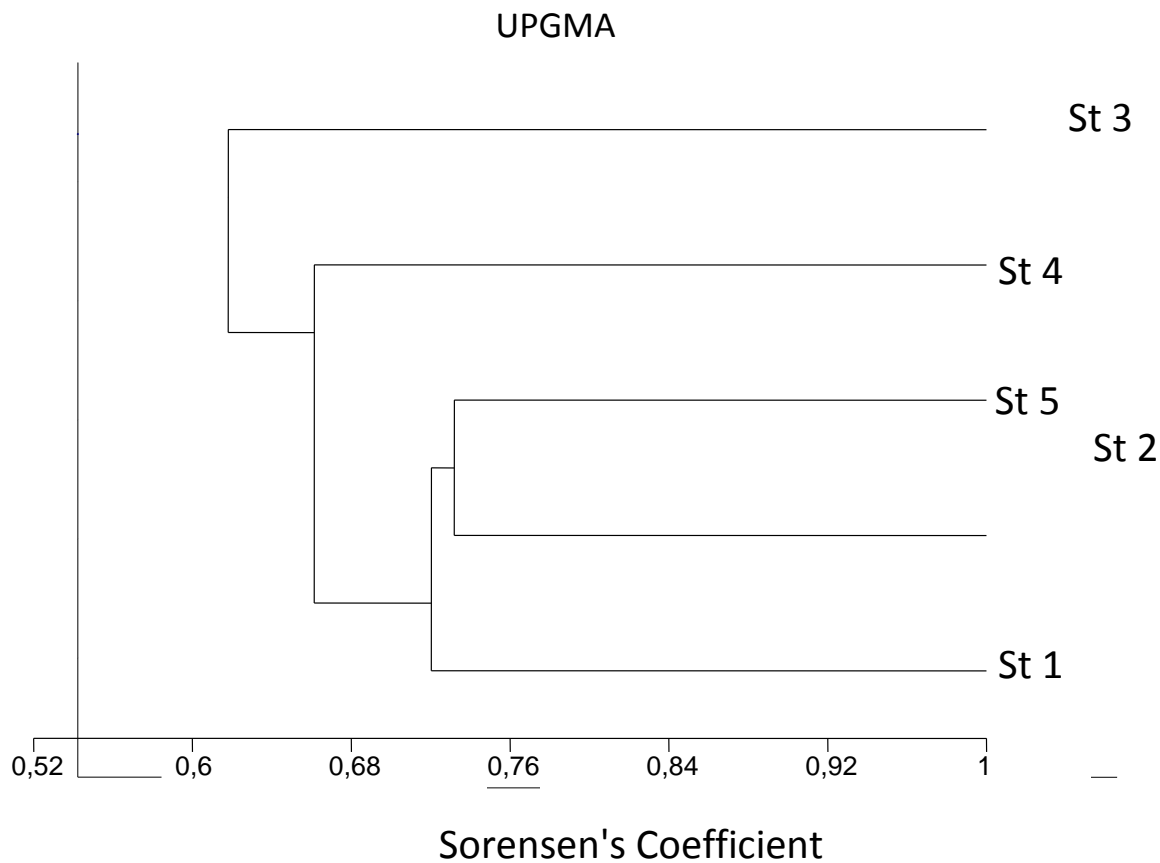
**Table 2.** 10 physicochemical parameters [pH, water temperature (°C), DO (dissolved oxygen mg/L), EC (electrical conductivity μS/cm), total hardness (°FS), salinity (‰), NO<sub>2</sub>-N (nitrite nitrogen μg/L), NO<sub>3</sub>-N (nitrate nitrogen μg/L), PO<sub>4</sub> (phosphate μg/L), secchi disk depth (m)] were measured in Dam Lake Büyükçekmece.

STATIONS		Water Temp. °C	pH	DO (mg/L)	EC μS/cm	Hardness (FS <sup>0</sup> )	Secchi Disk Depth (m)	NO <sub>2</sub> -N mg/L	NO <sub>3</sub> -N mg/L	PO <sub>4</sub> mg/L	Salinity (‰)
1	MIN.	4	7	8	397	12.4	0.5	0	0	0	0.02
	AVG.	12.5	7.45	10.5	488.5	13.65	0.75	4.25	0.8	9.1	0.025
	MAX.	21	7.9	13	580	14.9	1	8.5	1.6	18.2	0.03
2	MIN.	3	7	9	459	12.3	0.5	0	0	0	0.03
	AVG.	13	7.5	10.5	506.5	13.15	0.75	7	0.6	9.25	0.03
	MAX.	23	8	12	554	14	1	14	1.2	18.5	0.03
3	MIN.	4	7	5.8	420	12.3	0.5	0	0	0	0.02
	AVG.	12.15	7.8	8.9	483.5	13.15	1.25	13.6	0.5	24.9	0.025
	MAX.	20.3	8.6	12	547	14	2	27.2	1	49.8	0.03
4	MIN.	3	7	7	434	12	0.5	0	0	0	0.03
	AVG.	13.5	7.75	10	494	13.25	1.25	16.1	1.15	15	0.03
	MAX.	24	8.5	13	554	14.5	2	32.2	2.3	30	0.03
5	MIN.	2	7	8	420	12	0.5	0	0	0	0.02
	AVG.	13	8	9.5	484	13.35	1.25	15.5	1.15	10.45	0.025
	MAX.	24	9	11	548	14.7	2	31	2.3	20.9	0.03



**Figure 1.** Jaccard's Coefficient Correlation Analyses





**Figure 2.** Sorensen's Coefficient Correlation Analyses

## RESULTS

In this study, a total of 9265 individual and 19 taxa were determined in Dam Lake Büyükçekmece. The highest number of individuals was seen at station 2 (2950 /m<sup>2</sup>) and the least number of individuals was found at station 5 (1153/m<sup>2</sup>). A total of 11 taxa belonging to Chironomidae larvae (*Chironomus plumosus*, *C. reductus*, *C. viridicollis*, *C. anthracinus*, *Cryptotendipes holsatus*, *Cryptochironomus defectus*, *Polypedium convictum*, *Dicrotendipes nervosus*, *Cladotanytarsus mancus*, *Tanytus punctipennis*, *Polypedium aberrans*) 4785/m<sup>2</sup> comprised of individual. Oligochaeta covered 4480 /m<sup>2</sup> individual in 8 taxa (*Psammoryctides albicola*, *Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *L. udekemianus*, *Limnodrilus* sp., *Nais communis*, *Nais* sp., *Stylaria lacustris*) (Table 1). Of which, the most dominance (D %) two species were detected as *T. tubifex* (28.26 %) and *P. albicola* (23.25 %) respectively. Also, the highest dominance (28.26 %) value was found at station 3 and while the lowest dominance (19.25 %) value was seen at station 5.

The level of dissolved oxygen were measured from 8 to 12 mg/L when pH values were found from 7.5 to 8. Secchi disk depth (known as turbidity) were about 1-2 m. Water temperature values changed from 20.3 to 24°C. The electrical conductivity (EC) ranged from 434 to 580 µS/cm. The total hardness was found to vary from 12.3 to 12.7 FS<sup>0</sup>. The level of NO<sub>2</sub>-N were in between 1.4-1.8 µg/L, The level of NO<sub>3</sub>-N were around 0.3-1.6 µg/L, The level of PO<sub>4</sub> were in 17.7-30 µg/L and the level of salinity were in between 0.02-0.03 ‰ (Table 2).

According to the results of correlation analyses, Jaccard and Sorensen similarity indices displayed high similarities between, station 2 and station 5 (73 %) while stations 3 and 5 were found to be the most different from each other for the oligochaeta fauna (51 %) (Fig.1; Fig. 2).

## DISCUSSION

In this study, the most dominant chironomid species of the lake was found as *Chironomus plumosus* with a total number of individual in all stations (1266 /m<sup>2</sup>). Among the five stations, two species [*P. convictum* (1017 /m<sup>2</sup>), *C. reductus* (800 /m<sup>2</sup>)] were the most widespread species with high number of individuals. *C. plumosus* and *C. reductus* were characteristic species of mesotrophic lake conditions. Also, the most dominant

oligochaeta species of the lake was detected as a *Tubifex tubifex* with a total number of individual in all stations (1555 /m<sup>2</sup>) and two species [*Psammoryctides albicola* (1485 /m<sup>2</sup>), *Limnodrilus hoffmeisteri* (687 /m<sup>2</sup>)] were the most widespread species with high number of individuals. The least number of individual species both chironomid and oligochaeta groups was seen at as *Limnodrilus* sp. (44 /m<sup>2</sup>) (Table 1).

*Limnodrilus hoffmeisteri* and *T. tubifex* are considered as a biological indicator of organic pollution and eutrophication in the lakes. *Nais communis* has a cosmopolitan distribution (Timm et al., 2001). According to Brinkhurst and Jamieson (1971), *T. tubifex*, *L. hoffmeisteri* and *L. udekemianus* and larval Chironomidae (e.g., *C. plumosus*) can tolerate unsuitable conditions. This knowledge is also supported by our results. These euryoic species especially inhabit shallow and muddy substrates. According to their ecological characteristics and widespread geographical distribution they are considered to be cosmopolitan species occurring throughout the world. They have clearly adapted to a wide range of environmental conditions and their abundance can reach immense sizes in aquatic systems with high trophy levels (Solomini et al., 2006).

This study is very important in terms of providing information about the pollution status of the Dam Lake Büyükçekmece by using Oligochaeta and Chironomidae fauna. Also, the fact that Dam Lake Büyükçekmece is a lake that meets the water demand of Istanbul (17%) and that the industrial activities around it are intense, shows how important it is to investigate Oligochaeta and Chironomidae fauna of this lake.

## CONCLUSION

Dam Lake Büyükçekmece water quality has been deteriorating for the last 30 years (Külköylüoğlu et al., 1995). Supporting this argument, our results suggest that although the lake is being used as a source of drinking water and/or agricultural purposes, the lake and its watershed are under risk of over population and pollution. Presence of two highways and over population nearby the lake are the most influential threats on the lake water quality by means of increasing waste water input into the lake. This apparently has a negative effect on the trophic level of the lake macrobenthic community. Such threats are serious and urgent conservation and management issues are suggested for future activities.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Associate Professor Ülkü ALVER SAHİN for contributions in this study. This research has been supported by Unit of Scientific Research Projects, Istanbul University (Project No: 32254)

## REFERENCES

- APHA, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition American Public Health Association, Washington, D.C.
- Brinkhurst RO, Jamieson BGM 1971. Aquatic Oligochaeta of the World, University of Toronto, Canada, 860 pp.
- Halfman JD, Brown ES, Ware TF, O'neill KA, Franklin CK, Dye RE 2008. Owasco Lake, New York: Water quality and nutrient sources. In: Halfman JD, ME Balyszak and SA Meyer (eds.), A 2007 Water quality study of Owasco Lake, New York. Finger Lakes Institute, Hobart and William Smith Colleges. 37 pp.
- ISKI, 2006. Annual report, Istanbul metropolitan municipality, Istanbul Water and Sewerage Administration, Lale Publishing Corp., Istanbul (in Turkish).
- Kazancı N, Dügel M, Girgin S 2008. Determination of indicator genera of benthic mactoinvertebrate communities in running waters in western Turkey. Rev. Hydrobiologica, 1 (1): 1-16 .
- Kovach I 1998. Regional development and voluntary association, in Hungary in Environment & Société. N 20 Innovation Rurales, Arlon pp. 61- 67.
- Külköylüoğlu O, Altınışçılı S, Kiliç M, Kubanç C 1995. "Büyükçekmece Gölü'nün (İstanbul) Ostrakod (Crustacea) faunası ve mevsimsel dağılımı", Doğa Türk Zoology Dergisi, cilt.19, s.249-256.
- Lozan, A, Gralb H, Hupfer P, Menzel L, Schönwiese Ch-D 2007. "Global change: enough water for all. Wissenschaftlic Auswertungen/GEO Hamburg.
- Mooraki N, Esmaeli SA, Soltani M, Valinassab T 2009. Spatial distribution and assemblage structure of macrobenthos in a tidal creek in relation to industrial activities. Int. Journal of Environmental Science and Technology, 6: 651-662.
- Solimini AG, Free G, Donohue I, Irvine K, Pusch M, Rossaro B, Sandin L, Cardoso AC, 2006. Using benthic macroinvertebrates to assess ecological status of lakes current knowledge and way forward to support WFD. European Commission, Directorate-General Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, 48 pp.

- Timm T, Seire A, Pall P 2001. Half a century of Oligochaeta research in estonian running waters. In: P. Rodriguez and P.F.M. Verdonchot (Eds.), Aquatic Oligochaete Biology VIII. Hydrobiologia, 463: 223-234.
- TUIK, 2013. Türkiye İstatistik Yıllığı 2013 [Turkey's Statistical Yearbook 2013], Turkish Statistical Institute Publishing, Ankara.
- Yüksel E, Eroğlu V, Sarıkaya HZ, Koyuncu I 2004. Current and future strategies for water and wastewater management of Istanbul City, Environmental Management, 33( 2): 186-195.
- Zekai S 2009. "İklim değişikliği tatlısu kaynakları ve Türkiye," Su Vakfı Yayınları, İstanbul.

DRAFT

## Glucose effect on biofilm formations of *S. aureus* strains

Taner Sar, Meltem Yesilcimen Akbas\*

Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University, Gebze-Kocaeli, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: akbas@gtu.edu.tr

### Abstract

Biofilm formations of 25 *S. aureus* strains isolated from raw milk samples were investigated on microtitration plates using TSB and TSB supplemented with glucose media at the final concentration of 0.25%, 1.0%, or 2.0% (w/v). The biofilm formations were monitored media for 48 hours. The biofilm formations of *S. aureus* isolates incubated in TSB media were generally moderate (84%). The majority of strong biofilm formations (84-96%) were determined by *S. aureus* strains incubated in the presence of glucose. It was shown that the presence of glucose had positive effect on biofilm formations.

**Keywords:** *S. aureus*, biofilm formation, D-glucose, polystyrene, microtitration plates.

### INTRODUCTION

Staphylococci are the most important pathogens causing major problems in food and medical sectors. The predominant pathogen *Staphylococcus* species are *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* and *S. aureus* (Otto, 2013; Becker et al., 2014; Méric et al., 2015). Especially *S. aureus* is known as the third prevalent cause of foodborne illness worldwide (Aydin et al., 2011). *S. aureus* can be easily isolated from surfaces in the food and dairy industries (Ateba et al., 2010; Santos et al., 2014). These industries products can be contaminated during food processing owing to produced enterotoxin by *S. aureus* (Cha et al., 2006; Sudagidan and Aydin, 2009). Moreover, *S. aureus* strains can create biofilms on different types of surfaces such as stainless steel, plastic, glass, and rubber (Akbas and Kokumer, 2015; Lee et al., 2014, 2016, 2017; Unlu et al., 2018).

Biofilm formation initiates with the adhesion of bacteria on a solid surface. The bacteria continue to proliferate at the next step and accumulate on the polymeric matrix (Khangholi and Jamalli, 2016). This matrix is covered by exopolysaccharides including bacterial surface proteins (Flemming and Wingender, 2010; Koutina and Skibsted, 2015).

In this study the effects of glucose on biofilm formation by *S. aureus* strains isolated from raw milk samples were investigated.

### MATERIALS AND METHODS

#### Bacterial strains

In this work, 25 *S. aureus* isolates were evaluated for their biofilm formation abilities on TSB or TSB<sub>Glc</sub> (TSB enriched with D-glucose) media. *S. aureus* strains ATCC 25923 and ATCC 29213 were used as biofilm positive and biofilm negative controls, respectively.

#### Biofilm Formation

For determining the biofilm formations, TSB and TSB<sub>Glc</sub> (TSB enriched with D-glucose at different concentrations, 0.25% TSB<sub>Glc0.25</sub>; 1.0% TSB<sub>Glc1</sub> and 2.0% TSB<sub>Glc2</sub>; w/v) media were used. The isolates and reference strains were incubated overnight at 37°C in tryptic soy broth (TSB). Following the incubation, the cultures were diluted at a rate of 1:100 in fresh TSB media. The cultures were transferred into flat-bottomed 96-well polystyrene microtitration plates (150µL; about 10<sup>5</sup>cfu/mL, final concentration) and incubated at 37°C for 48 h. At the end of the incubation, bacterial cells were removed and then the wells were stained with crystal violet solution (0.5% w/v, Sigma, St. Louis, MO, USA) for 20 min. Then, the wells were decanted and treated with glacial acetic acid (33% v/v, Merck) for 10 min. All samples were transferred into a new microtitration plate wells and measured at 570 nm using an ELISA plate reader (Christensen et al., 1985). The absorbance values of TSB or TSB supplemented with D-glucose (OD<sub>c</sub>) were used as a blank. Each experiment was performed in triplicate for all isolates.

Biofilm formations were interpreted according to Stepanović et al.(2000).

- Nonbiofilm producer (-,  $OD \leq OD_c$ ),
- Weak biofilm producer (+,  $OD_c < OD \leq 2xOD_c$ ),
- Moderate biofilm producer (++,  $2xOD_c < OD \leq 4xOD_c$ ), and
- Strong biofilm producer (+++,  $4xOD_c < OD$ )

## RESULTS

In this study, 25 *S.aureus* isolates and 2 reference strains (ATCC 25923 and ATCC 29213) were used for determination of biofilm formations. The negative reference *S. aureus* ATCC 29213 and the positive reference strain *S. aureus* ATCC 25923 were determined as non and strong biofilm producers in the all media, respectively (Table 1). In addition, S3 and S4 were considered as strong biofilm producers (Table 1).

In general, 21 of the 25 *S. aureus* isolates (84%) were considered as moderate biofilm producers strains when they were incubated in TSB medium (Table 2). The biofilm formation capacities of strains gradually increased by increasing concentrations of glucose in TSB media supplemented with glucose. 24 of 25 *S. aureus* isolates (96%) cultured in TSB<sub>Glc2</sub> media were determined as strong biofilm producers (Table 2).

According to obtained results, it has been shown that the content of media is more important to determine weak and moderate biofilm productions. For this reason, the effect of different types of media components should be investigated for biofilm formation studies.

## DISCUSSION

Evaluation of biofilm formation by *S.aureus* in this study revealed that isolates can produce moderate biofilm formations in the TSB, or strong biofilm productions in TSB supplemented with glucose, in terms of the number of biofilm producing strains including a biofilm positive reference strain. The obtained results were consistent with previous studies (Stepanovic et al., 2000; Rode et al., 2007; Manandhar et al., 2018). The environmental factors including the presence of glucose, or salt, temperature, and pH could be effective on the biofilm formations (Michu et al., 2011; Khangholi and Jamalli, 2016; Kyoui et al., 2016).

Biofilm formation on a solid surface also depends on the type of the surface materials (Jo et al., 2010). Generally, glass and stainless steel are described as hydrophilic materials while rubber and plastic are assumed as hydrophobic materials (Sinde and Carballo, 2000; Donlan and Costerton, 2002). In this study, *S.aureus* isolates produced biofilm layer on polystyrene surfaces as hydrophobic materials. Similarly, Bonsaglia et al. (2014) determined that bacterial cells can easily attach to the hydrophilic surfaces. However, the biofilm formations were found to be higher on hydrophobic surfaces than on hydrophilic surfaces (Simões et al., 2008). Therefore, the biofilm formation of *S.aureus* isolates should also be assessed on various surfaces such as stainless steel, glass, or polypropylene in the presence of different environmental factors.

**Table 1.** Biofilm formations of *S.aureus* strains on TSB and TSB<sub>Glc</sub> (TSB<sub>Glc0.25</sub>, TSB<sub>Glc1</sub>, and TSB<sub>Glc2</sub>) media on microtitration plates after 48 hours incubation.

Strain	Media			
	TSB	TSB <sub>Glc0.25</sub>	TSB <sub>Glc1</sub>	TSB <sub>Glc2</sub>
S1	0.42 (0.00)	0.88 (0.01)	1.25 (0.02)	1.09 (0.04)
S2	0.46 (0.02)	0.52 (0.15)	0.77 (0.21)	0.69 (0.00)
S3	0.99 (0.20)	1.51 (0.04)	1.49 (0.05)	1.52 (0.04)
S4	0.57 (0.07)	0.76 (0.09)	1.32 (0.01)	1.16 (0.17)
S5	0.43 (0.06)	0.98 (0.07)	1.36 (0.00)	1.31 (0.02)
S6	0.39 (0.11)	0.87 (0.12)	0.87 (0.12)	0.97 (0.01)
S7	0.64 (0.17)	0.70 (0.00)	0.77 (0.23)	0.91 (0.10)

<b>S8</b>	0.31 (0.04)	0.80 (0.04)	0.75 (0.03)	0.82 (0.23)
<b>S9</b>	0.57 (0.03)	0.94 (0.02)	1.26 (0.01)	1.23 (0.15)
<b>S10</b>	0.56 (0.11)	1.03 (0.09)	1.08 (0.04)	1.31 (0.01)
<b>S11</b>	0.55 (0.04)	1.03 (0.10)	0.99 (0.07)	1.16 (0.10)
<b>S12</b>	0.69 (0.02)	0.94 (0.10)	1.60 (0.15)	1.72 (0.23)
<b>S13</b>	0.63 (0.09)	0.89 (0.08)	0.84 (0.00)	0.93 (0.04)
<b>S14</b>	1.13 (0.11)	1.54 (0.05)	1.16 (0.06)	1.64 (0.18)
<b>S15</b>	0.63 (0.01)	0.89 (0.13)	0.94 (0.12)	0.93 (0.05)
<b>S16</b>	0.78 (0.13)	0.97 (0.10)	1.15 (0.39)	1.08 (0.00)
<b>S17</b>	0.50 (0.08)	1.00 (0.00)	1.13 (0.18)	0.97 (0.10)
<b>S18</b>	0.49 (0.05)	0.86 (0.08)	1.06 (0.05)	1.13 (0.08)
<b>S19</b>	0.50 (0.05)	0.99 (0.05)	0.92 (0.12)	1.16 (0.11)
<b>S20</b>	0.62 (0.09)	1.03 (0.07)	0.96 (0.10)	0.90 (0.36)
<b>S21</b>	0.79 (0.10)	1.02 (0.00)	0.94 (0.12)	1.11 (0.01)
<b>S22</b>	0.60 (0.10)	1.05 (0.01)	1.22 (0.04)	1.09 (0.02)
<b>S23</b>	0.51 (0.06)	1.05 (0.06)	1.01 (0.19)	0.98 (0.18)
<b>S24</b>	0.69 (0.19)	0.91 (0.05)	1.10 (0.02)	0.95 (0.00)
<b>S25</b>	0.47 (0.00)	0.98 (0.01)	1.14 (0.14)	1.02 (0.12)
<b>ATCC 29213</b>	0.22 (0.04)	0.25 (0.03)	0.26 (0.04)	0.28 (0.07)
<b>ATCC 25923</b>	1.18 (0.19)	1.04 (0.06)	1.46 (0.05)	1.45 (0.00)

**Table 2.** The summary of *S.aureus* isolates biofilm formations at different types of TSB media on microtitration plates after 48 hours incubation.

	<b>Media</b>			
	<b>TSB</b>	<b>TSB<sub>Glc0.25</sub></b>	<b>TSB<sub>Glc1</sub></b>	<b>TSB<sub>Glc2</sub></b>
<b>Nonbiofilm (-)</b>	-	-	-	-
<b>Weak (+)</b>	2	-	-	-
<b>Moderate (++)</b>	21	4	3	1
<b>Strong (+++)</b>	2	21	22	24

## CONCLUSION

In this work, the biofilm formations of 25 *S.aureus* isolates and 2 biofilm reference *S.aureus* strains were investigated by using TSB and TSB<sub>Glc</sub> media. When *S.aures* isolates were cultured in the TSB media, 21 of 25 isolates (84%) produced as moderate biofilm formations. On the other hand, nearly all of isolates (96%) cultivated in TSB supplemented with glucose produced as strong biofilm producers. According to these results, it can be concluded that the content of media is an important factor for biofilm formation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Gebze Technical University (2012-A05), Turkey.

## REFERENCES

Akbas MY, Kokumer T 2015. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. International Journal of Food Science & Technology, 50(7): 1666-1672.

- Ateba CN, Mbewe M, Moneoang MS, Bezuidenhout CC 2010. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng Area, North West province, South Africa. *South African Journal of Science*, 106(11-12): 1-6.
- Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K 2011. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2): 99-106.
- Becker K, Heilmann C, Peters G 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, 27(4): 870-926.
- Bonsaglia ECR, Silva NCC, Júnior AF, Júnior JA, Tsunemi MH, Rall VLM 2014. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35(1): 386-391.
- Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS 2006. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4): 864-871.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 996-1006.
- Donlan RM, Costerton JW 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167-193.
- Flemming HC, Wingender J 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9): 623.
- Jo SH, Baek SB, Ha JH, Ha SD 2010. Maturation and survival of *Cronobacter* biofilms on silicone, polycarbonate, and stainless steel after UV light and ethanol immersion treatments. *Journal of Food Protection*, 73(5): 952-956.
- Khangholi M, Jamali A 2016. The effects of sugars on the biofilm formation of *Escherichia coli* 185p on stainless steel and polyethylene terephthalate surfaces in a laboratory model. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(9): e40137.
- Koutina G, Skibsted LH 2015. Calcium and phosphorus equilibria during acidification of skim milk at elevated temperature. *International Dairy Journal*, 45: 1-7.
- Kyoui D, Hirokawa E, Takahashi H, Kuda T, Kimura B 2016. Effect of glucose on *Listeria monocytogenes* biofilm formation, and assessment of the biofilm's sanitation tolerance. *Biofouling*, 32(7): 815-826.
- Lee SHI, Barancelli GV, Camargo TM, Corassin CH, Rosim RE, Cruz AG, Cappato LP and Oliveira CA 2017. Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Research International*, 91: 88-91.
- Lee SHI, Cappato LP, Corassin CH, Cruz AG, Oliveira CAF 2016. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Journal of Dairy Science*, 99: 2384-2390.
- Lee SH, Mangolin BL, Gonçalves JL, Neeff DV, Silva MP, Cruz AG, Oliveira CA 2014. Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97:1812-1816.
- Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N 2018. Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by Staphylococcal clinical isolates. *BMC Research Notes*, 11(1): 714.
- Méric G, Miragaia M, de Been M, Yahara K, Pascoe B, Mageiros L, Mikhail J, Harris LG, Wilkinson TS, Rolo J, Lamble S, Bray JE, Jolley KA, Hanage WP, Bowden R, Maiden MCJ, Mack D, de Lencastre H, Feil EJ, Corander J, Sheppard SK 2015. Ecological overlap and horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biology and Evolution*: 7(5): 1313-1328.
- Michu E, Cervinkova D, Babak V, Kyrova K, Jaglic Z 2011. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. *International Dairy Journal*, 21(3): 179-184.
- Otto M 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. *Bioessays*, 35(1): 4-11.
- Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretrø T 2007. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116(3): 372-383.
- Santos VM, Martins HB, Rezende IS, Barbosa MS, Andrade EF, Souza SG, Campos GB, Oliveira PS, Sousa DS, da Silva DCC, Amorim AT, Timenetsky J, Cruz MP, Yatsuda R, Marques LM 2014. Virulence factor profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk from Brazil. *Food and Nutrition Sciences*, 5(15): 1496-1505.

- Simões M, Simões LC, Cleto S, Pereira MO, Vieira MJ 2008. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3): 335-341.
- Sinde E, Carballo J 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4): 439-447.
- Stepanović S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40: 175-179.
- Sudagidan M, Aydin A 2009. Screening virulence properties of staphylococci isolated from meat and meat products. *Wien Tierärztl Monat*, 96: 128-134.
- Unlu A, Sar T, Seker G, Erman AG, Kalpar E, Akbas MY 2018. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains and their control by selected phytochemicals. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3): 637-646.



## Etkin Biyoetanol üretimi için immobilizasyonda CaCl<sub>2</sub> solüsyonun etkisi

Taner ŞAR<sup>1</sup>, Meltem Yeşilçimen AKBAŞ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 41400, Gebze-Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: akbas@gtu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada kalsiyum aljinat yöntemi ile immobilize edilen *E.coli* FBR5 suşunun biyoetanol üretimi incelenmiştir. Etanol üretiminde immobilizasyonun etkisini incelemek için ise iki farklı CaCl<sub>2</sub> solüsyonu konsantrasyonu (Ca<sub>2</sub>; %2 ve Ca<sub>3</sub>; %3, w/v) kullanılmıştır. Ca<sub>3</sub> ile immobilize edilen FBR5 suşunun 48 saat süre sonunda üretilen etanol miktarı 19.14 g/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu etanol miktarı serbest hücreye göre %26 daha fazla olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile etanol üretiminde immobilizasyonun olumlu etkisinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca, immobilizasyon yönteminde kullanılan CaCl<sub>2</sub> solüsyonu konsantrasyonunun önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoetanol, immobilizasyon, kalsiyum klorid

### Effect of immobilization method for bioethanol production

#### Abstract

In this work, bioethanol production by calcium-alginate immobilized *E.coli* FBR5 strain was investigated. For determining the immobilization effects on ethanol production, two different concentrations of CaCl<sub>2</sub> solutions (Ca<sub>2</sub>; 2% and Ca<sub>3</sub>; 3%, w/v) were used. The ethanol amount of Ca<sub>3</sub> immobilized *E.coli* FBR5 strain was determined as 19.14 g/L. It was determined that the obtained ethanol level compared with free cells enhanced by 26%. According to these results, it was shown that immobilization techniques had a positive effect on bioethanol production. The concentration of CaCl<sub>2</sub> solution used in the immobilization method could be an important parameter on ethanol production.

**Keywords:** Bioethanol, immobilization, calcium chloride

### GİRİŞ

Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) yüksek oksijen (%34.7) ve oktan (106-110) içeriği gibi birçok avantajlı özelliklere sahip olmasından dolayı benzin (C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>) gibi fosil kökenli yakıtlara alternatif bir enerji kaynağıdır (Kar ve Deveci, 2006; Nigam ve Singh, 2011). Biyoetanol şeker kamışı, şeker pancarı, melas, peynir altı suyu ve tozu, patates ve mısır gibi nişastalı ürünler ile lignoselülozik biyokütlelerden üretilir (Abanoz ve ark., 2012; Akbas ve ark., 2014; Sumer ve ark., 2015; Akbas ve Stark, 2016; Şar ve Akbaş, 2016; Sar ve ark., 2017a,b). Biyoetanol üretim miktarının artırılması için ise bakteriyel hemoglobin ekspresyonu ve immobilizasyon uygulamaları gibi çeşitli biyoteknolojik yöntemler uygulanmaktadır (Sanny ve ark., 2010; Milessi ve ark., 2015). Immobilizasyon tekrarlı fermantasyonda kullanılması, etanol ve inhibitör gibi çevresel faktörlere karşı koruyucu etki göstermesi nedeniyle avantajlı kullanıma sahiptir (Nikolić ve ark., 2010; Duarte ve ark., 2013).

Bu çalışmada, etanol üretiminde incelenmesinde kalsiyum-aljinat yöntemi ile etanol üreticisi *E.coli* FBR5 suşu'nun immobilizasyon metodu aşamasında CaCl<sub>2</sub> solüsyonun etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### Bakteri Suşları

Bu çalışmada, etanol üretebilen rekombinant *E.coli* FBR5 suşu kullanılmıştır (Dien ve ark., 2000).

### Ön Kültür Ortamların Hazırlanması

*E.coli* FBR5 suşu, %8 laktoz içeren WPM (pH 7.0) besiyeri (Sar ve ark., 2017a,b) içerisine inoküle edilerek 37°C'de bir gece boyunca çalkalamalı bir inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri kültürü hem immobilizasyon uygulaması için hem de fermantasyon ortamında ön kültür olarak kullanılmıştır.

### Hücre İmmobilizasyonu

Hücre immobilizasyonu kalsiyum-aljinat yöntemine göre uygulanmıştır. Bir gecelik kültürün OD<sub>600nm</sub> değeri 0.8 olacak şekilde sulandırılmış ve ardından 15 dakika süre ile 4000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet, UV ile steril edilen %3 sodyum aljinat solüsyonu (w/v) ile karıştırılmıştır. Sodyum aljinat ve hücre içeren süspansiyon iki farklı konsantrasyondaki CaCl<sub>2</sub> solüsyonlarına (Ca<sub>2</sub>; %2 ve Ca<sub>3</sub>; %3, w/v) damlatılarak boncuk yapı içerisinde immobilize hücreler elde edilmiştir. Elde edilen boncuklar %0.9 NaCl solüsyonu (w/v) ile yıkanmıştır.

### Fermantasyon

Biyoetanol üretimi için 100mL Erlenmayer Flask içerisinde 80mL WPM besiyeri (pH 7.0) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu besi ortamlarına serbest ve immobilize hücreler ayrı ayrı inoküle edilmiştir. Fermantasyon denemeleri ise 37°C'de, 180 devir/dakika çalkalamalı koşullarında ve 48 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Tüm denemeler en az 2 tekrarlı olacak şekilde denenmiştir.

### Analiz ölçümleri

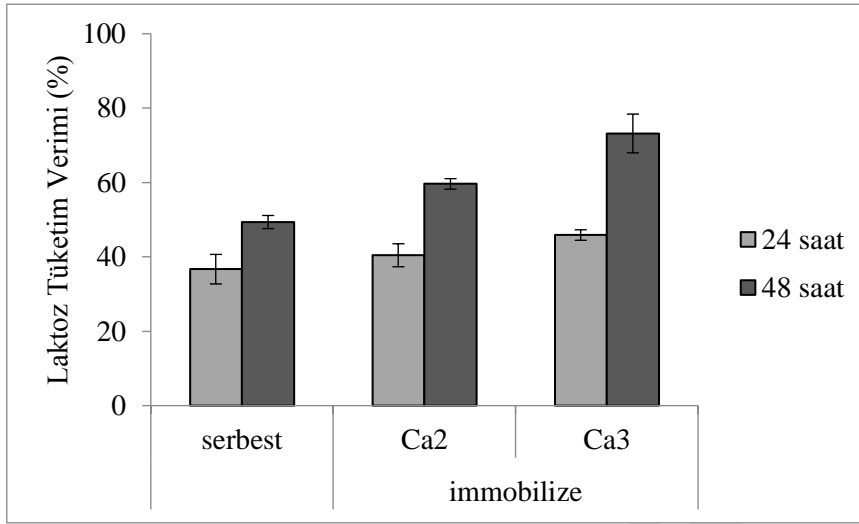
Fermantasyon sonrası kültürlerin kalan şeker miktarı ile üretilen etanol miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiştir (Sar ve ark., 2017a,b).

## SONUÇ

Çalkalamalı inkübatör koşullarında WPM besi ortamı ile 2 farklı CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda (Ca<sub>2</sub>; %2 ve Ca<sub>3</sub>; %3) immobilize edilen *E.coli* FBR5 suşu ile etanol üretimi gerçekleştirilmiştir. İmmobilize edilmeyen (serbest) FBR5 suşu ile etanol üretiminin 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında sırasıyla 10.06 g/L ve 15.19 g/L olduğu belirlenmiştir. %2 CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda (Ca<sub>2</sub>) immobilize edilen kültürler ile etanol üretim miktarının serbest hücre ile benzer olduğu görülmüştür. Daha yüksek CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonu (Ca<sub>3</sub>) ile immobilize edilen kültürlerin ürettiği alkol miktarı ise 24 saat süre sonunda 9.97 g/L iken 48 saat süre sonunda daha yüksek (19.14 g/L) olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 1). Ayrıca Ca<sub>3</sub> immobilize yöntemi elde edilen bu etanol miktarının serbest hücre ile elde edilene göre %26 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Laktoz tüketim verimleri değerlendirildiğinde ise immobilize hücreleri ile bu değerlerin daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 1).

**Tablo 1.** 24 ve 48 saat fermantasyon sonrası serbest ve immobilize (Ca<sub>2</sub> ve Ca<sub>3</sub>) *E.coli* FBR5 suşu ile üretilen biyoetanol (EtOH) miktarı (g/L) ve besi ortamında kalan şeker miktarı (%w/v). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Parantez içerisinde belirtilen değerler standart sapmaları ifade etmektedir.

		24 saat		48 saat	
		EtOH (g/L)	Kalan Şeker (%w/v)	EtOH (g/L)	Kalan Şeker (%w/v)
<i>E.coli</i> FBR5	serbest	10.06 (0.61)	5.07 (0.61)	15.19 (0.06)	4.05 (0.14)
	Ca <sub>2</sub>	9.83 (0.06)	4.77 (0.25)	15.86 (1.56)	3.23 (0.11)
	Ca <sub>3</sub>	9.97 (0.18)	4.33 (0.11)	19.14 (0.93)	2.14 (0.42)



**Şekil 1.** 24 ve 48 saat fermantasyon sonrası serbest ve immobilize (Ca2 ve Ca3) *E.coli* FBR5 suşu ile belirlenen laktoz tüketim verimi (%). Her değer en az iki tekrarın ortalamasıdır. Hata çubukları standart sapmaları ifade etmektedir

## TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada *E.coli* FBR5 suşu ile biyoetanol üretiminde immobilizasyonun etkisi incelenmiştir. Hücre immobilizasyonu için pek çok araştırmacı kalsiyum-aljinat, karregen, poliüretan, polivinil alkol gibi farklı materyalleri kullanmışlardır (Ramakrishna ve Prakasham, 1999). Immobilizasyon yönteminin ise ucuz, stabil ve mikroorganizmalar için uygun olmalıdır. Bundan dolayı hücre immobilizasyonu için genellikle endüstride pratik olarak uygulanabilecek olan kalsiyum-aljinat yöntemi kullanılmaktadır. Immobilizasyonun etanol üretimindeki etkisini incelemek için ise, bu çalışmada iki farklı konsantrasyondaki kalsiyum solüsyonu denenmiştir. Elde edilen verilere göre en fazla etanol üretim miktarı %3 CaCl<sub>2</sub> solüsyonu ile immobilize edilen hücreler ile sağlandığı belirlenmiştir

Elde edilen sonuçlar, etanol üretiminde immobilize hücrelerin olumlu bir etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, immobilize kültür sistemi ile sanayide etanol üretiminin pratik öneme sahip olabileceği belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gebze Teknik Üniversitesi (2016-A-13 ve 2017-A102-19) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abanoz K, Stark BC, Akbas MY 2012. Enhancement of ethanol production from potato-processing waste water by engineering *Escherichia coli* using *Vitreoscilla* haemoglobin. *Letters Applied Microbiology*, 55: 436-443.
- Akbas MY, Sar T, Ozcelik B 2014. Improved ethanol production from cheese whey, whey powder, and sugar beet molasses by “*Vitreoscilla* hemoglobin expressing” *Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 78: 687-694.
- Akbas MY, Stark BC 2016. Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(11): 1593-1609.
- Dien BS, Nichols NN, O'bryan PJ, Bothast RJ 2000. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84-86: 181-196.
- Duarte JC, Rodrigues JAR, Moran PJS, Valença GP, Nunhez JR 2013. Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3:31.
- Kar Y, Deveci H 2006. Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels. *Energy Sources Part A*, 28(10): 909-921.
- Milessi TSS, Antunes FAF, Chandel AK, Silva SS 2015. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: effect of cell concentration and stirring. *Bioengineered*, 6:26-32.

- Nigam PS, Singh A 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1): 52-68.
- Nikolić S, Mojović L, Pejin D, Rakin M, Vukašinović M 2010. Production of bioethanol from corn meal hydrolysates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass Bioenergy*, 34:1449-1456.
- Ramakrishna SV, Prakasham RS 1999. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*, 87-100.
- Sanny T, Arnaldos M, Kunkel SA, Pagilla KR, Stark BC 2010. Engineering of ethanolic *E. coli* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene enhances ethanol production from both glucose and xylose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 1103-1112.
- Sar T, Stark BC, Akbas MY 2017(a). Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin. *Bioengineered*, 8(2): 171-181.
- Sar T, Seker G, Erman AG, Stark BC, Akbas MY 2017(b). Repeated batch fermentation of immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for long-term use. *Bioengineered*, 8(5): 651-660.
- Şar T, Akbaş MY 2016. Biyoetanol Üretimi İçin Gıda İşleme Atıklarının Asit Hidrolizi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 14(1): 15-20.
- Sumer F, Stark BC, Akbas MY 2015. Efficient ethanol production from potato and corn processing industry waste using *E. coli* engineered to express *Vitreoscilla* haemoglobin. *Environmental Technology*, 36(18): 2319-2327.

## Guaiiazulen terpeninin *in vivo* bio-etkileri

Hatice Çelik, Handan Uysal\*

\* Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: hauysal@atauni.edu.tr

### Özet

Canlılık faaliyetleri için besinlerin içerikleri önemlidir. Farklı bio-etkileri olan ve bitkiler tarafından sentezlenen terpenler günümüzde, tıp, eczacılık, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılmaktadır. Ancak bu metabolitler bazen toksik yada mutajenik etkili de olabilirler. Guaiiazulen (Gua) seskiterpenlerin bir çeşididir ve kimyon, papatya ve mavi süt mantarı'ndan elde edilmektedir. Bu çalışma, farklı besinlerle vücuda alınan guaiiazulenin toksik ve genotoksik olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla yabancı tip *Drosophila melanogaster*'in erkek ve dişi bireylerine farklı dozlarda Gua kronik olarak uygulanmıştır. Gua uygulaması sonucu, *D. melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarında doz artışına bağlı olarak ömür uzunluğunun kısaldığı belirlenmiştir. Şöyleki; dişi popülasyonunda ortalama ömür uzunluğu DMSO (Gua'nın çözücüsü) kontrol grubunda 48,83±1,95 gün iken en yüksek uygulama grubu olan 200ppm'de 12,11±0.26 gün; erkek popülasyonunda ise bu değerler sırasıyla 48,30±2,22 ve 11,44±0,21 gün olarak bulunmuştur. Gua'nın bir diğer bio-etkisi, somatik mutasyonları uyarması ve doza bağlı olarak mutasyon frekansını artırmasıdır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'nden elde edilen verilere göre; klon indüksiyon frekansı DMSO kontrol grubunda 0,66 iken bu değer doz artışına bağlı olarak 50ppm için 0,87 ve 400ppm içinde 1,84 olarak belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansındaki artış genotoksik etkinin göstergesidir. Ömür uzunluğunda gözlenen kısalma da Gua'nın doz-süre etkileşimine bağlı olarak toksik etkisini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Drosophila melanogaster*, guaiiazulen, ömür uzunluğu, somatik mutasyon

### Bio-effects of guaiiazulen terpene *in vivo*

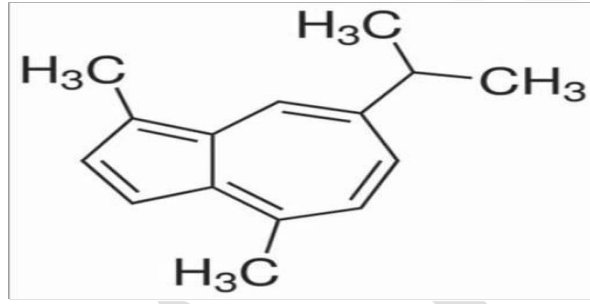
### Abstract

The contents of nutrients are important for vitality activities. Today, terpenes synthesized by plants due to their different bio-effects are used in medicine, pharmacy, cosmetics and food industry. However, these metabolites can sometimes be toxic or mutagenic. Guaiiazulen a variety of sesquiterpenes and is obtained from cumin, chamomile and blue milk fungi. This study was carried out to determine whether guaiiazulen taken with different foods was toxic and genotoxic. For this purpose, different doses of Gua chronically applied to male and female individuals of wild type *Drosophila melanogaster*. As a result of the application of Gua, it was determined that *D. melanogaster* shortened the life span due to dose increase in female and male populations. Namely; the average lifespan of female population was 48.83±1.95 days in the DMSO control group (Gua's solvent) and the highest application group (at 200ppm) was 12.11 ±0.2 days; in male population, these values were 48.30±2.22 and 11.44± 0.21days, respectively. Another bio-effect of Gua is that it stimulates somatic mutations and increases the frequency of the mutation depending on the dose. According to the data obtained from somatic mutation and recombination test (SMART), the clone induction frequency was 0.66 in the DMSO control group, this value was determined to be 0.87 in 50ppm and 1.84 in 400ppm due to dose increase. The increase in clone induction frequency is indicative of genotoxic effect. It shows the toxic effect of Gua due to dose-time interaction in shortening lifespan.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, guaiiazulene, longevity, somatic mutation

## GİRİŞ

Canlıların büyüme, gelişme ve üreme gibi normal metabolik reaksiyonlarında doğrudan görevi olmayan organik bileşiklere sekonder metabolitler denir. Sekonder metabolitler içerisinde 2000'den fazla kimyasal bileşen belirlenmiştir. Bu bileşenlerin en geniş ve yaygın grubu olan terpenler, hidrokarbonların bir sınıfı olup izopren birimlerinden biyosentetik olarak oluşan doğal maddelerdir. Literatür bilgilerine göre, antioksidan, antimutajen ve antikarsinojen özellikler gösteren terpenler, bu potansiyel etkilerinden dolayı biyolojik yönden aktif bileşiklerin kaynağını oluştururlar (Kırca ve ark., 2006). Farklı bitkilerde bir ya da birkaç terpen bulunabilir. Beş karbonlu izopren birimlerinin birleşmesi sonucu oluşurlar ve taşıdıkları izopren sayısına göre hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpen, tetraterpen ve politerpen olarak isimlendirilirler. Seskiterpenlerden birisi olan Guaiazulen (Gua), 3 izopren biriminden (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>) oluşmaktadır (Şekil 1.) Gua, yabani kimyongiller olarak bilinen *Guaiacum officinale*, *G. sanctum*, *G. coulteri* türlerinde, papatya (*Matricaria recutita*)'da, mavi süt mantarında (*Lactarius indigo*) ve yumuşak mercanlarda pigment olarak bulunmaktadır (Fiori ve ark., 2011). Bu terpen, günümüzde özellikle kozmetik alanında saç ve cilt bakımı, banyo ve temizlik ürünleri, saç boyası yapımı gibi kişisel bakım ürünlerinde yaygın kullanılmaktadır.



Şekil 1. Guaiazulen'in kimyasal yapısı

Çeşitli araştırmacılara göre, Gua'nın da diğer terpenler gibi antioksidan, antimikrobiyal ve anti-enflamatuar özellikleri vardır (Guarrera ve ark., 2001; Sleha ve ark., 2014). Ancak Togar ve ark., (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı dozlarda Gua'nın fare nöronlarında ve N2a nöroblastom hücrelerinde total antioksidan seviyesini azaltırken total oksidan seviyesini artırdığı görülmüştür. Aynı araştırmacıların yaptığı bir başka çalışmanın sonucunda yine farklı dozlarda Gua'nın (0-400 µg/mL<sup>-1</sup>) insan periferik lenfositlerinde sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (Togar ve ark., 2015). Bu konuda farklı organizmalar ve farklı terpenler ile yapılan bazı çalışmalarda da benzeri sonuçlar gözlenmiştir. Şöyle ki; terpenlerin bir çeşidi olan karvakrol fare kemik iliği hücrelerinde (Azırcak ve Rencüzoğulları, 2008), timol de insan lenfosit hücrelerinde doz artışına bağlı olarak genotoksik (Buyukleyle ve Rencüzoğulları, 2009), monoterpenlerden terpinolen, öjenol, izoöjenol ve sitral de *D. melanogaster*'de ömür uzunluğunu etkileyerek toksik etkili bulunmuştur (Zhang ve ark., 2016). Sunulan bu çalışmada doz-süre etkileşimine bağlı olarak Gua'nın kronik *in vivo* etkileri *D.melanogaster*'in erkek ve dişi popülasyonlarında çalışılmış ve ömür uzunluğu üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Ayrıca yine *Drosophila*'da kanat benek testi ile somatik mutasyonların uyarılıp uyarılmadığı da araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

**Kimyasal maddeler:** Guaiazulen (Gua: % 99.0, CAS No. 489-84-9), dimetil sülfoksit (DMSO: % 99.5, CAS No. 67-68-5), etil metansülfonat (EMS: CAS No.62-50-0) ve propiyonik asit (% 99.0, CAS No. 79-09-4) Sigma-Aldrich Şirketi'nden (St Louis, Missouri, ABD), *Drosophila* Instant Medium (DIM, Formül 4-24) ise Carolina Biyolojik Tedarik Şirketi'nden (2700 York Road, Burlington, ABD) satın alınmıştır.

**Kullanılan yabani ve mutant *Drosophila* soyları:** Genetik denemelerde model organizma olarak kullanılan ve halk arasında sirke sineği/meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* Oregon R, Diptera takımına ait yabani bir soydur. Bu soy, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kendileştirilmiş genetik olarak homozigot, hiçbir mutant karakter taşımayan, laboratuvar stoğudur. Kahverengi vücutlu, uzun kanatlı ve yuvarlak-kırmızı gözlü yabani tip ergin bireyler, agar, toz şeker, bira mayası, mısır unu, saf su ve kontaminasyonu önlemek için propiyonik asit ile hazırlanan Standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) içeren 250 ml'lik kültür şişeleri içinde, %40-60 bağıl nem ve 25±1°C sıcaklık ile sürekli karanlık koşulları taşıyan ısıtmalı-soğutmali sıcaklık kabinlerinde yaşatılmaktadır. Her 15 günde bir taze hazırlanmış SDB'ye aktarılan ergin ♀♀ ve ♂♂ ile çaprazlamalar yapılarak stoklar yenilenmektedir. Sinekler ışıklı ortama sadece besiyeri değişimi sırasında çıkarılmaktadır (Uysal ve ark., 2006).

Bu çalışmanın ikinci kısmında kullanılacak olan diğer soy ise *D. melanogaster*'in normal metabolik aktiviteye sahip *multiple wing hair (mwh)* ve *flare (flr<sup>3</sup>)* mutant soylarıdır. Bu soylar da diğer yabancı soylar gibi Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda uzun yıllardan beri kültüre alınmış ve yaşatılmaktadır. *mwh* geni, fenotipte hücre başına bir kanat trikomu (kılı) yerine çoklu kanat trikomlarını oluştururken, *flr<sup>3</sup>* geni sineklerin kanatlarındaki normal, düz ve uzun kıllar yerine körelmiş, amorfik kıl oluşmasına sebep olmaktadır (Graf ve ark.,1998).

**In vivo ömür uzunluğu testi:** Gua'nın ömür uzunluğu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla önce *D. melanogaster*'in ergin bireyleri kullanılarak (20♀♀ X 20♂♂) ön stoklar oluşturulmuştur. Erginlerin çiftleşmesi ve yumurta bırakımı için 8 saat beklenildikten sonra ergin ebeveynler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bırakılan yumurtalardan gelişen ve henüz çiftleşmemiş (virgin) aynı yaşlı (1-3 günlük) dişi ve erkek sinekler, 4-5 saatlik periyotlar halinde 3 gün süreyle toplanmış ve ayrı ayrı muhafaza edilmişlerdir.

Yapılan ön denemeler ile Gua'nın uygulama konsantrasyonları belirlendikten sonra iki ayrı deney seti hazırlanmıştır. Bunlardan biri yalnızca SDB içeren distile su ve Gua'nın çözücüsü olan DMSO kontrol grubu, diğeri ise 25, 50, 100, 200 ppm Gua içeren uygulama grubudur. Kontrol ve uygulama grupları, *D. melanogaster*'in hem ♀ hem de ♂ popülasyonları için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Deneyler her iki grup için eş zamanlı başlatılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait tüm kültür şişeleri aynı koşulları içeren sıcaklık kabinlerinde muhafaza edilmiştir. Bu çalışmada tek değişken parametre, farklı konsantrasyonlarda uygulanan Gua olmuştur. Deney süresince yaşayan bireylerin besiyerleri, haftada iki kez taze hazırlanan besiyerleri ile değiştirilmiştir. Gua uygulaması kronik yapıldığı için, özellikle deney gruplarında her değişim esnasında başlangıç konsantrasyonlarına dikkat edilmiştir. Ayrıca her değişimde kültür şişelerindeki bireyler kontrol edilerek yaşayan ve ölenlerin sayıları kayıt altına alınmış ve son birey ölünceye kadar sayımlar sürdürülmüştür. Tüm uygulama gruplarında çalışmalar üç kez tekrar edilmiştir.

**Drosophila kanat benek testi (somatik mutasyon ve rekombinasyon testi: SMART):** Gua'nın genotoksik potansiyelinin belirlenmesi için kullanılan bu testte, *D.melanogaster*'in *flare (flr<sup>3</sup>)* ve *multiple wing hair (mwh)* mutant soyları kullanılmıştır. Her iki soya ait stok kültürler hazırlanarak 4 saat aralıklarla çiftleşmemiş bireyler toplanmış ve taze besiyeri ortamına alınmıştır. Virgin ♀♀ *flr<sup>3</sup>* X ♂♂ *mwh* çaprazlamasından elde edilen 72±4 saatlik (2.evre) trans-heterozigot larvalar, kronik uygulama için farklı dozlarda (50,100, 200, 400 ppm) Gua içeren besiyerine konulmuştur. Gua uygulama grupları dışında negatif kontrol grubu olarak Gua'nın çözücüsü olan %1 DMSO, pozitif kontrol grubu olarak da 1mM EMS kullanılmıştır. Tüm uygulama gruplarına ait ergin bireyler oluştuktan sonra onlara ait kanat preparatları hazırlanmış ve ışık mikroskobu ile incelenmiştir (400X).

**İstatistiksel analizler:** Ömür uzunluğu çalışmalarından elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 13.0 programı kullanılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait ömür uzunluğu ortalama değerleri %5 düzeyinde Duncan testi ve korelasyon analizi ile karşılaştırılmıştır. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi ise Frei ve Würzler (1988)'in çoklu karar prosedürüne göre yapılmıştır.

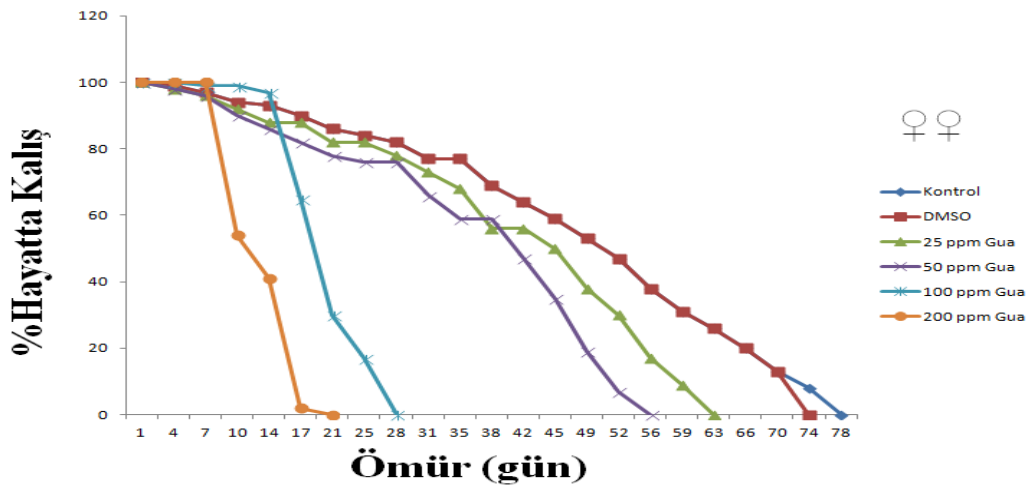
## SONUÇLAR

**Ömür uzunluğu testinden elde edilen bulgular:** Bu çalışmanın ilk bölümünde farklı konsantrasyonlarda Gua'nın (25, 50, 100, 200 ppm) *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonunda ömür uzunluğu üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Distile su kontrol (1) ile DMSO kontrol (2) gruplarında maksimum ömür uzunluğunun sırasıyla ♀ popülasyonunda 78, 74 gün; ♂ popülasyonunda ise 76, 74 gün olduğu görülmüştür (p>0,05). Bu değerler, 25 ppm Gua uygulama grubunda (3) 63 gün iken artan konsantrasyona bağlı olarak 200 ppm (6)'de 21 güne; ♂ popülasyonunda ise sırasıyla 57 günden 14 güne gerilemiştir (Tablo 1) ve artan konsantrasyona bağlı olarak bu fark istatistiksel olarak p<0,05 düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

**Tablo 1.** Gua uygulanmış *D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğunun karşılaştırılması

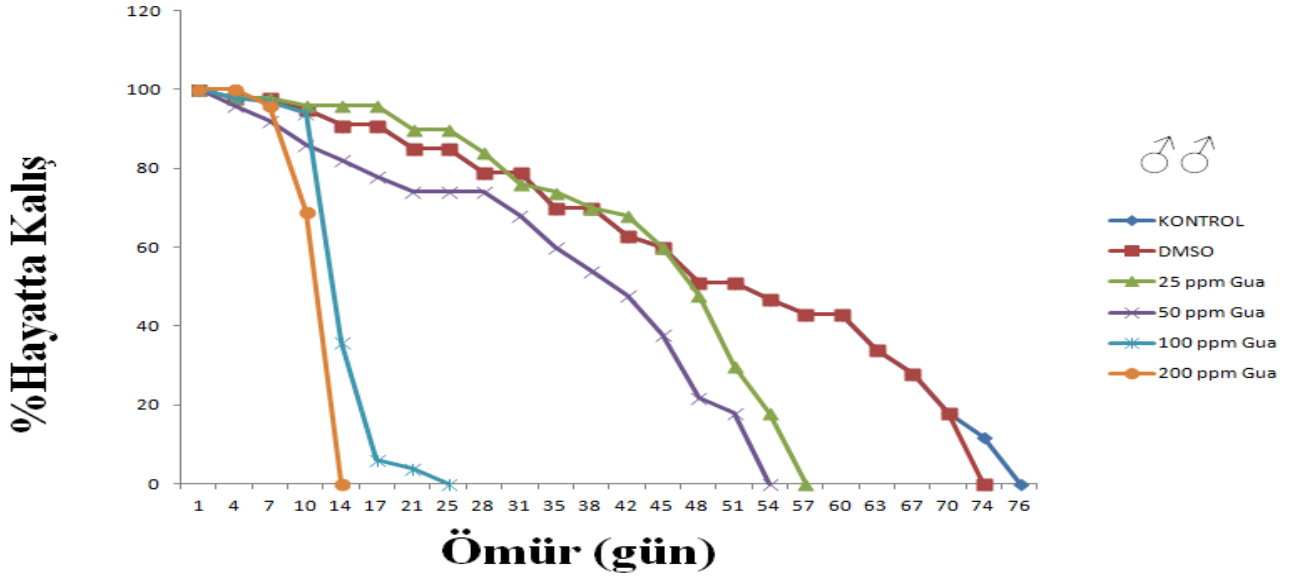
GUAIAZULEN								
Deney grupları	♀				♂			
	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (p<0,05)	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (p<0,05)
Kontrol (1)	100	78	49,15±1,99	1-4,5,6* 2-4,5,6* 3-5,6* 4-5,6* 5-6*	100	76	48,48±2,24	1-4,5,6* 2-4,5,6* 3-4,5,6* 4-5,6*
DMSO (2)	100	74	48,83±1,95		100	74	48,30±2,22	
25 ppm (3)	100	63	44,91±1,45		100	57	44,70±1,22	
50 ppm (4)	100	57	41,01±1,32		100	54	37,38±1,45	
100 ppm (5)	100	28	21,47±0,40		100	25	15,42±0,34	
200 ppm (6)	100	21	12,11±0,26		100	14	11,44±0,21	
Regresyon Düzeyi	R=-0,699				R=-0,722			

Bu çalışmada maksimum ömür uzunluğunun yanısıra ♀ ve ♂ popülasyonları için ortalama ömür uzunlukları da belirlenmiştir. Ortalama ömür uzunluğuna ait değerler, distile su kontrol (1) ve DMSO kontrol (2) grupları için ♀ popülasyonunda sırasıyla 49,15±1,99 ve 48,83±1,95 gün iken ♂ popülasyonunda 48,48±2,24 ve 48,30±2,22 gündür (Tablo 1). Gua uygulama gruplarında ise ♀ popülasyonunda 25 ppm'de (3) 44,91±1,45 günden 200 ppm'de (6) 12,11±0,26 güne; ♂ popülasyonunda da 44,70±1,22 günden 11,44±0,21 güne gerilemiştir. ♀ ve ♂ popülasyonu için çizilen hayatta kalış eğrileri Şekil 2 ve 3'de verilmiştir. Hem ♀ hem de ♂ popülasyonunda kontrol ve uygulama grupları arasında ortalama ömür uzunlukları bakımından gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05). Ayrıca artan Gua konsantrasyonuna bağlı olarak negatif korelasyon değeri de hesaplanmış ve bu değer ♀ popülasyonunda R = - 699, ♂ popülasyonunda ise R = -722 olarak bulunmuştur.



**Şekil 2.** ♀ popülasyonu için hayatta kalış eğrileri





Şekil 3. ♂ popülasyonu için hayatta kalış eğrileri

**Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinden elde edilen bulgular:** Bu çalışmanın ikinci bölümünde ise Gua'nın genotoksik etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Distile su ve DMSO negatif kontrol gruplarında küçük (KTT) ve büyük tek tip (BTT), ikiz,  $\Sigma$  *mwh* ve  $\Sigma$  klon tipleri için gözlenen değerler birbiriyle karşılaştırıldığı zaman sonuç istatistiki olarak ya negatif (-) ya da önemsiz (i) bulunmuştur. Ancak EMS pozitif kontrol grubunda tüm mutant klonların sayısında artış gözlenmiştir ve bu sonuçlar negatif kontrol gruplarına ait sonuçlar ile karşılaştırıldığı zaman aradaki fark istatistiki olarak  $p < 0,05$  düzeyinde önemlidir (Tablo 2).

En düşük Gua uygulama grubu olan 50 ppm'de KTT, BTT, ikiz,  $\Sigma$  *mwh* ve  $\Sigma$  klon tipleri için elde edilen değerler, kontrol gruplarına göre yükselmiş olsa da istatistiki olarak bu sonuçlar negatif ya da önemsizdir (Tablo 2). Bu nedenle 50 ppm den daha düşük dozlar ile çalışılmamıştır. 100 ppm için KTT, BTT, ikiz ve  $\Sigma$  *mwh* için klon sayıları artarken yalnızca  $\Sigma$  klon frekansı pozitif (+) sonuç vermiştir. Ancak en yüksek Gua uygulama grupları olan 200 ve 400 ppm de hem KTT,  $\Sigma$  *mwh* ve  $\Sigma$  klon sayıları artmış hem de klon frekansı istatistiki olarak pozitif (+) sonuç göstermiştir. Normal kanat fenotipine ait klon indüksiyon frekansı ise tüm uygulama gruplarında artış göstermiştir. Serrat kanat fenotipinde de özellikle en yüksek uygulama grupları olan 200 ve 400 ppm'de KTT, BTT,  $\Sigma$  *mwh* ve  $\Sigma$  klon tipleri için kontrol gruplarına göre sayısal bir artış gözlenmiştir. Ancak bu artış önemsiz (i) bulunmuştur. Hem normal kanat hem de serrat kanat için mutant klon sayısındaki artış toksik etkiyi gösterirken genotoksik etki yalnızca pozitif (+) istatistiksel değerlerin olduğu uygulama grupları için kabul edilmiştir (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Sekonder metabolitlerin önemli bir grubu olan terpenler, günümüzde farmakolojik özellikleri sebebiyle kozmetik, ilaç, gıda sektörlerinde, antioksidan ve antimutajen etkilerinden dolayı da aromaterapi ve fitoterapi alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bileşenler, oldukça farklı bitkilerden ve onların ana etken maddelerinden elde edilip hem ekonomik hem de bilimsel yönden değerlendirilmektedir. Terpenler ile ilgili olarak yaptığımız literatür taramalarında farklı organizmalar üzerinde daha önce yapılmış olan sınırlı sayıda çalışmalara rastlanılmış ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, bazı terpenlerin, antioksidan, antimutajen ve anti-aging (yaşlanma geciktirici) etkilerinin yanı sıra toksik, mutajenik ve genotoksik etkiler de gösterdiği/gösterebileceği bildirilmiştir.

**Tablo 2.** Gua uygulaması sonucunda SMART ile elde edilen bulgular

Kontrol ve uygulama grupları (ppm)	Kanat sayısı	KTT klon (m = 2)			BTT klon (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Σ <i>mwh</i> klon (m = 2)			Σ klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KIF)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
<b>(<i>mwh/flr</i><sup>3</sup>) Normal kanat</b>																	
Distile su	80	11	(0,13)		0	(0,00)		0	(0,00)		11	(0,13)		11	(0,13)		0,56
DMSO	80	11	(0,13)	i	2	(0,02)	i	0	(0,00)	-	13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66
EMS	150	48	(0,32)	+	16	(0,10)	+	11	(0,07)	+	64	(0,42)	+	75	(0,5)	+	2,00
50 ppm	80	16	(0,20)	i	1	(0,01)	i	0	(0,00)	-	17	(0,21)	i	17	(0,21)	i	0,87
100 ppm	80	19	(0,23)	i	4	(0,05)	i	3	(0,03)	i	23	(0,28)	i	26	(0,32)	+	1,33
200 ppm	80	23	(0,28)	+	6	(0,07)	i	2	(0,02)	i	29	(0,36)	+	31	(0,38)	+	1,58
400 ppm	80	27	(0,33)	+	8	(0,1)	i	1	(0,01)	i	35	(0,43)	+	36	(0,45)	+	1,84
<b>(<i>mwh/TM3</i>) Serrat kanat</b>																	
Distile su	80	7	(0,1)		0	(0,00)					7	(0,1)		8	(0,1)		0,40
DMSO	80	8	(0,1)	i	1	(0,01)	i	Dengeleyici <i>TM3</i>			9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
EMS	160	35	(0,21)	+	14	(0,08)	+	kromozomu			49	(0,36)	+	49	(0,30)	+	1,25
50 ppm	80	4	(0,05)	-	0	(0,00)	i	varlığında <i>flr</i> <sup>3</sup>			4	(0,05)	-	4	(0,05)	-	0,20
100 ppm	80	8	(0,1)	i	0	(0,00)	i	mutasyonu			8	(0,1)	i	8	(0,1)	i	0,40
200 ppm	80	11	(0,13)	i	2	(0,02)	i	gözlenmez.			13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66
400 ppm	80	14	(0,17)	i	1	(0,01)	i				15	(0,18)	i	15	(0,18)	i	0,76

KTT: küçük tek tip, BTT: büyük tek tip, No: klondaki mutasyon sayısı, Fr: mutasyon frekans, +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz, m: tesir faktörü.

Sunulan bu çalışmada, terpenlerin bir çeşidi olan Gua'nın, doz-süre etkileşimine bağlı olarak *D. melanogaster*'de hem ömür uzunluğunu kısalttığı hem de somatik mutasyonları uyarak genotoksisteye neden olduğu gözlenmiştir. Gua gibi bir terpen olan timol, *Timus vulgaris* ve *T. spicata* (kekik)'dan elde edilmektedir. Antimikrobiyal özelliğinden dolayı sabun, diş macunu, şampuan, deodorant ve ağız gargaraları da dahil olmak üzere birçok günlük bakım ürünüde kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan özelliği ile de akciğer rahatsızlıklarında, balgam söktürücü ve kas gevşetici olarak önerilmektedir (Shapiro ve ark., 1994). Ancak farklı dozlarda timol ve karvakrolün sıçanların kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliklerini önemli ölçüde uyardığı, mitotik indeksi azaltarak sitotoksik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir (Azirak ve Rencüzoğulları, 2008). Büyükleyla ve Rencüzoğulları (2009), kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus oluşumuna yol açtığı için timolü genotoksik etkili bulmuşlardır. Timol ve daha farklı terpenlerin organizmalar üzerinde mutajenik, genotoksik ve sitotoksik etkilere sebep olduğu/olabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Stammati ve ark., 1999 ; İpek ve ark., 2005). Şöyle ki; *Salvia fruticosa* Mill. (Anadolu adaçayı) ve *Mentha pulegium* (nane)'da bulunan sineol, tujon, kamfor, pulegon ve menton gibi terpenlerin *Bactrocera oleae* (zeytin meyvesi sineği) ve *D. melanogaster* (meyve sineği) üzerine toksik ve genotoksik etkileri SMART ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre kamfor, pulegon ve menton'un *B. oleae*'da mutajenik etkili, sineol'ün *B. oleae* için toksik, kamfor'un ise çalışılan her iki organizmada da zayıf toksik etkili olduğu bulunmuştur (Kounatidis ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da Gua, *D. melanogaster*'de somatik mutasyonları uyardığı için genotoksik etkili bulunmuştur. Ayrıca artan uygulama dozlarına bağlı olarak toksik etkisi ile yine *D. melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğunu sınırlandırıcı *in vivo* etki göstermiştir. Farklı dozlarda Gua'nın (0-400 µg/mL<sup>-1</sup>) kullanıldığı bir başka çalışmada, Togar ve ark., (2015) tarafından insan periferik lenfositlerinde de sitotoksik etki gözlenmiştir. Aynı araştırmacılara göre, Gua kullanımı ile nöronlarda total antioksidan seviyesi azalırken total oksidan seviyesi artmaktadır (Togar ve ark., 2015). Bilindiği gibi oksidatif stres, hücre ve doku hasarının patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu da oksidan moleküllerinin hücrenin yapı taşları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler gibi makro moleküller üzerindeki reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Sonuç itibarıyla oksidatif stres ile tetiklenen/tetiklenebilecek hem hücre döngüsü hataları hem de nükleer materyaldeki bozunmalar "bizim çalışmamızda gözlediğimiz genotoksistenin ve yaşlanmanın etyopatolojisinde rol oynamaktadır" diyebiliriz.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2019-7000).

## KAYNAKLAR

- Azirak S, Rencuzogullari E 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6): 728-735.
- Büyükleyla M, Rencüzoğulları E 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3): 943-947.
- Fiori J, Teti G, Gotti R, Mazzotti G, Falcon M 2011. Cytotoxic activity of guaiazulene on gingival fibroblasts and the influence of light exposure on guaiazulene-induced cell death. *Toxicology in Vitro*, 25: 64-72.
- Frei H, Würzler FE 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203: 297-308.
- Graf U, Abraham SK, Guzman-Rincon J, Würzler FE 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 402: 203-209.
- Guarrera M, Turbino L, Rebora A 2001. The anti-inflammatory activity of azulene. *J. of European Academy of Dermatology and Venereology*, 15:486-7.
- İpek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Baser KHC 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food and Chemistry*, 93: 551-556.
- Kırca A, Özkan M, Cemeroglu B 2006. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry*, 97: 598-605.
- Kounatidis I, Papoti Vt, Nenadis N, Franzios G, Oikonomou M, Partheniou F, Tsimidou M, Mavragani-Tsipidou P 2009. Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (Voo) using the *Drosophila* wing-spot test. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17): 7785-9.
- Shapiro S, Meier A, Guggenheim B 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components toward oral bacteria. *Molecular Oral Microbiology*, 9: 202-208.
- Sleha R, Mosio P, Vydrzalova M, Jantovska A, Bostikova V, Mazurova J 2014. *In vitro* antimicrobial activities of cinnamon bark oil, anethole, carvacrol, eugenol and guaiazulene against *Mycoplasma hominis* clinical isolates. *Biomedical Papers Olomouc*, 158(2): 208-11.
- Stammati A, Bonsi P, Zucco F, Moezelaar R, Alakomi HL, Wright A 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 813-823.
- Togar B, Çelik K, Türkez H 2015. *In vitro* cytotoxic, genotoxic and antioxidant/oxidant effects of guaiazulene on human lymphocytes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(1):61-67.
- TOGAR B, TURKEZ H, HACİMUFTUOĞLU A, TATAR A, GEYİKOĞLU F 2015. Guaiazulene biochemical activity and cytotoxic and genotoxic effects on rat neuron and N2a neuroblastom cells. *J. Of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1): 29-33.
- Uysal, H., Şişman, T. Aşkın, H 2006. *Drosophila* Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri. Erzurum, Türkiye, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 53 pp. ISBN:975-442-111-0.
- Zhang Z, Yang T, Zhang Y, Wang L, Xie Y 2016. Fumigant toxicity of monoterpenes against fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Industrial Crops and Products*, 81: 147-151.

## Antibacterial activity of propolis collected in different regions from Algeria

Meltem Asan-Ozusaglam<sup>1\*</sup>, Songul Tacer<sup>1</sup>, Safia Boulechfar<sup>2</sup>, Amar Zellagui<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Letters, University of Aksaray, Aksaray, Turkey.

<sup>2</sup>Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Life Science and Nature Department, Faculty of Exact Science and Life Science and Nature, University of Larbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi, Algeria

Corresponding author e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

### Abstract

Propolis is a complex mixture of resinous substances collected by honeybees from various plant sources. The aim of the present study was to investigate the antibacterial activities of fatty acid and methanolic extracts from propolis samples collected from various geographical regions of Algeria against *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Streptococcus agalactiae* Pas. Inst. 55118. The antimicrobial activities of the propolis extracts were tested using disc diffusion and microdilution-broth methods. The results of disc diffusion method showed that, the highest and the lowest inhibitory activities against *E. coli* ATCC 35218 and *S. agalactiae* Pas. Inst. 55118 were obtained from B (fatty acid, 12.56 mm) and Sample 7 (methanolic extract, 21.26 mm). The minimal inhibition and bactericidal concentration values for the test microorganisms were in the range of 0.5-4 µg/µL. Considering the results, the propolis extract showed various degree antimicrobial activity dependently on their geographic origin and ecosystems. Therefore, they can be suggested as natural additives or preservatives in various industries.

**Keywords:** Propolis, antibacterial activity, fatty acid, methanolic extract

### INTRODUCTION

Propolis is a natural substance produced by honeybees (*Apis mellifera*) from plants especially flowers and buds by mixing with wax and resin. This mixture is used for strengthening the nest, protecting against microorganisms and covering the carcass of a hive invader (Higashi and Castro, 1994). The mixture contains bee wax, essential oils, pollen, organic debris (Seidel et al., 2008). Its chemical composition varies due to the geographic and plant origins of these resins (Bankova et al., 2000). In addition, antimicrobial activity has been shown to be different from propolis origin (Hegazi et al., 2000; Hegazi and El Hady 2001) correlated with chemical composition. Propolis has been used in traditional medicine since ancient times. Many biological properties including antibacterial, antiviral, antifungal, antiparasitic, antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, local anesthetic, immunostimulating, hepatoprotective, cytostatic activities and antitubercular have been described (Higashi and Castro, 1994; DeCastro and Higashi, 1995; Scheller et al., 1998; Kartal et al., 2003; Yildirim et al., 2004). Today, it is a natural remedy found in many food or health stores (Burdock, 1998). The medical applications of propolis resulted in increased interest in its antimicrobial activities.

The aim of this study was to investigate antimicrobial potency of 8 methanolic extracts and a fatty acid from propolis samples obtained from different regions of Algeria against *E. coli* ATCC 35218 and *S. agalactiae* Pas. Inst. 55118, and to explore changes in the antimicrobial activity of propolis between regions of Algeria.

### MATERIALS AND METHODS

#### Propolis origin

The propolis samples were collected from *Apis mellifera* hives located at different geographic regions of Northeastern Algeria: Collo, El harrouch, Taref, Constantine, Setif, Mila, Batna, Oum el Bouaghi (Table1).

#### Preparation of methanolic extracts

The methanolic extracts were obtained by the methodology described by Park & Ikegaki (1998). Air-dried powdered material (20 g) of propolis was extracted three times with 200 ml hydroalcoholic solution (80% MeOH, 20% Distillated water) for 72 h. After filtration, the filtrate was evaporated, concentrated and was stored under dry conditions at 4°C until used.

### Extraction of essential oil

The essential oil was obtained via hydrodistillation by using a Clevenger type apparatus for 3 h and was stored under dry conditions at 4°C until used.

### Determination of antibacterial activity

#### Disc diffusion assay

Disc diffusion method was used for the determination of the antimicrobial activity of propolis methanolic and fatty acid extracts. *Escherichia coli* ATCC 35218 (Gram-negative) and *Streptococcus agalactiae* Pasteur Institute 55118 (Gram-positive) were used as test microorganisms and cultured on Nutrient broth/agar and TSB broth/agar mediums at 37 °C. The bacterial suspension was adjusted by comparing with 0.5 McFarland and then inoculated on specific agar medium. Sterile discs were placed on the inoculated plates. Then, 15 µL (150 µg/disc) of the extracts were dropped on to these discs. Petri plates were incubated for 24 h at 37 °C temperature. At the end of the incubation period, the inhibition zones results are recorded. All the experiments were performed in duplicates.

#### Minimal Inhibition (MIC) and Bactericidal (MBC) Concentrations

MIC and MBC values of the extracts were determined against the tested microorganisms by microdilution method. The test microorganisms in a concentration of 0.5 McFarland were added to each tube (containing extract and growth medium) and mixed gently. Then, the tubes containing the mixture were incubated for 24h at 37 °C. After incubation, inhibition of the growth in broth medium was evaluated as MIC values. 5µL samples from tubes were inoculated to specific agar medium and incubated at 37 °C for 24 h. At the end of the incubation period, the concentrations of the extracts that prevent the growth of a microorganism on the solid media were evaluated as MBC values.

## RESULTS

The prepared extracts of propolis samples from different regions of Algeria were presented in Table 1.

Table 1. Extracts of Propolis samples

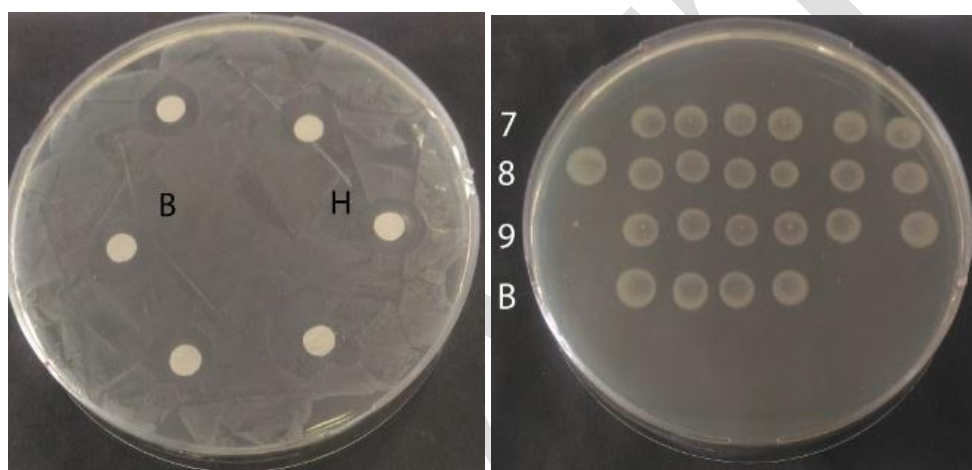
Samples	Extract	Collection Region	City
1	Methanolic	Menia	Constantine
2	Methanolic	Grarem	Mila
3	Methanolic	Collo	Skikda
5	Methanolic	El Harrouch	Skikda
6	Methanolic	Bouteldja	Taref
7	Methanolic	Babor	Sétif
8	Methanolic	Babor	Sétif
9	Methanolic	Oum el Bouaghi	Oum el Bouaghi
B	Essential oil	Mestaoua&Chelalamountains	Batna

Antimicrobial activity of propolis extracts samples were determined using discs diffusion and microdilution method and the results were presented in Table 2. The extracts showed different inhibitory activity against all the tested bacteria. The inhibition zone values for *E. coli* 35218 ranged between 8.76-12.56 mm (Figure1). The highest and lowest inhibitory activities were observed for 7 and 6 samples among the tested methanolic extracts. The fatty acid sample (B) showed the highest inhibitory activity (12.56 mm) among all the tested samples. MIC and MBC values for *E. coli* 35218 were in the range of 0.5-2 µg/µL and 2-4 µg/µL.

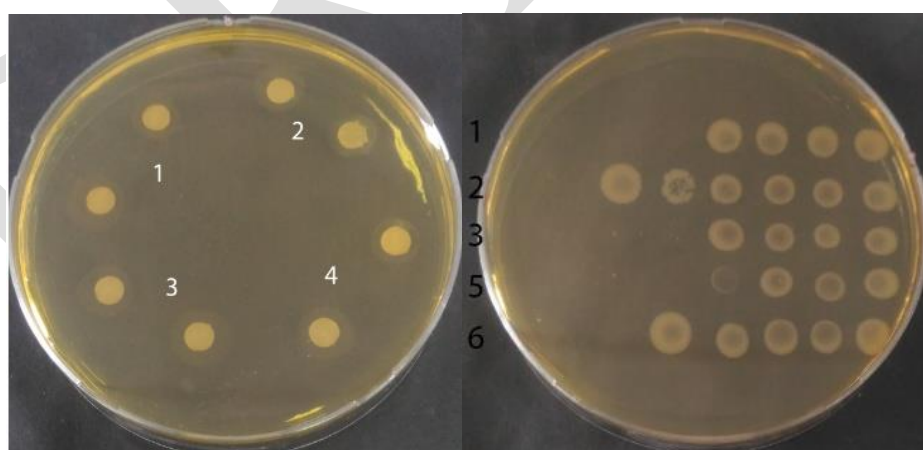
The inhibition zone diameters of the samples against *S.agalactiae* Pas. Inst. 55118 were varied from 8.97 mm to 21.26 mm (Figure 2). The highest inhibition zone was determined at sample of 7, and this was followed by Sample 9 and Sample 6. On the other hand, among all the tested bacteria, the lowest inhibition zone was determined at sample of 6. The fatty acid (Sample B) against *S.agalactiae* Pas. Inst. 55118 showed lower inhibition zone diameter (10.46 mm) than against *E. coli* ATCC 35218. MIC and MBC values for *S.agalactiae* Pas. Inst. 55118 were in the range of 0.5-2 µg/µL and 0.5-4 µg/µL.

**Table2.** Antimicrobial activity of propolis samples

Samples	Inhibition zone diameter (mm)		MIC ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )		MBC ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	
	<i>E.coli</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.agalactiae</i>
	ATCC 35218	Pas. Inst. 55118	ATCC 35218	Pas. Inst. 55118	ATCC 35218	Pas. Inst. 55118
<b>1</b>	9.16 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	14.35 $\pm$ 0.09	1	0.5	2	0.5
<b>2</b>	9.52 $\pm$ 0.47	14.23 $\pm$ 0.07	1	0.5	4	2
<b>3</b>	9.22 $\pm$ 0.11	14.54 $\pm$ 0.05	0.5	0.5	2	0.5
<b>5</b>	9.30 $\pm$ 0.28	14.58 $\pm$ 0.25	1	1	4	0.5
<b>6</b>	8.76 $\pm$ 0.23	16.58 $\pm$ 0.22	1	0.5	2	1
<b>7</b>	10.65 $\pm$ 0.04	21.26 $\pm$ 0.22	1	0.5	2	1
<b>8</b>	6.27 $\pm$ 0.09	8.97 $\pm$ 0.62	2	1	4	4
<b>9</b>	7.60 $\pm$ 0.39	16.86 $\pm$ 0.08	1	1	2	2
<b>B</b>	12.56 $\pm$ 0.18	10.46 $\pm$ 0.55	1	2	2	4



**Figure 1.** Inhibition zones and MBC values of propolis methanolic extracts and fatty acid against *E. coli* ATCC 35218



**Figure 2.** Inhibition zones and MBC values of propolis methanolic extracts against *S.agalactiae* Pas. Inst. 55118

## DISCUSSION

The nine different propolis extracts exhibited antimicrobial activity against *E. coli* 35218 (Gram-negative) and *S.agalactiae* Pas. Inst. 55118 (Gram-positive) bacteria with various potency. In the literature, the antimicrobial activity of propolis has been reported to be due to bacterial cell membrane damage and lysis of cell (Bryan et al., 2016). The activity also has the ability to inhibit cell division, bacterial motility and protein synthesis (Mirzoeva et al., 1997). Many researcher have studied the antibacterial activity of propolis and its extracts against gram-positive and gram-negative bacteria, and found that propolis has antibacterial activity against a wide range of gram-positive strains but has limited or no activity against gram-negative strains (Grange and

Davey, 1990; Dobrowolski et al., 1991; Marcucci , 1995; Kujumgiev et al., 1999; Kartal et al., 2003). In accordance with literature data, the extracts of propolis samples showed more antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*S.agalactiae* Pas. Inst. 55118) than Gram-negative bacteria (*E. coli* 35218). However, the results are not similar to the results obtained by Gonsales et al. (2006), found that ethanolic extract of propolis collected in different region of Brazil did not show any antibacterial activity against *E. coli* 35218. On the other hand, Katircioğlu and Mercan (2006) have been reported that ethanolic extract of propolis samples collected from different regions of Turkey showed greater inhibition zone diameter ( $\geq 12$  mm) on *E. coli* 35218 bacteria in their study than the tested methanolic extracts in this study. These results showed that the differences of regions and the used solvents effect on antimicrobial activity of propolis.

## CONCLUSION

The propolis samples had a marked antibacterial action against both of the gram-positive strain and gram-negative bacteria in the presented study. The results revealed that the propolis samples showed various antimicrobial activities dependently on their geographic origin and they can be suggested as natural additives or preservatives in various industries.

## REFERENCES

- Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3–15. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Bryan J, Redden P, Traba C 2016. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Letters and Applied Microbiology*, 62(2): 192-198.
- Burdock GA 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemistry Toxicology*, 36: 347–363.
- DeCastro SL, Higashi KO 1995. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 46: 55-58.
- Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K et al. 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35: 77-82.
- Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes Júnior A, Rodrigues P, Funari S R C 2006. Antibacterial activity of Propolis collected in different regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12(2):276-284.
- Grange JM, Davey RW 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of Royal Society of Medicine*, 83: 159-160.
- Hegazi AG, Abd El Hady F K, Abd Allah FA 2000. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55, 70–75.
- Hegazi AG, El Hady, FK 2001. Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56, 82–88.
- Higashi KO, Castro S 1994. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 43: 149-155.
- Kartal M, Yıldız S, Kaya S et al. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86: 69-73.
- Katircioğlu H, Mercan N 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*, 5 (11):1151-1153.
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjeva Y et al. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235-240.
- Marcucci MC 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26: 83-99.
- Mirzoeva O, Grishanin R, Colder P 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3): 239-246.
- Park YK, Ikegaki M 1998. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 2230-2232.
- Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J 2008. Comparative Study of the Antibacterial Activity of Propolis from Different Geographical and Climatic Zones. *Phytotherapy Research*, 22: 1256-1263.

## Antimicrobial activity of jojoba leaf extracts against *Candida* species and probiotic candidate lactic acid bacteria

Meltem Asan-Ozusaglam\*, Ayse Yavuz, Songul Tacer

Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Letters, University of Aksaray, Aksaray, Turkey.

Corresponding author e-mail: meltemozusaglam@gmail.com

### Abstract

Jojoba (*Simmondsia chinensis*) is an evergreen medicinal plant and is cultivated for various purposes in many countries. Jojoba is being cultivated coastal areas of the Mediterranean and Aegean regions of Turkey. Nowadays, there is an increasing interest in the use of natural antibacterial compounds such as extracts and essential oils of plants which have long been used as natural agents for health promoting purposes due to the presence of antimicrobial compounds. In the study, antifungal activity of leaf extracts (ethanol, methanol and acetone) from Jojoba was investigated against to *Candida glabrata* RSKK 04019 and *C. albicans* ATCC 10231 to determine their potential use as natural antifungal additives. The antibacterial activity of the extracts at the same concentration (1500 mg) also tested on probiotic candidate lactic acid bacteria (eight *Streptococcus thermophilus* and two *Enterococcus faecium* strains) originated from human breast milk. The antimicrobial potential of Jojoba leaf extracts was determined by using disc diffusion method and microdilution-broth methods. The extracts (1500 mg/disc) of leaf from Jojoba showed antifungal activity against all the tested fungi from clinical origin at a range of 8.57-10.69 mm. Most of the probiotic candidate lactic acid bacteria strains can also survive their viability at the same concentration of the extracts (1500 mg). The results showed that the leaf extracts from Jojoba can be used as a natural antifungal agent against the *Candida* species. Also, the combination of the natural bio-preservatives (the extracts and the lactic acid bacteria strains) may have a potential use in health promoting substance.

**Keywords:** *Simmondsia chinensis*, anti-*Candida*, antibacterial

### INTRODUCTION

Plants are very good sources of medical compounds that have continued to play an important role in the protection of human health since ancient times (Mariita et al., 2011). Because of the antimicrobial properties of extract of plant parts, their use in therapeutic treatments is of great importance. Jojoba (*Simmondsia chinensis*) is an evergreen plant and native to America and Mexico (Dunstone and Begg, 1983). Plant extracts of Jojoba has beneficial effects as nutrient additive, food additive functional food component and medical food. Various extracts of the Jojoba plant are widely used as therapeutic agents in various countries. Today, due to high medical and economic value of Jojoba is also growing in coastal areas of the Mediterranean and Aegean regions in Turkey (Ayanoğlu and Ayanoğlu, 1995). It is generally grown for its wax (Ayanoğlu, 2000). In the most studies, the antimicrobial activity of the essential oil obtained from the seeds of the Jojoba plant against has been investigated against various pathogens (Pooja Umaiyal et al., 2016; Al-Ghamdi et al., 2019). In the literature, there are limited studies on the antifungal activity of Jojoba plant extracts, especially leaf extracts against fungal pathogens.

*Candida* is opportunistic fungal pathogen of human cutaneous, oral, gastrointestinal, vaginal and other mucosal surfaces. It contains about 200 species of yeast (Filler and Sheppard, 2006). *Candida albicans* is the most common fungal pathogen in humans. It constitutes more than 90% of cases of severe fungal infections (Kauffman, 2006). However, other *Candida* species, including *C. glabrata*, are now posing serious nosocomial threats to patient populations (Chakrabarti et al., 2009). In the treatment of *Candida* infections, the widespread use of a limited number of antifungal agents has led to the development of drug resistance. Therefore, new antifungal agents are needed for the treatment of *Candida* infections (Alexander and Perfect, 2000). Lactic Acid Bacteria (LAB), recognized as generally safe, are the most widely used probiotic culture for use in a variety of processes and have therapeutic effects on host health. *Streptococcus thermophilus* is one of (LAB) and is a Gram-positive bacterium. It is considered the second most important industrial LAB after *Lactococcus lactis* (De Vuyst, and Tsakalidou, 2008, Hols et al., 2005). Some *Enterococcus faecium* has long been useful as a probiotic and has been widely used worldwide. Some *E. faecium* strains are used in pharmaceutical preparations (Franz et al., 2011).



The aim of the present study was to determine antifungal activity of Jojoba leaf extracts on *Candida* species. The antibacterial activity of the extracts was also tested on LAB (total ten *S. thermophilus* and *E. faecium* strains) originated from human breast milk to determine potential use of the combination of these natural bio-preservatives (the lactic acid bacteria strains and the extracts) in fungal treatments.

## MATERIALS AND METHODS

### Test Microorganisms

Two fungi (*Candida glabrata* RSKK 04019 and *C. albicans* ATCC 10231) and ten LAB strains (Eight *S. thermophilus* and two *E. faecium* strains) were used as test microorganisms for the determination of antimicrobial activity. All the microorganisms used in the current study were made active twice.

### Preparation of extracts

*Jojoba* (*Simmondsia chinensis*) was obtained from Mersin Alata Horticultural Research Institute. The leaves of the plant were washed and then dried. Then, the dried leaf samples were ground using a grinder (Waring) and extracted in a Soxhlet extractor with methanol (M), ethanol (E) and acetone (A) for 24 h (Figure 1). The samples were then filtered through Whatman No. 1 paper. The extracts were evaporated with a rotary evaporator and then dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO).



Figure 1. Preparation of leaf extracts from Jojoba

### Determination of antimicrobial activity

#### Disc diffusion assay

Disc diffusion method was used for the determination of the antimicrobial activity of Jojoba leaf extracts. The culture suspensions were adjusted with comparing with 0.5 McFarland. The adjusted microorganisms were spread on specific agar medium (YEPD for fungi, M17 for *S. thermophilus* and MRS for *E. faecium*) in sterile conditions. Sterile discs were then placed on the inoculated plates and 15  $\mu$ L of the leaf extracts were dropped onto the discs. Ampicillin (AM) and Flucanazole (FCA) antibiotic discs were used for the fungal strains and Amikacin (AM) and Ofloxacin (OFX) were used for LAB as controls. The plates were incubated for 24 h at appropriate growth temperatures (30°C for *Candida* species, 37°C for LAB). The diameters (mm) of the inhibition zones were measured. Each assay was repeated twice.

#### Determination of Minimal Bactericidal (MBC) or Minimal Fungicidal Concentrations (MFC)

MBC and MFC values of the extracts were determined by microdilution method. The test microorganisms adjusted to 0.5 Mc Farland were added to each tube containing extract and growth medium. The tubes containing the mixture were incubated for 24 h at appropriate growth temperatures. Then, 5 $\mu$ L samples from each tube were dropped onto specific agar medium to determine MBC or MBC values. The plates were incubated at appropriate growth temperatures for 24 h. The concentrations of the extracts that prevent the growth of a microorganism on the solid media were evaluated as MBC or MFC values.

## RESULTS

The ethanol, methanol and acetone extracts (1500 mg/disc) of leaf from Jojoba showed anti-fungal activities against the tested fungi from clinical origin at a range of 8.57-10.69 mm (Table 1). The highest antifungal activities against *C. glabrata* RSKK 04019 and *C. albicans* ATCC 10231 were determined from acetone extract (10.69 mm and 9.97 mm). The lowest inhibitory activity was recorded from methanolic extract for both

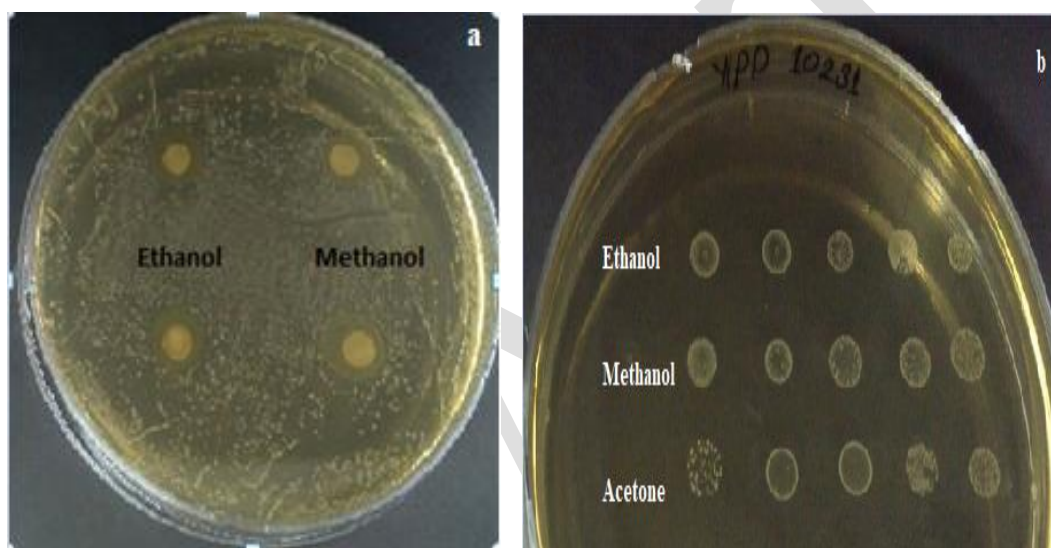
fungi. The MFC values were ranged between 10 mg/mL and 40 mg/mL. The acetone extract showed the highest inhibition zone and the lowest MFC value against *C. glabrata* RSKK 04019 (Figure 2).

**Table 1.** Antifungal activity of various leaf extracts from Jojoba

Test microorganisms	MFC (mg/mL)			Inhibition zone diameter (mm) (1500 mg/disc)			Antibiotics Inhibition zone diameter (mm)	
	E	M	A	E	M	A	AM <sup>c</sup> (10 µg/disc)	FCA <sup>d</sup> (10 µg/disc)
<i>C. glabrata</i> RSKK 04019	220	22 0	110	10.33 ±0.39 <sup>a</sup>	10.04 ±0.34	10.69 ±0.50	- <sup>b</sup>	13.25 ±0.01
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	440	44 0	440	9.12 ±0.25	8.57 ±0.07	9.97 ±0.75	-	25.06 ±1.92

<sup>a</sup>Diameter of the inhibition zone including disc diameter. Values are reported as means SD of two separate experiments.

<sup>b</sup> Indicates no antimicrobial activity. <sup>c</sup> Ampicillin, <sup>d</sup> Fluconazole



**Figure 2.** (a) Antimicrobial activity of Ethanol leaf extract from Jojoba against *C. glabrata* RSKK04019  
(b) MFC values of various Jojoba plant extracts against *C. albicans* ATCC10231

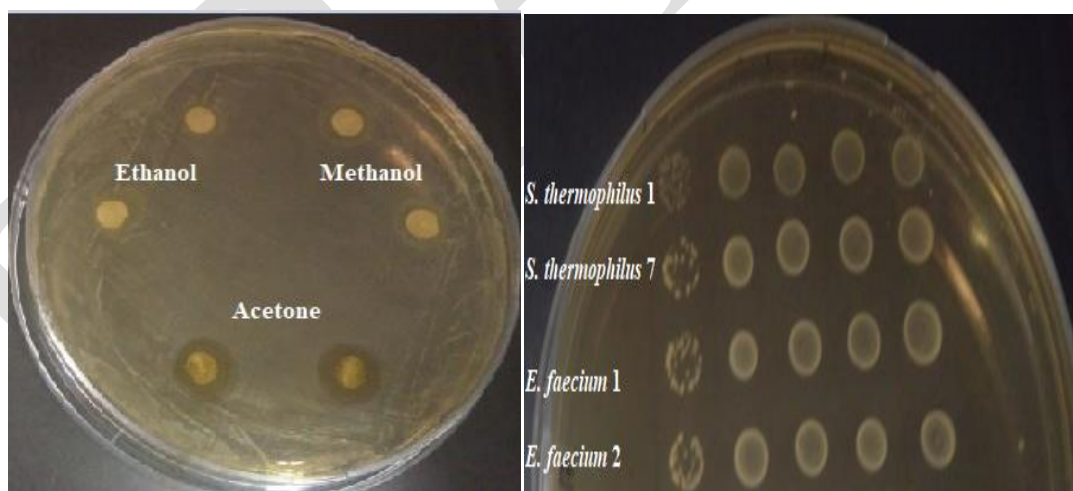
The antibacterial activity of the extracts against some probiotic candidate LAB strains originated from human breast milk was also determined. The ethanolic and methanolic extracts (1500 mg/disc) of leaf showed no inhibitory activity on total ten LAB strain. Among the eight *S. thermophilus* strains, the acetone extract (1500 mg/disc) only inhibited the growth of *S. thermophilus* 1 and *S. thermophilus* 7 strains with inhibition zone diameter of 9.37 mm and 10.07 mm (Table 2). MBC values for both *S. thermophilus* strains were recorded as 40 mg/mL. The acetone extract (1500 mg/disc) also inhibited both of the *E. faecium* strains. The inhibitory zone diameter of the acetone extract was determined as 9.99 mm and 10.12 mm for *E. faecium* 1 and *E. faecium* 2 with MBC value of 40 mg/mL (Figure 3).

**Table 2.** Antibacterial activity of various leaf extracts from Jojoba

LAB strains	MBC (mg/mL)			Inhibition zone diameter (mm) (1500 mg/disc)			Antibiotics Inhibition zone diameter (mm)	
	E	M	A	E	M	A	AK <sup>c</sup> (30 µg/disc)	OFX <sup>d</sup> (5 µg/disc)
<i>S.thermophilus</i> 1	-	-	40	-	-	9.37 ±0.13 <sup>a</sup>	9.28 ±0.32	19.96 ±0.51
<i>S.thermophilus</i> 2	-	-	-	-	-	- <sup>b</sup>	12.59 ±0.31	21.21 ±0.83
<i>S.thermophilus</i> 3	-	-	-	-	-	-	15.61 ±1.32	22.35 ±0.56
<i>S.thermophilus</i> 4	-	-	-	-	-	-	15.65 ±0.78	25.74 ±0.06
<i>S.thermophilus</i> 5	-	-	-	-	-	-	8.77 ±0.19	20.96 ±1.13
<i>S.thermophilus</i> 6	-	-	-	-	-	-	18.02 ±0.75	24.02 ±0.39
<i>S.thermophilus</i> 7	-	-	40	-	-	10.07 ±0.32	-	22.88 ±1.75
<i>S.thermophilus</i> 8	-	-	-	-	-	-	14.34 ±1.75	20.13 ±1.02
<i>E. faecium</i> 1	-	-	40	-	-	10.12 ±0.25	-	21.24 ±0.12
<i>E. faecium</i> 2	-	-	40	-	-	9.99 ±0.36	11.86 ±0.29	14.88 ±2.36

<sup>a</sup>Diameter of the inhibition zone including disc diameter. Values are reported as means SD of two separate experiments.

<sup>b</sup> Indicates no antimicrobial activity. <sup>c</sup> Amikacin, <sup>d</sup> Ofloxacin



**Figure 3.** (a) Antimicrobial activity of ethanol leaf extract from Jojoba against *S. thermophilus* 1  
(b) MBC values of various Jojoba plant extracts against lactic acid bacteria strains

## DISCUSSION

Clinically, the application of probiotics has been shown to alter the skin's barrier function by an increase in the antimicrobial properties of the skin. Specifically, it was observed that *Streptococcus thermophilus* increased ceramide production both in vitro and in vivo after applying the cream for 7 days (Di Marzio et al., 1999, 2003, 2008). Therefore, the combination of natural antifungal substance and living cells of *S. thermophilus* may be beneficial to the skin or body. In the present study, the extracts of Jojoba leaves showed antifungal activity against two *Candida* species. Also, the same concentration (1500 mg/disc) extracts did not inhibit the growth of the probiotic candidate *S. thermophilus* and *E. faecium* strains except for only acetone extract against four LAB strain.

## CONCLUSION

The study indicated that the leaf extracts from Jojoba can be used as a natural antifungal agent against the tested fungal pathogens. Also, the combination of these natural bio-preservatives (the extracts and the tested lactic acid bacteria strains) may have a potential use in health promoting substance.

## REFERENCES

- Al-Ghamdi A, Elkholy T, Abuhelal S, Al-Abbadi H, Qahwaji D, Khalefah N, Sobhy H, Abu-Hilal M 2019. Against antibacterial and antifungal activity of Jojoba wax liquid (*Simmondsia chinensis*) Pharmacognosy Journal, 11(1): 191-194.
- Alexander BD, Perfect JR 1997. Antifungal resistance trends to-wards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. *Drugs*, 54:657-78.
- Ayanoğlu F 2000. Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) ve Türkiye'de yetiştirilebilme olanakları. Jojobanın ekolojik istekleri ve Türkiye'de yetiştirilebilme olanakları. *Anadolu*, 10 (2): 158 – 168.
- Ayanoğlu F , Ayanoğlu H 1995. Jojoba bitkisinin (*Simmondsia chinensis* link. schneider) Erdemli koşullarında adaptasyonunda ilk sonuçlar. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 650-654.
- Chakrabarti A, Chatterjee SS, Rao KL, Zameer MM, Shivaprakash MR, Singhi S, Singh R, Varma SC 2009. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 41:275-284.
- Dunstone RL , Begg JE 1983. A potential crop for Australia. *The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 49:51-59.
- Franz CMAP, Hucha M, Abriouelb H, Holzapfelc W, Gálvez A 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 125-140.
- De Vuyst, L, Tsakalidou, E 2008. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy Journal*, 18,476–485.
- Di Marzio L, Cinque B, De Simone C, Cifone MG 1999. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocyte in vitro and stratum corneum in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:98–106.
- Di Marzio L, Centi C, Cinque B, Masci S, Giuliani M. Arcieri, et al. 2003. Effect of lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on stratum corneum ceramide levels and signs and symptoms of atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*, 12:615–620.
- Di Marzio L, Cinque B, Cupelli F, De Simone C, Cifone MG, Giuliani M 2008. Increase of skinceramide levels in aged subjects following a short-term topical application of bacterial sphinomyelinase from *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21:137–43.
- Filler SG, Sheppard DC 2006. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathogens*, 2:129.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond- Bourget, N., et al.(2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29,435–463.
- Kauffman CA 2006. Fungal infections. *Proceedings of American Thoracic Society*, 3: 35-40.
- Mariita RM, Ogal CKPO, Oguge NO, Okemo PO 2011. Methanol extract of three medicinal plants from Samburu in northern Kenya show significant antimycobacterial, antibacterial and antifungal properties. *Research Journal of Medicinal Plants*, 5(1): 54-64.
- Pooja Umaiyal M, Gayathri R, Vishnupriya V, Geetha RV 2016. Antimicrobial activity of Jojoba oil against selected microbes: An Invitro Study. *Journal of Pharmatutical Sciences & Research*, 8(6):528-529.

## The inhibition effect of the black cumin derivatives on breast cancer

Faik Gökalgp

Kırıkkale University, Faculty of Education, Science Education, Yahşihan/Kırıkkale, Turkey

Corresponding author e-mail: akgokalp@gmail.com

### Abstract

*Nigella sativa* is a medical plant and the mainly component of black cumin seeds, Thymoquinone, had been detected from its ethanolic extract. The effective components of *Nigella sativa* were the firstly thymoquinone and the other related lipid soluble ingredients (thymol, dithymoquinone, thymohydroquinone) have- been used as the anticancer agents. Furthermore, the extracts of *Nigella Sativa* seed had effective anticancer properties against YAC-1 tumor cells. In this study, the inhibition effect of Thymol, Thymoquinone and Thymohydroquinone on breast cancer were done by using docking.

**Keywords:** *Nigella sativa*, Thymol, Thymoquinone, Thymohydroquinone, docking

### INTRODUCTION

Cancer occurs as a result of excessive and uncontrolled proliferation of a cell or a group of cells in the body differentiating from internal and external influences. Cancer cells proliferate faster than neighboring normal cells. While the division of normal cells stops after a certain time, the division of cancerous cells never stops. They carry metastasis by transporting blood or lymph vessels to other regions from their location (Hanahan and Weinberg 2000). The extracts of *Nigella Sativa* seed had effective anticancer properties against YAC-1 tumor cells (Majdalawieh et al., 2010).

### Breast Cancer

Breast cancer is a very common type of cancer in women in both developed and developing countries. Breast cancer is very rare in men and less than 1% of all breast cancers occur in men. Causes of cancer death worldwide include breast cancer; in all genders, it ranks second after lung cancer (Giordano et al 2004; Jemal et al 2009).

It is noteworthy that the incidence of breast cancer is higher in developed countries than in developing countries, while death from breast cancer is lower in developed countries than in developing countries. This shows that women living in underdeveloped countries have difficulties in accessing breast cancer diagnosis, screening and treatment services. Therefore, increasing the efforts for early detection, screening and treatment of breast cancer, especially in underdeveloped countries, is extremely important (Colditz et al., 2006). Among the cancer types associated with nutritional factors, it is very important to consume more fiber-rich, high-mineral and vitamin-rich plant foods and adequate and balanced nutrition in order to minimize the risk of stomach, colon, breast and prostate cancers (Moorman and Terry 2004).

Today, because of the risk of drugs and chemicals used for the protection of human health, most of the researches in medicine, food and environment reveal the importance of herbal products both in the treatment of diseases and preventive medicine (Dattner, 2003).

### Black seed

Thymoquinone (TQ), which is an antiproliferative, antioxidant substance and attracts attention in terms of inducing apoptosis in cancer cells, is effective in breast and ovarian adenocarcinoma (Shoieb et al., 2003). The treatment of it alone or in combination with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) has been shown to stop cancer cell proliferation (Swamy and Tan, 2000).

TQ and dithymoquinone stop its cytotoxic effect by triggering apoptosis (programmed cell death) when the cell is in the G1 phase. Inhibition of cell growth is achieved by increasing protein expression by gene expression of p53 and inhibition of antiapoptotic Bcl-2 protein (Gali-Muhtasib et al., 2004). TQ has been shown to have antitumor effect by three basic mechanisms. These include apoptosis, inhibition of angiogenesis, and cell cycle arrest (Abukhader, 2013).

The aim of our study; In vitro and in vivo studies in the literature, antiproliferative, antitumor and antioxidant activity of the active substances in black seed is to investigate the inhibitory effect on human breast cancer cells.

Black seed is thought to be beneficial in terms of the content of rich active ingredients, and in particular, TQ is an effective herbal compound against cancer risk. Therefore, if the results of this study support the

established positive effects of TQ, the importance of TQ as supportive treatment among cancer patients among other treatments will be emphasized. The results are expected to determine and select the active substances to be used in future studies, to give direction and shed light to prevent loss of time and substances.

### *Nigella sativa*

Although the main component of *Nigella sativa* is TQ, thymol, dithymoquinone, thymohydroquinone compounds have been the other active substances detected by high pressure liquid chromatography and thin layer chromatography methods (Vatansev,2014).

#### **Antitumoral and Anticarcinogenic Effects**

Many *in vivo* and *in vitro* studies have shown that both essential oil and active components of black seed have antitumor effects. Research on different types of cancers in humans has been shown to have a cytotoxic effect against some of the essential oil of black seed (Vatansev,2014). It has been reported that TQ, the most important bioactive component of black seed, is a potential chemotherapeutic and chemopreventive component and stimulates apoptosis, which is of great importance in the cellular cycle due to its antiproliferative effect (El-Mahdy et al., 2005).

PI3K/Akt pathway is a cell survival pathway that is important for normal cell growth and proliferation. The active compounds in this pathway play important role. Numerous researches in breast cancer have shown that deregulation of this pathway is implicated in tumorigenesis and hence this has become an important target for breast cancer treatment (Castaneda et al.,2010). In the cell, changes in pathways that regulate signal transduction, cell development, proliferation, and apoptosis play a role in breast cancer. Therefore, the PI3K / Akt signaling pathway has an important role in breast cancer studies (Yuan and Cantley, 2008).

### **MATERIALS AND METHODS**

In this study, the inhibitory effect of thymol, thymol, thymol and thymol, which is one of the important active substances obtained from black seed, will be compared by using docking (Bikadi and Hazai, 2009) and it will be tried to find out what kind of interactions may occur. These theoretical studies are very important in terms of guiding the experimental studies and preventing loss of time and substances.

### **RESULTS and DISCUSSION**

The docking results of the important active compounds in *Nigella sativa* on the inhibitory effect of breast cancer PI3K receptors are given in Table 1.

**Table 4.** The docking results of the important active compounds in *Nigella sativa* on the inhibitory effect of breast cancer PI3K receptors

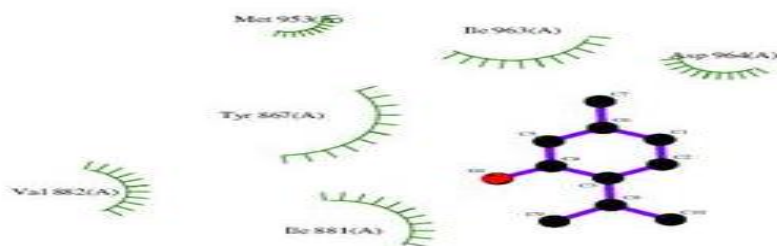
Active compounds/ Breast cancer) (1e8z) PI3K	E free binding energy score(kcal/mol)	Inhibition constant (Ki)	H- binding energy	Electrostatic energy	Internal energy
Thymol	-5.44	103.27 uM	-6.10	-0.07	-6.17
Thymoquinone	-5.66	70.88 uM	-5.93	-0.03	-5.96
Thymohydroquinone	-4.74	336.58 uM	-5.62	-0.05	-5.67

The docking results of the important active compounds in *Nigella sativa* on inhibitory effect on breast cancer Akt receptors are given in Table 2.

**Table 2.** The docking results of the important active compounds in *Nigella sativa* on the inhibitory effect of breast cancer Akt receptors

Active compounds/ Breast cancer) (4gv1) Akt	E free binding energy score(kcal/mol)	Inhibition constant (Ki)	H- binding energy	Electrostatic energy	Internal energy
Thymol	-3.05	5.79 mM	-3.67	+0.02	-3.65
Thymoquinone	-3.27	4.04 mM	-3.69	+0.13	-3.56
Thymohydroquinone	-2.62	11.98 mM	-3.48	-0.04	-3.52

The interaction of Thymol, an important active component of the black seed plant, with the breast cancer receptor PI3K is shown in Figure 1.



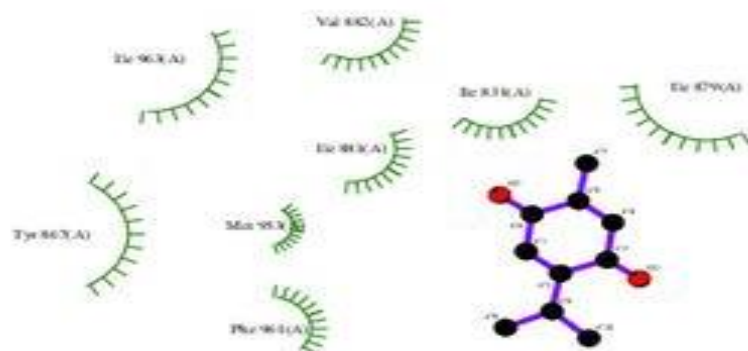
**Figure 3.** The interaction of Thymol and breast cancer receptor PI3K

The interaction of thymol with breast cancer receptor PI3K and the regions it interacts with are summarized in Table 2.

**Table 2** The interactions of thymol with breast cancer P13K receptor and its interactions

cation-pi	hydrophobic	Other
<b>TYR867 (-1.3747)</b>	ILE881 (-0.9067)	ASP964 (-0.3381)
	ILE963 (-0.9058)	
	VAL882 (-0.6116)	
	MET953 (-0.1278)	

The interaction of Thymoquinone, an important active component of the black seed plant, with the breast cancer receptor PI3K is shown in Figure 2.



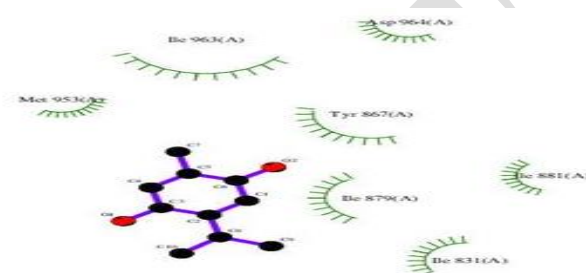
**Figure 2.** The interaction of Thymoquinone and breast cancer receptor PI3K

The interaction of Thymoquinone with breast cancer receptor PI3K and the regions it interacts with are summarized in Table 3.

**Table 4** The interactions of Thymohydroquinone with breast cancer P13K receptor and its interactions

cation-pi	hydrophobic
<b>PHE309 (-0.685)</b>	CYS310 (-0.6076)
	PRO313 (-0.5086)
	LEU295 (-0.3814)
	LEU316 (-0.2925)
	HIS194 (-0.1742)

The interaction of Thymohydroquinone, an important active component of the black seed plant, with the breast cancer receptor PI3K is shown in Figure 3.



**Figure 3.** The interaction of Thymohydroquinone and breast cancer receptor PI3K

The interaction of Thymohydroquinone with breast cancer receptor PI3K and the regions it interacts with are summarized in Table 4.

PI3K/Akt pathway is an important cell survival route, and it controls and regulates the cellular procedure of apoptosis and proliferation. (Vivanco and Sawyers, 2002). The control of this pathway is so important. PI3Ks is the most efficient way to cut down the pathway (Duan et al., 2016).

## CONCLUSION

According to the data, it is seen that there is a high inhibitory effect of Thymokinone, which is the most active ingredient in black seed, in breast cancer receptor P13K. The reason for this can be concluded that there are hydrophobic interactions as can be understood in the complexing zones.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Kırıkkale University BAP, number of projects (BAP-2016 / 016, 2017 / 019, 2018 / 033) and calculations were made in Kırıkkale University High Performance Computing Center and Gaussian 09W64 program.

## REFERENCES

- Abukhader MM., 2013, Thymoquinone in the clinical treatment of cancer: Fact or fiction *Pharmacogn Rev.*, 7(14): 117-120.
- Bikadi, Z., Hazai, E., 2009 Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock *J. Cheminf.* 1, 15.
- Castaneda, C.A., H. Cortes-Funes, H.L. Gomez, E.M., 2010, Ciruelos The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer *Cancer Metastasis Rev.*, 29, pp. 751-759.



- Colditz GA, Sellers TA, Trapido E.,2006, Epidemiology identifying the causes and preventability of cancer? Nat Rev Cancer. 6(1): 75-83.
- Dattner AM.,2003,From medical herbalism to phytotherapy in dermatology: back to the future.Dermatol Ther. 16(2): 106-113.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA.,2005, Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. Int J Cancer.,117(3): 409-417.
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R.,2004, Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol., 25(4): 857-866.
- Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN.,2004, Breast carcinoma in men. Cancer. 101(1): 51-57.
- Hanahan D, Weinberg RA., 2000; The hallmarks of cancer. Cell. 100(1): 57-70.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin. 59(4): 225-249.
- Majdalawieh, A.F., R. Hmaidan and R.I. Carr. 2010,J. Ethno- pharmacol. 131(2): 268–275.
- Moorman PG, Terry PD.,2004, Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. Am J Clin Nutr. 80(1): 5-14.
- Ruizhi D., Feifei T., Jiaoyang S. 2016, Structural basis and energy landscape of apigenin-induced cancer cell apoptosis mechanism in PI3K/Akt pathway, Molecular Simulation, 42:2, 138-148.
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK.,2003, In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol. 22(1): 107-113.
- Swamy SM, Tan BK.,2000, Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of Nigella sativa L. seeds. J Ethnopharmacol., 70(1): 1-7.
- Vatansev,H.,2014, Timokinon'un Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi,Konya.
- Vivanco I, Sawyers CL.,2002, The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2(7):489–501.
- Yuan TL, Cantley LC.,2008, PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene., 27(41): 5497-5510.

## Başkomutanlık Tarihi Milli Parkı Afyonkarahisar-Kocatepe Bölümü' nde doğal olarak yetişen bazı hemikriptofitler ve toprak özellikleri

Ahmet Serteser

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen-Edb.Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: aserteser@aku.edu.tr

### Özet

Çalışma alanı Ege Bölgesi İç-Batı Anadolu'da Afyonkarahisar sınırları içinde bulunup grid sisteme göre B3 karesine girmektedir. Çalışma alanının büyük bölümünü Kuvaterner arazisi kaplamaktadır. Çalışma alanı "Yarı kurak - soğuk Akdeniz" biyoiklimine sahiptir. Alanda "Doğu Akdeniz Tipi" yağış rejimi görülmektedir. Çalışma alanında Kahverengi Orman, Kireçsiz Kahverengi, Koluvyal ve Kahverengi büyük topraklar ile arazi tipi olarak sazlıklar ve bataklıklar bulunmaktadır. Irano-Turanian floristik bölgesi içindeki çalışma alanından yaklaşık 50 vasküler takson teşhis edilmiştir. Çalışma alanı Braun-Blanquet yöntemine göre incelenerek 5 bitki topluluğu tanımlanmıştır. Bunlar: *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., *Anthemis cretica* L., *Cerinthe minor* subsp. *auriculata* (Ten.) Domac, *Cruciata taurica* (Pall. ex Willd.) Ehrend., *Glaucium corniculatum* (L.) Curtis' topluluklarıdır. Bu bitki topluluklarının toprakla ilişkisini bulmak için 0-30 cm ve 30-60 cm derinlikler arasından toprak örnekleri alınmış ve bunların fiziksel-kimyasal analizleri yapılarak yorumlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Flora, Vejetasyon, Hemikriptofitler, Toprak Yapısı, Afyonkarahisar.

### Some hemicryptophytes and soil properties growing naturally in the Afyonkarahisar-Kocatepe Historical National Park region

#### Abstract

The study area is located within the boundaries of Afyonkarahisar in the Inner-Western Anatolia of The Aegean region and enters the B3 square according to the grid system. Quaternary land covers most of the study area. The study area has "Semidry - cold Mediterranean" bioclimate. "Eastern Mediterranean Type" rainfall regime is seen in the area. In the study area, there are brown forests, lime brown, brown and brown large soils and reeds and marshes. Approximately 50 vascular taxa were identified from the study area within the Irano-Turanian floristic region. The study area was examined according to Braun-Blanquet method and 5 plant communities were identified. These include: *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb., *Anthemis cretica* L., *Cerinthe minor* subsp. *auriculata* (Ten.) Domac, *Cruciata taurica* (Pall. ex Willd.) Ehrend., *Glaucium corniculatum* (L.) Curtis. Soil samples were taken from 0-30 cm and 30-60 cm depths to find the relationship of these plant communities with soil and their physical-chemical analyzes were performed.

**Keywords:** Flora, Vegetation, Hemicryptophytes, Soil Structure, Afyonkarahisar.

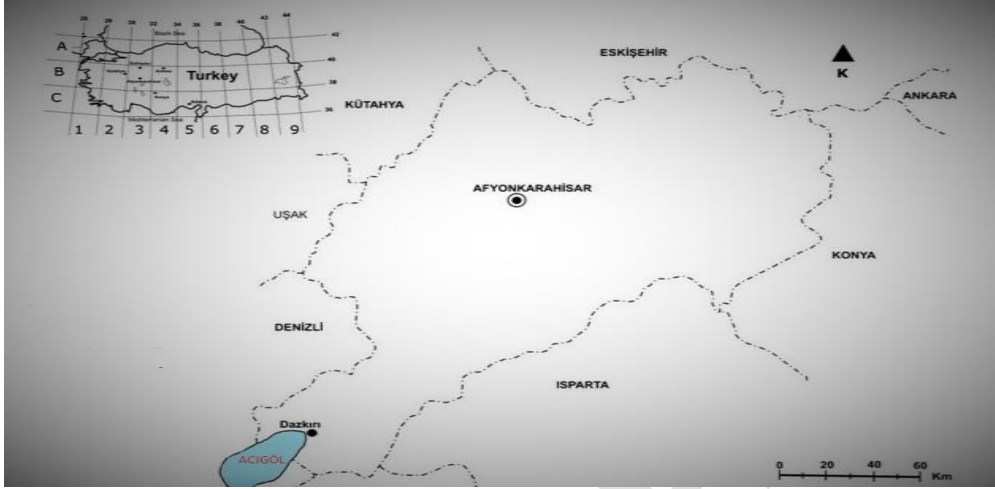
#### GİRİŞ

Çalışma alanımızda farklı yaşam ortamları, değişen abiyotik ve biyotik faktörlerden etkilenmiştir. Doğal bir ekosistemin, özellikle bitkilerin ve toprağın var olan bileşenlerinde her türlü değişiklik nihayetinde bütünüyle değişimlere yol açmaktadır (Hoveizeh, 1997). Bitki topluluklarının gelişimi ve değişimi iklim, toprak, biyotik faktörler ve topoğrafik şartlara göre değişkenlik göstermektedir. Bu ekolojik şartlar ve rekabet bitkilerin büyümesini ve dağılımını etkilemesine rağmen bu dağılımda toprak özellikleri ana rolü oynamaktadır (Abd El-Ghani, 1999). Araştırma alanının Milli Park olarak seçiminde, her ne kadar doğa özelliklerinden çok tarihi önemi göz önüne alınmış ise de, bölge vejetasyonun özellikle sulak alanları ve hemikriptofitleri ile toprak arasındaki ilişkisi de önem taşımaktadır. Araştırma alanı ile ilgili bitki örtüsü iklim açısından (Akman, 2011) ve bitki örtüsü toprak ilişkisi açısından ise Zohary ve Orshan (1949), Chapman (1974), Flowers (1975), Breckle (1986), Jafari ve ark., (2003), Kim ve Yu (2009), Fenu ve ark., (2012, 2013)' nin çalışmalarından yararlanılmıştır. Şimdiye kadar araştırma alanında Vural ve ark., (1985), Akçiçek ve Vural (2003), Serteser ve Kargioğlu (2018) ile Serteser ve ark., (2018) flora ve vejetasyon konusunda çalışmalar yapmıştır. Bitki toplulukları ile toprak özellikleri arasında bünye, tuzluluk, kireç, organik madde ve pH en etkili faktörlerdendir. Bu araştırmanın temel amacı Başkomutanlık Tarihi Milli Parkı Afyonkarahisar - Kocatepe

Bölümü' nde doğal olarak yetişen bazı bitki topluluklarını tanımlamak ve toprak özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırarak bitki türlerinin ayrılmasını etkileyen en önemli faktörleri belirlemektir.

## MATERYAL VE METOT

Başkomutanlık Tarihi Milli Parkı Afyonkarahisar - Kocatepe Bölümü, Ege Bölgesinin İç-Batı Anadolu Bölümü sınırları içinde yer almakta olup Davis (1965)' in grid sistemine göre B3 karesine girmektedir (Şekil 1).



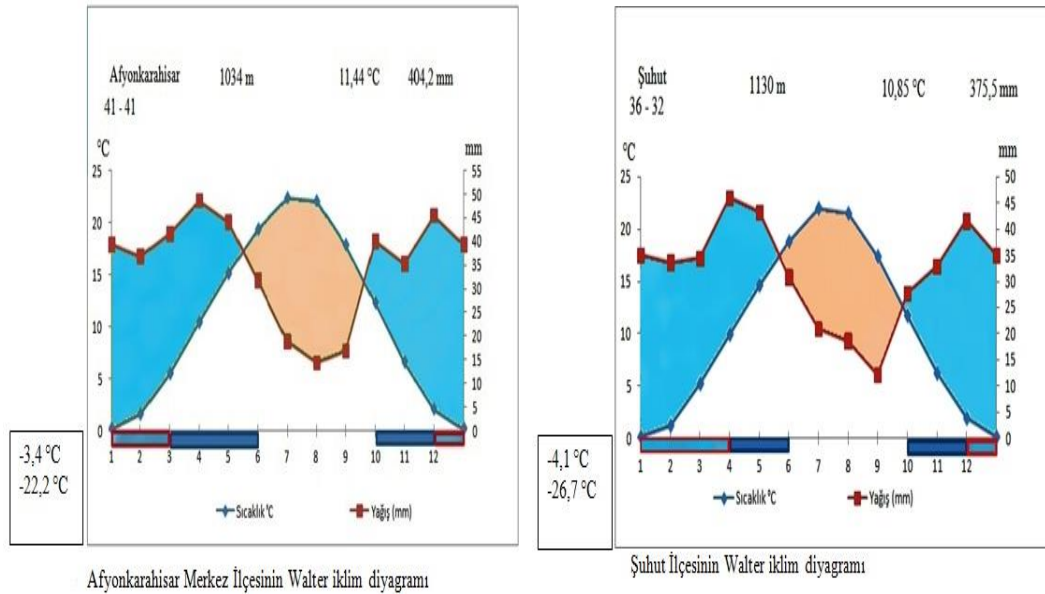
Şekil 1. Çalışma alanı

Araştırma alanı Afyonkarahisar' ın hemen güneyinden başlayıp güney-güneybatıya doğru uzanmaktadır. Bu bölümün en önemli yükseltileri Kocatepe (1874 m), Haticekıran Tepe (1808 m), Kaleciksisivrisi Tepe (1758 m), Tınaz Tepe (1638 m), Çiğil Tepe (1591 m), Payamlı Tepe (1482 m)' dir. Söz konusu tepeler arasında bazı dereler ve sulak alanlar bulunmaktadır.

Bitkilerin teşhisinde Davis (1965-1985), Davis ve ark., (1988) ve Güner ve ark., (2000)' in "Flora of Turkey and the East Aegean Islands", Güner ve ark., (2012)' in "Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)" eserleri esas alınmış ve Afyon Kocatepe Üniversitesi (AKÜ) herbaryumundan da yararlanılmıştır. Vegetasyon, Braun-Blanquet (1932) yöntemi' ne göre sınıflandırılmıştır. İklim verileri DMİ (2015) 'den, jeolojik ve hidrojeolojik bilgiler MTA (1996)' in eserlerinden alınmıştır. Bölgenin iklim değerlerini yansıtmak için en yakın meteoroloji istasyonları için iklim diyagramları çizilmiştir (Gaussen 1954; Uslu 1958; Walter 1995). Emberger (1952)' in iklim sınıflandırması formülüne araştırma alanındaki meteoroloji istasyonlarının iklim verileri uygulanmış ve bu değerler Akman ve Dağet (1971)' e göre yorumlanmıştır. Bitki topluluklarının topraklarla ilişkisini bulmak için 0-30 cm ve 30-60 cm derinlikler arasından temsil yeteneği yüksek olan 10 toprak örneği alınmıştır. Toprakların fiziksel ve kimyasal analizleri Tüzüner (1990)' in belirlediği metotlara göre Ankara Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü' nde yapılmıştır.

## BULGULAR

Bölgenin iklim değerlerini yansıtmak için en yakın meteoroloji istasyonları için iklim diyagramları çizilmiştir (Gaussen, 1954; Uslu, 1958; Walter, 1995) (Şekil 2). Çalışma alanı "Yarı Kurak soğuk Akdeniz" biyoiklimine sahiptir. Yağış rejimi İ.K.S.Y. şeklindedir (Akman, 2011). Alanda "Doğu Akdeniz Tipi" yağış rejimi görülmektedir. Çalışma alanında Kahverengi Orman, Kireçsiz Kahverengi, Koluvyal ve Kahverengi büyük toprak grupları ile arazi tipi olarak sazlıklar ve bataklıklar bulunmaktadır (KHGM, 1994). Irano-Turanian floristik bölgesi içindeki çalışma alanından yaklaşık 50 adet vasküler takson teşhis edilmiştir. Bitki topluluklarının toprakla ilişkisini bulmak için alınan toprakların fiziksel-kimyasal analizlerine ilişkin bulgular Tablo 1' de verilmiştir.



Şekil 2. Afyonkarahisar ve Şuhut için Walter (1995) iklim diyagramı

Tablo 1. Bitki topluluklarının baskın olduğu alanlarda toprak analiz sonuçları

	Su İle Doyg. %	Bünye Sınıfı	EC ds/m	Total tuz %	pH	Organik Madde %	Fosfor (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Kg/da	Potasyum (K <sub>2</sub> O) Kg/da	Kireç (CaCO <sub>3</sub> ) %
*	63	CL	8,53	0,36	7,8	2,01	6,11	20,08	15,01
*	64	CL	9,32	0,37	8,4	2,08	7,88	32,11	16,32
**	66	CL	11,02	0,44	8,4	2,78	13,19	35,12	18,10
**	69	CL	14,41	0,51	8,1	2,99	9,33	33,05	20,02
***	72	C	11,34	0,46	8,5	1,99	8,82	27,33	19,01
***	78	C	13,69	0,49	8,9	2,49	7,14	29,89	11,92
****	67	CL	15,57	0,66	7,5	3,13	8,84	36,11	4,89
****	69	CL	16,96	0,67	7,8	2,88	7,55	26,07	4,33
*****	77	C	14,61	0,53	8,8	2,66	10,1	22,40	14,55
*****	61	CL	9,59	0,39	8,2	2,53	12,4	23,53	24,21

\* *A. chamaepitys* \*\* *A. cretica* \*\*\* *C. minor* subsp. *auriculata* \*\*\*\* *C. taurica* \*\*\*\*\* *G. corniculatum*

Araştırma alanında tanımlanan baskın potansiyele sahip hemikriptofitler, *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreb. (acıgıcı), *Anthemis cretica* L. (dağ papatyası), *Cerintho minor* subsp. *auriculata* (Ten.) Domac (cücegözü), *Cruciata taurica* (Pall. ex Willd.) Ehrend. (kırım güzeli), *Glaucium corniculatum* (L.) Curtis (çömlekçatlatan) türleridir.

*Ajuga chamaepitys* Topluluğu: Vejetasyon örtüsü % 85 - % 90, Bitki boyu 55 – 65 cm, hakim bitkileri, *Anthemis cretica*, *Reseda lutea*, *Jasminium fruticans*, *Papaver argemone* ve *Silene dichotoma*'dır. Tür sayısı 1-5 kadardır. Koluvyal büyük toprak tipi görülür. Toprak killi-tınlı, orta derecede tuzlu (% 0,36-0,37), kireç yüksek oranda (% 15,01-16,32), organik madde miktarı orta (% 2,01-2,08), fosfor orta miktarda (6,11-7,88 Kg/da), potasyum (20,08-32,11 Kg/da) yeter seviyededir, pH (7,8-8,4) ise hafif alkali ve kuvvetli alkali olarak görülür.

*Anthemis cretica* Topluluğu: Vejetasyon örtüsü % 75 - % 85, bitki boyu 70 – 80 cm, hakim bitkileri, *Glaucium grandiflorum*, *Papaver argemone*, *Astragalus angustifolius*, *Hypocoum imberbe*, *Cerintho minor* ve *Matthiola longipetale*'dır. Tür sayısı 1-6 kadardır. Kahverengi Orman büyük toprak tipi görülür. Toprak killi-tınlı, orta tuzlu (% 0,44-0,51), kireç seviyesi (% 18,10-20,02) yüksek oranda, organik madde (% 2,78-2,99) miktarı orta, fosfor fazla (9,33-13,19 Kg/da), potasyum (35,12-33,05 Kg/da) yeter seviyededir, pH ise kuvvetli alkali (8,1-8,4) şeklindedir.

*Cerintho minor* Topluluğu: Vejetasyon örtüsü % 85 - % 95, bitki boyu 80 – 95 cm, hakim bitkileri, *Glaucium corniculatum*, *Aethionema arabicum*, *Reseda lutea*, *Papaver argemone* *Spergularia media* ve *Anthemis cretica*'dır. Tür sayısı 3-6 kadardır. Kahverengi büyük toprak tipi görülür. Toprak killi, orta tuzlu (% 0,46-

0,49), kireç (% 11,92-19,01) ortadan yüksek orana, organik madde miktarı (% 1,99-2,49) azdan ortaya, fosfor orta (7,14-8,82 Kg/da), potasyum (27,33-29,89 Kg/da) yeter miktarda, pH ise (8,5-8,9) kuvvetli alkali olarak görülmektedir.

*Cruciata taurica* Topluluğu: Vejetasyon örtüsü % 80 - % 85, bitki boyu 85 – 90 cm, hakim bitkileri *Cerintho minor*, *Matthiola longipetale*, *Anthemis cretica*, *Ajuga chamaepitys*, *Jasminum fruticans* ve *Glaucium grandiflorum*' dir. Tür sayısı 3-6 kadardır. Toprak tipi kireçsiz kahverengi tiptedir. Toprak killi-tınlı, çok tuzlu (% 0,66-0,67), kireç (% 4,33-4,89) düşük, organik madde (% 2,88-3,13) ve fosfor (7,55-8,84 kg/da) orta miktarda, potasyum (26,07-36,11 Kg/da) yeter seviyededir, pH (7,5-7,8) hafif alkali olarak görülür.

*Glaucium corniculatum* Topluluğu: Vejetasyon örtüsü % 70 - % 85, bitki boyu 85 – 95 cm, hakim bitkileri: *Silene dichotoma*, *Astragalus angustifolius*, *Trogopogon longirostris*, *Anthemis cretica* ve *Cruciata taurica* türleridir. Tür sayısı 1-5 kadardır. Koluyal ve kahverengi büyük toprak tipi görülür. Toprak killi, killi-tınlı, orta tuzlu (% 0,39-0,53), kireç (% 14,55-24,21) seviyesi ortadan yüksek orana, organik madde (% 2,53-2,66) miktarı orta, fosfor (10,1-12,4 Kg/da) fazla, potasyum (22,40-23,53 Kg/da) yeter seviyededir, pH (8,2-8,8) kuvvetli alkali olarak görülür.

## TARTIŞMA

Çalışma sahasında belirlenen bitki topluluklarına ait toplam tuz, elektriksel iletkenlik, pH, organik madde ve kireç gibi fiziksel ve kimyasal testler yapılmıştır. Bu toprak analizleri sonucunda, toprakların killi ve killi-tınlı, toplam tuz ve elektriksel iletkenliğin orta tuzludan yüksek orana, pH derecesinin hafif alkali ile kuvvetli alkali, organik maddenin azdan orta düzeye, yarayıklı fosfor yüzdeleri orta düzeyden fazlaya, yarayıklı potasyum yüzdeleri yeterli ve kireç miktarına göre ise örneklerin düşük kireçli ile yüksek kireçli arasında değiştiği belirlenmiştir. Kim ve Yu (2009), Fenu ve ark., (2012, 2013)' nun çalışmalarında kıyı kumulları ile bitki toplulukları arasında ilişkiler belirtilmiştir. Bu çalışmada topraklar tuzsuz olmasına rağmen çalışmamızdaki topraklar değişkenlik göstermektedir. Bu durum ekolojik faktörlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Toprak bünyesi ile toprak tuzluluğu bitkilerin dağılmasında en önemli rolü oynamaktadır (Flowers, 1975). Zohary ve Orshan (1949)' in çalışmalarında bitkilerin dağılmasında en önemli faktörlerden biri olarak toprağın bünyesi ve bitki besin elementleri belirtilmektedir. Bu çalışmada da özellikle toprak nemi ve tuzluluk ilişkisinin vejetasyon tiplerinin dağılmasında önemli rol oynadığı görülmektedir. Özellikle çalışma alanımızdaki bitki topluluklarının toprak özellikleri aynı ekolojideki diğer örneklerle kıyaslandığında vejetasyon ile toprak ilişkisi arasındaki bağlantılar benzer sonuçlar doğurmaktadır (Chapman, 1974; Flowers, 1975; Breckle, 1986; Jafari ve ark., 2003).

Araştırma alanımız ile yakın yerlerdeki benzer ekosistemlerdeki Serteser ve Kargioğlu (2018), Serteser ve ark. (2018)' nin çalışmaları ile karşılaştırıldığında, vejetasyondaki benzerlik oranları gözlenmiştir. Özellikle Serteser ve Kargioğlu (2018), Serteser ve ark. (2018)' nin çalışmalarındaki tüm türler çalışma alanımızda tekrar tespit edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, “AKÜ BAPK : 18.KARIYER.86” nolu araştırma projesi desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abd El-Ghani MM 1999. Soil variables affecting the vegetation of inland western desert of Egypt. *Ecologia Mediterranea*, 25(2):173-184.
- Akçiçek E, Vural M 2003. Flora of Kumalar Mountain (Afyon). *Turk J Bot.*, 27:383-420.
- Akman Y 2011. İklim ve biyoiklim. Ankara: Palme Yayınevi, 345 s.
- Akman Y, Daget P 1971. Quelques aspects synoptiques des climats de la Turquie. *Bulletin de la Société Languedocienne de Géographie*, 5(3):269-300.
- Braun-Blanquet J 1932. *Plant sociology; The study of plant communities*. London: McGraw-Hill, 438 pp.
- Breckle SW 1986. *Studies of halophytes from Iran and Afghanistan*. *Proceeding of the Royal Society of Edinburgh*, 89:203-215.
- Chapman VJ 1974. *Salt marshes and salt deserts of the World*. Germany: Verlag Von J. Cramer, 392 pp.
- Davis PH. (Ed.) 1965-1985. *Flora of Turkey and east aegean islands*. I-IX v. Edinburg Univ.Press, 3567 pp.
- Davis PH, Mill RR, Tan K 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Island*, Volume 10, 1st Edition. Edinburgh: Edinburgh University Press, 590 pp.
- DMİ 2015. Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü. DMİ Meteoroloji bülteni, Erişim Adresi <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=AFYONKARAHISAR> [Erişim 05.09.15]

- Emberger L 1952. Sur le quotient pluviothermique. *Compte Rendus de l'Academie des Sciences*, 234:2508-2511.
- Fenu G, Cogoni D, Ferrara C, Pinna MS, Bacchetta G 2012. Relationships between coastal sand dune properties and plant community distribution: the case of Is Arenas (Sardinia). *Plant Biosyst.*, 146(3):586–602.
- Fenu G, Carboni M, Costa A, Bacchetta G. 2013. Environmental factors influencing coastal vegetation pattern: new insights from the Mediterranean basin. *Folia Geobot*, 48(4):493-508.
- Flowers TJ 1975. Halophytes. In Barker DA, Hall JL, editors. *Ion transport in cells and tissues*. Amsterdam, Holland: American Elsevier, 309-334 pp.
- Gausson H 1954. Theories et classification des climate et microclimates. Yayınlandığı yer: VIII Congrès International de Botanique; Paris, France.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC 2000. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Volume 11. Edinburgh: Edinburgh University Press, 94 pp.
- Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç T 2012. *Türkiye bitkileri listesi*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Yayını, 1290 pp.
- Hoveizeh H 1997. Study of the vegetation cover and ecological characteristics in saline habitats of Hoore-Shadegan. *Animal Sciences Journal*, 34:27-31.
- Jafari M, Zare Chahouki MA, Tavili A, Azamivand H 2003. Soil-vegetation relationship in Hoz-e-Soltan region Qom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2(6):329-334.
- KHGM 1994. Afyon ili arazi varlığı. Ankara: Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Rapor No: 03.
- Kim D, Yu KB 2009. A conceptual model of coastal dune ecology synthesizing spatial gradients of vegetation, soil, and geomorphology. *Plant Ecol*, 202(1):135-148.
- MTA 1996. Türkiye jeoloji envanteri, Erişim Adresi [http://www.mta.gov.tr/v3.0/sayfalar/bilgi-merkezi/maden\\_potansiyel\\_2010/Afyon\\_Madenler.pdf](http://www.mta.gov.tr/v3.0/sayfalar/bilgi-merkezi/maden_potansiyel_2010/Afyon_Madenler.pdf) [Erişim 05.09.15]
- Serteser A, Kargioğlu M 2018. Başkomutanlık Tarihi Milli Parkı Afyonkarahisar Kocatepe Bölümü' nde Doğal Olarak Yetişen Bazı Geofitlerin Ekolojik Özellikleri. Yayınlandığı yer: I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi (ICONPB); Konya, Türkiye.
- Serteser A, Kargioğlu M, Kıvrak E 2018. Başkomutanlık tarihi milli parkı Afyonkarahisar-Kocatepe bölümü'nde doğal olarak yetişen bazı geofitler. Yayınlandığı yer: I<sup>st</sup> International Congress on Science and Education (UBEK- ICSE); Afyonkarahisar, Türkiye.
- Tüzüner A 1990. Toprak ve su analiz laboratuvarı el kitabı. Ankara: Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı KHG Müdürlüğü Yayını, 374 s.
- Uslu S 1958. Kurak zamanların tesbitinde esas olarak kullanılan klima-diagram. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 8(2):95-104.
- Vural M, Ekim T, İlarıslan R, Malyer H 1985. Afyon Başkomutan tarihi milli parkı vejetasyonu. *Doğa Bilimleri Dergisi*, 9(2):363-387.
- Walter H 1995. Die Klima-Diagramme als Mittel zur Beurteilung der Klimaverhältnisse für ökologische, vegetationskundliche und landwirtschaftliche Zwecke. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 68:331-334.
- Zohary M, Orshan G 1949. Structure and ecology of the vegetation in the Dead Sea region of Palestine. *Palestine Journal of Botany*, 4:177-206.

## Preparation of magnetically separable Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> composite and its photocatalytic efficiency

Keziban Atacan<sup>1\*</sup>, Mahmut Özacar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sakarya University, Biomedical, Magnetic and Semiconductor Materials Application and Research Center (BIMAS-RC), 54187 Sakarya, Turkey.

<sup>2</sup> Sakarya University, Science & Arts Faculty, Department of Chemistry, 54187 Sakarya, Turkey.

\*Corresponding author: kezibanatacan@sakarya.edu.tr

### Abstract

New Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> photocatalysts were prepared and first investigated as the photocatalysts for Rhodamine B degradation under visible light. The photocatalysts were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and UV-vis diffuse reflectance/absorbance spectroscopy (DRS). The composite Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> showed enhanced photocatalytic activity compared with ZnO, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> under the same conditions. In addition, the degradation efficiency for Rhodamine B is about 98.5% for the Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> composite in the 90 min. The results showed more excellent photocatalytic activity in Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> compared to others.

**Keywords:** Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, visible light, magnetic nanoparticle, photocatalyst.

### INTRODUCTION

The development of the industry has caused the energy crisis and increase in the international environmental problems (Li et al., 2017). Visible light driven photocatalysts, which could be excited by the solar and solve these environmental problems, are widely used in wastewater treatment (Wang et al., 2015) Water pollution has a great influence on natural ecological balance and also considered a threat to human health (Wan et al., 2016). Many different strategies have been developed for the solution of these problems such as coagulation, flocculation, membrane filtration, adsorption and specially the photocatalysis (Güy and Özacar, 2018).

Silver based compounds such as Ag<sub>2</sub>S (Subash et al., 2013), Ag<sub>2</sub>O (Kalpana et al., 2015), AgI (An et al., 2013), Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Wu et al., 2014), Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Güy et al., 2018) and Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (Güy and Özacar, 2019) have been reported to indicate advanced photocatalytic influential under visible light. The generation of Ag on the silver salts which facilitates influential charge separation is one of the reasons for the high photocatalytic efficiency of silver salts or silver based composites under visible light (Dong et al., 2013, Güy and Özacar, 2019).

Silver orthophosphate (Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), which has a narrow band gap, has an excellent photocatalytic efficiency in the decomposition of organic contaminants (Güy et al., 2018). It is reported that Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> photocatalyst has highly efficient photocatalytic performance under visible-light due to the surface plasmon resonance (SPR) of Ag<sup>0</sup> nanoparticles (Dong et al., 2013). Furthermore, magnetic nanoparticles have been commonly used in the photocatalysis because of their advantage of magnetic recyclability and reusability (Güy and Özacar, 2018). Besides, magnetic materials can be preferred for easy separation by applying external magnetic field (Güy et al., 2018).

In this study, Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> doped on ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles were successfully prepared and crystal and morphological structure, optical property systematically characterized. The photocatalytic performance of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was evaluated by degradation of Rhodamine B (Rh-B). The photocatalytic activity of the composite and reusability are found to be very high.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials and characterizations

ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O (NaAc), NaOH, NaBH<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH and Rhodamine-B were provided from Merck (Germany). C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (EG) and AgNO<sub>3</sub> were obtained from Tekkim (Turkey). All chemicals were of analytic grade and used as received without further purification.

The resulting photocatalysts were confirmed by powder X-ray diffraction (XRD, Empyrean, PANalytical, The Netherlands X-ray diffractometer with Cu K $\alpha$  ( $\lambda$ ) 0.154 nm radiation) in the 2 $\theta$  angles ranging from 10 to 90. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra of nanophotocatalysts were characterized by using a Perkin Elmer FTIR Spectrometer (Spectrum Two) in the range 400–4000 cm<sup>-1</sup> at room temperature. The UV-vis absorption spectra of the Rh-B solution and photocatalysts were obtained by using a UV-vis spectrophotometer (UV-vis, Shimadzu UV-2600). The diffuse reflectance of the photocatalysts was measured by using a UV-vis spectrophotometer fitted with a diffuse reflectance attachment. The band gap energies of the

nanophotocatalysts were determined by the Kubelka–Munk function,  $F(R)$  and by extrapolating the  $[F(R)/hv]^{1/2}$  versus photon energy ( $h\nu$ ).

### Preparation of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

For the preparation of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite, first ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs were synthesized through a solvothermal method with minor modifications (Gu et al., 2016). 1 mmol ZnCl<sub>2</sub>, 2 mmol FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O and 4 mmol of NaAc were dissolved into 30 mL of EG under vigorous stirring for 1 h at room temperature. Then, the solution was transferred into Teflon-coated autoclave (40 mL) and held at 180 °C for 18 h in furnace. The autoclave was cool. Finally, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs were collected by a magnet and then they were washed with deionized water (DW) several times, washed with ethanol and dried at 70 °C for 24 h. Subsequently, the modified of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> particles onto the ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs were performed by the precipitation method. 25 mg of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs were dispersed in 100 mL of DW, then 5 mL of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.15 M) solution was added, and the resulting mixture was sonicated for 2 h. Afterwards, 15 mL of AgNO<sub>3</sub> solution (0.15 M) was added drop-by-drop into this mixture. The obtained nanocomposites were redispersed in 100 mL of DW and then transferred into a Teflon autoclave for hydrothermal heating at 160 °C for another 2 h (Yi et al., 2010). Finally, for the preparation of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 100 mg of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was dispersed in 40 mL of DW. The weight ratio of Ag in this representative reaction was 5% (Güy and Özacar, 2016). Then 0.0175 M 20 mL sodium borohydride solution as a reducing agent was added dropwise to the mixture and stirred for 1 h at room temperature to reduce adsorbed metals ions to metallic nanoparticles onto Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> surface. The precipitate was collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min and washed distilled water and absolute ethanol several times, and then dried in an oven at 60 C for 24 h.

### Photocatalytic activity test

The influences of photocatalytic activity of obtained products were investigated by degradation of Rh-B in water under visible light of a 144 W Xenon lamp. For degradation process, 50 mg of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> photocatalyst was dispersed in 16 mg/L of Rh-B aqueous solution. Before visible light irradiation, the suspension was stirred in the dark for 30 min to achieve adsorption/desorption equilibrium of Rh-B on the photocatalyst surface. 5 mL of the aliquots were sampled at specified time intervals, centrifuged and investigated by recording variations in the absorption band in the UV–vis spectra of Rh-B (Güy et al., 2018). The percentage of degradation was determined by using the Eq. (1) (Güy and Özacar, 2016):

$$\text{Decolorization efficiency (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

(1)

## RESULTS AND DISCUSSION

XRD patterns of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite are shown in Fig. 1 (a). For ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, the diffraction peaks at  $2\theta = 30.13^\circ, 35.48^\circ, 43.14^\circ, 53.55^\circ, 57.02^\circ$  and  $62.67^\circ$  were indexed to the (220), (311), (400), (422), (511) and (440) reflections of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> with cubic spinel structure (Atacan et al., 2018). The diffraction peaks at  $20.85^\circ, 29.65^\circ, 33.24^\circ, 36.52^\circ, 42.47^\circ, 47.78^\circ, 52.66^\circ, 54.99^\circ, 57.23^\circ, 61.58^\circ$  and  $65.75^\circ$  were indexed to the (110), (200), (210), (211), (220), (310), (222), (320), (321), (400) and (330) planes of the cubic Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> phase (Güy et al., 2018). The XRD pattern of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> shows the characteristic peaks both Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Because of the modification of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> on ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles, the XRD peaks of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> are more dominant. The XRD pattern of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> exhibits the characteristic peaks corresponding to Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. However, no diffraction peaks of Ag phase are observed, which confirms that the Ag particles are very small and dispersed on Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Atacan et al., 2018). The invisibly diffraction peaks for Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> at  $38.05^\circ, 44.27^\circ$  and  $64.43^\circ$  reflect the crystallographic planes of (111), (200) and (220) for the face-centered cubic of the silver crystal in Figure 1 (a) (Güy and Özacar, 2019).

FTIR spectra of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> samples in the range of 4000–400 cm<sup>-1</sup> are shown in Fig. 1 (b). For ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, the two peaks at 544 cm<sup>-1</sup> and 440 cm<sup>-1</sup> are related to the Fe–O and Zn–O vibration, respectively (Güy and Özacar, 2018). For Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, the two peaks at 938 cm<sup>-1</sup> and 544 cm<sup>-1</sup> are related to the O=P–O flexural vibration, and the asymmetric vibration of P–O (Güy et al., 2018). The FTIR spectra of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, the two peaks at 938 cm<sup>-1</sup> and 544 cm<sup>-1</sup> are assigned to the O=P–O and the P–O or Fe–O. However, the peak at 544 cm<sup>-1</sup> in Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was P–O vibration and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> shadow.

The morphology of all samples were investigated by scanning electron microscope, as shown in Fig. 2. ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs are agglomerated NPs and their images show clustered structures and cauliflower-like shapes in Fig. 2 (a). As can be observed Fig. 2 (b), the particles Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> possess a relatively small size and an irregularly spherical morphology. Also, some aggregation phenomenon could be observed (Güy et al., 2018). As can be seen in Fig. 2 (c), Ag loading in Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> did not change the agglomerated morphology.



This result suggests that most of the Ag atom was incorporated only to a very small extent in the  $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ .

As shown in Fig. 3 (a), in the absence of any catalyst, it is no observed photocatalytic efficiency under visible light. However, the degradation efficiencies for Rh-B are about 92.57, 93.89 and 98.5% for the  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Ag}/\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  composites in the 75 min, respectively. The kinetic model of Rh-B degradation was examined in presence of all photocatalysts (Fig. 3 (b)). Langmuir-Hinshelwood (L-H) model is the most widely used to explain the kinetics of photocatalysis.

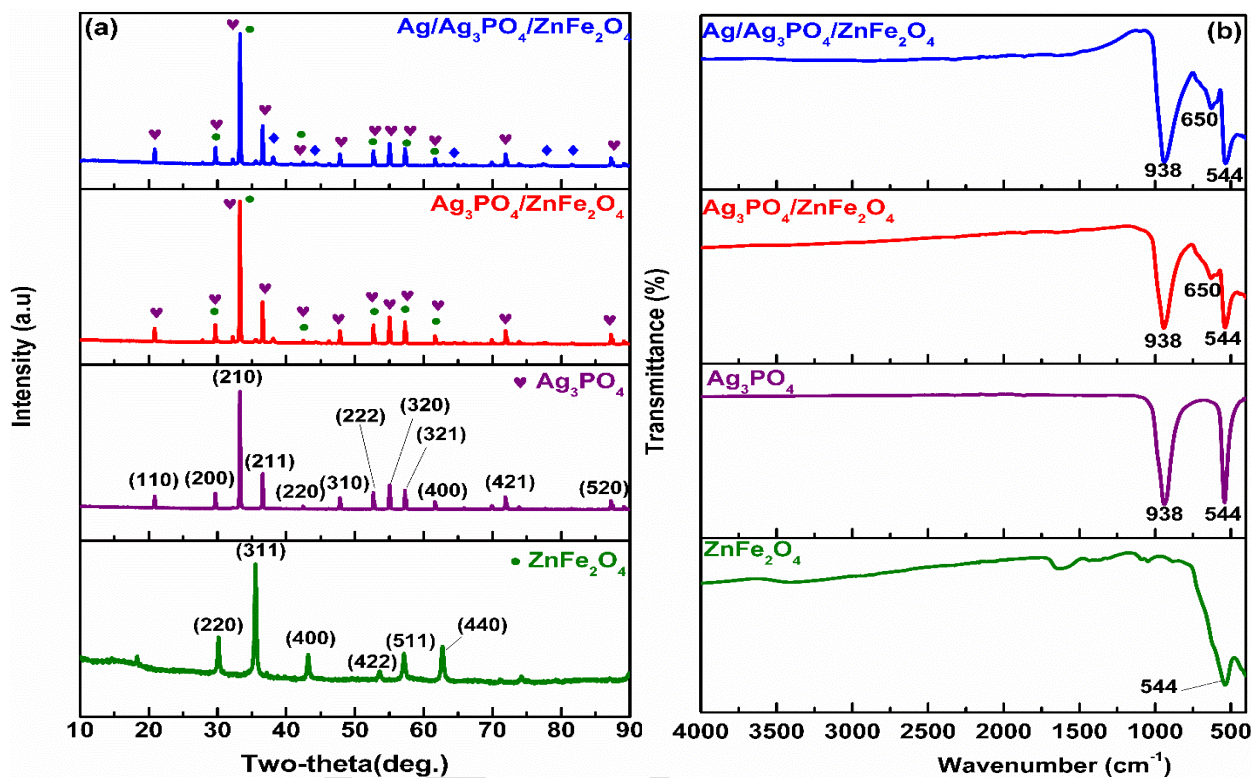


Figure 1. XRD patterns (a) and FTIR spectra (b) of samples

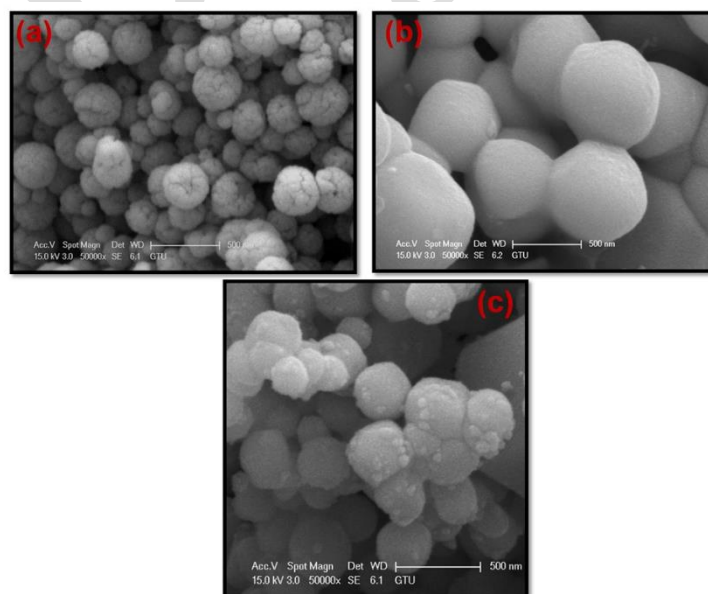
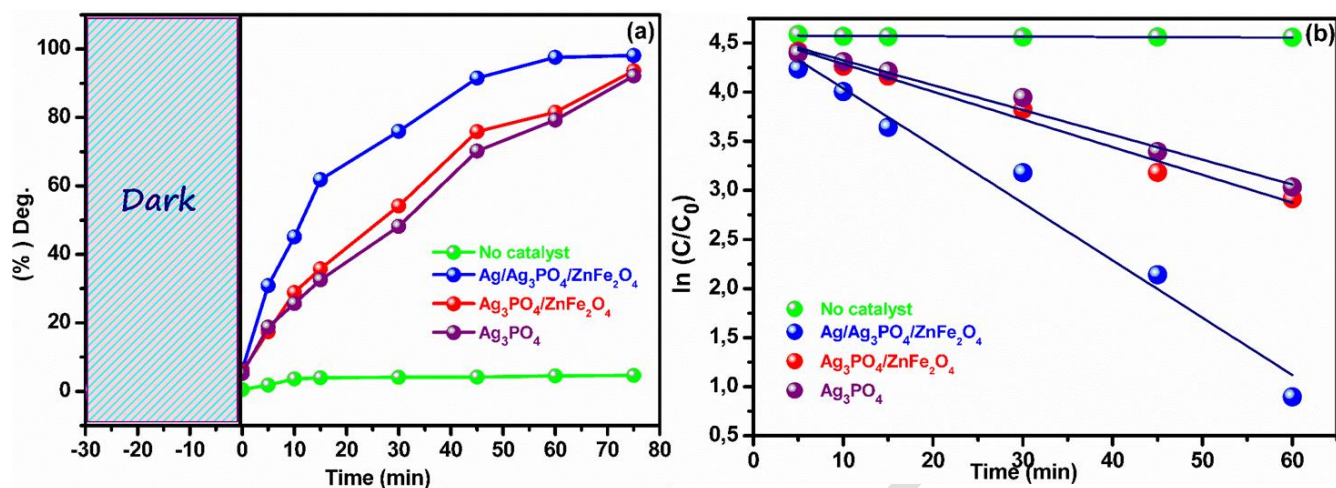


Figure 2. SEM images of (a)  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ , (b)  $\text{Ag}_3\text{PO}_4$  and (c)  $\text{Ag}/\text{Ag}_3\text{PO}_4/\text{ZnFe}_2\text{O}_4$



**Figure 3.** (a) Photodegradation efficiency of Rh-B over different scavengers using all photocatalysts and (b) pseudo-first-order reaction rates in visible light.

## CONCLUSION

In this study, we aimed to produce to improve a photocatalyst that exhibits excellent photocatalytic performance under visible light and is magnetically recovered. The intrinsic properties of MNPs can provide fast, available and easier separation of nanoparticles via an external magnetic field by avoiding boring and time consuming centrifugation in practical applications. The Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> exhibited more enhanced photocatalytic efficiency than that of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> under visible light. This study shows that the Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> can be excellent catalyst for the photocatalytic decomposition of dyes and other organic pollutants in the presence of visible light.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation has been supported by the Scientific Research Projects Commission of Sakarya University (Project number: 2018-3-12-53). The authors thank Dr. Nuray Güy for helping. M.Ö. thanks Turkish Academy of Sciences (TUBA) for partial support.

## REFERENCES

- An C, Jiang W, Wang J, Wang S, Ma Z, Li Y 2013. Synthesis of three-dimensional AgI@TiO<sub>2</sub> nanoparticles with improved photocatalytic performance. *Dalton Trans.* 42: 8796–8801.
- Atacan K, Güy N, Çakar S 2018. Preparation and antibacterial activity of solvothermal synthesized ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Ag-TiO<sub>2</sub> nanocomposite. *Sakarya University Journal of Science*, 22 (6): 1720–1726.
- Dong R, Tian B, Zhang J, Wang T, Tao Q, Bao S, Yang F, Zeng C 2013. AgBr@Ag/TiO<sub>2</sub> core-shell composite with excellent visible light photocatalytic activity and hydrothermal stability. *Catalysis Communications* 38: 16–20.
- Gu W, Xie Q, Qi C, Zhao L, Wu D 2016. Phosphate removal using zinc ferrite synthesized through a facile solvothermal technique. *Powder Technology*, 301: 723–729.
- Güy N, Özacar M 2016. The influence of noble metals on photocatalytic activity of ZnO for Congo red degradation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 20100–20112.
- Güy N, Özacar M 2018. Visible light-induced degradation of indigo carmine over ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Tannin/ZnO: Role of tannin as a modifier and its degradation mechanism. *International Journal of Hydrogen Energy* 43: 8779–8793.
- Güy N, Atacan K, Karaca E, Özacar M 2018. Role of Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on the photocatalytic performance of magnetic Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ZnO/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite under visible light irradiation. *Solar Energy* 166: 308–316.
- Güy N, Özacar M 2019. Ag/Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> nanoparticles modified on ZnO nanorods as an efficient plasmonic photocatalyst under visible light. *Journal of Photochemistry & Photobiology A: Chemistry* 370: 1–11.
- Kalpana K, Selvaraj V 2015. A novel approach for the synthesis of highly active ZnO/TiO<sub>2</sub>/Ag<sub>2</sub>O nanocomposite and its photocatalytic applications. *Ceram. Int.* 41: 9671–9679.
- Li Q, Wang F, Hua Y, Luo Y, Liu X, Duan G, Yang X 2017. Deposition-precipitation preparation of Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/WO<sub>3</sub> nanocomposites for visible-light degradation of Rhodamine B under strongly acidic/alkaline conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 506: 207–216.

- Subash B, Krishnakumar B, Swaminathan M, Shanthi M 2013. Ag<sub>2</sub>S–ZnO – An efficient photocatalyst for the mineralization of Acid Black 1 with UV light. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 105: 314–319.
- Wang H, Ye Z, Liu C, Li J, Zhou M, Guan Q, Lv P, Huo P, Yan Y 2015. Visible light driven Ag/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/AC photocatalyst with highly enhanced photodegradation of tetracycline antibiotics. *Applied Surface Science* 353: 391–399.
- Wan J, Zhang C, Zeng G, Huang D, Hu L, Huang C, Wu H, Wang L 2016. Synthesis and evaluation of a new class of stabilized nanochlorapatite for Pb immobilization in sediment. *J Hazard Mater* 320: 278-288.
- Wu C 2014. Synthesis of Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ZnO nanocomposite with visible light-driven photocatalytic activity. *Mater. Lett.* 136: 262–264.
- Yi Z, Ye J, Kikugawa N, Kako T, Ouyang S, Williams H.S, Yang H, Cao J, Luo W, Li Z, Liu Y, Withers RL 2010. An orthophosphate semiconductor with photooxidation properties under visible-light irradiation. *Nature Materials*, 9: 559–564.

## Development of Au Doped CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> Heterojunction for Promoted Photoelectrochemical Water Splitting under Visible Light

Nuray Güy<sup>1\*</sup>, Mahmut Özacar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Sakarya University, Science&Arts Faculty, Department of Chemistry, 54187 Sakarya, Turkey.

<sup>2</sup>Sakarya University, Biomedical, Magnetic, Semiconductor Materials Application and Research Center (BIMAS-RC), 54187 Sakarya, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: nurayg@sakarya.edu.tr

### Abstract

TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> were prepared and the PEC water splitting performance of it under visible light was examined. The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and UV-vis diffuse reflectance/absorbance spectroscopy (DRS). Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> exhibited more excellent PEC water splitting performance than that of TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>. The results indicated that the water splitting performance increases by the doping Au and heterojunction.

**Keywords:** Water splitting, Au doping, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

### INTRODUCTION

The continuity of the energy requirement has led to strong research into developing clean, environmentally friendly and renewable energy sources (Yang et al., 2009, Hafeez et al., 2018). Hydrogen (H<sub>2</sub>) is seen as the next generation energy carrier and it is a versatile clean fuel that has zero emissions in terms of greenhouse gases and is used to power fuel cells and combustion engines (Gadelhak et al., 2019, Khore et al., 2018). One of the various renewable energy production methods, conversion of solar energy into the fuels in the form of hydrogen and oxygen thanks to the photoelectrochemical (PEC) splitting of water is a good energy generation way (Park et al., 2019).

Semiconductors have an important role in the hydrogen production through the water splitting. So, semiconductor photocatalysts such as ZnO, TiO<sub>2</sub>, WO<sub>3</sub>, BiVO<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and β-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> have been widely investigated for PEC water splitting (Park et al., 2019). In these semiconductors, ZnO and TiO<sub>2</sub> are most used photoanodes for PEC water splitting owing to their many benefits such as facile synthesis, less toxic, low cost, and abundance in nature. But, the activity of TiO<sub>2</sub> is very low due to its wide band gap of ~3.18 eV and rapid recombination of charge carriers; this limits its PEC hydrogen production efficiency (Hafeez et al., 2018). The heterostructures formed by TiO<sub>2</sub> with other photocatalysts such as CNT-GR-TiO<sub>2</sub>, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub>, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub>O-TiO<sub>2</sub>/rGO have been reported to improve photocatalytic activity by preventing the recombination rate of electron-hole pairs (Hafeez et al., 2018).

Spinel ferrites are the efficient co-catalysts owing to their narrow band gap, low cost and good photochemical stability. The advantage of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> as a magnetic oxide semiconductor is the direct band gap located near the visible spectrum (Atacan et al., 2018, Yang et al., 2009). However, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> alone has low efficiency due to the rapid recombination of charge carriers for PEC water splitting. Thus, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> is utilized as heterostructured photocatalysts formed by coupling with semiconductors such as TiO<sub>2</sub>, SnO<sub>2</sub>, Bi<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> or WO<sub>3</sub> in degradation of organic compounds and H<sub>2</sub> production (Atacan et al., 2018).

In the literature, semiconductor metal (noble) composites are the most studied materials for photocatalytic applications due to their excellent chemical and physical features. Au doping on CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> greatly increases PEC activity, because Au nanoparticles act as electron traps capturing photoelectrons, develop the interfacial charge-transfer and delay the recombination of photoinduced electron-hole pairs (Sonawane, 2018). In this paper, we reported the preparation of Au doped CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocomposites for the PEC hydrogen production. Firstly, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocomposites were synthesized via ultrasonic assisted wet impregnation method. The effects of structural and morphological properties of Au doped CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocomposites were examined. Secondly, the synthesized Au doped CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocomposites were electrophoretically deposited onto indium tin oxide (ITO) coated glass substrate for hydrogen production. Consequently, the hydrogen production was carried out under visible light through PEC water splitting. It was noticed that the photocatalytic hydrogen production efficiency of the nanocomposite increased compared to that of bare TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub>.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , >99%), copper(II) chloride dihydrate ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , >99%), sodium acetate trihydrate ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , NaAc), Au solution ( $\text{HAuCl}_4$ ), sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ), sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), magnesium nitrate hexahydrate ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , >99%), acetone, hydrogen peroxide solution (35%), ethanol (>99.2%), and ammonia solution (25%) were purchased from Merck (Germany). Titanium (IV) isopropoxide ( $\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$ ), sodium hydroxide (NaOH), ITO coated glass slides, isopropyl alcohol (>99.5%) and acetic acid (>99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Ethylene glycol (EG) (99%,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ ) was obtained from Tekkim (Turkey) and Polyvinylpyrrolidone (PVP) was purchased from Alfa Aesar (Germany). All chemicals were of analytic grade.

The crystal structure and phase purity was examined by X-ray diffraction (XRD, PANalytical, Empyrean, Netherlands) with  $\text{Cu K}\alpha$  ( $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ). The morphologies of the products were analyzed using a Philips XL30 SFEG scanning electron microscopy (SEM). The diffuse reflectance spectra (DRS) of the products were measured by using a Shimadzu UV-2600 UV-Vis spectrophotometer and the band gap energies of them detected by the Kubelka-Munk function (Güy and Özacar, 2016). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was carried out with Perkin Elmer Spectrum Two FTIR spectrophotometer. EIS and CV measurements were analyzed via a CHI 660C electrochemical workstation. In this part of the study, the prepared ITO surfaces, platinum wire, and Ag/AgCl were used as working electrodes, counter electrode, and reference electrode, respectively (Atacan et al., 2018). The PEC measurements of the products were determined by utilizing a computer-controlled CHI 660C electrochemical work station with a typical three electrode system.

### Synthesis of $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , $\text{TiO}_2$ , $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$ and $\text{Au-CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$

$\text{CuFe}_2\text{O}_4$  MNPs were synthesized by the solvothermal method using Atacan et al. procedure via ethylene glycol (EG) (Atacan et al., 2018).

$\text{TiO}_2$  nanoparticles were prepared using Çakar et al. synthesis procedure (Ünlü et al., 2018). The synthesis was carried out using microwave method. The resulting nanoparticles were dried overnight at  $80^\circ\text{C}$  and were calcinated at  $450^\circ\text{C}$  for 3 h to obtain anatase phase.

The  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  nanocomposite was synthesized via ultrasonic assisted wet impregnation method (Hafeez et al., 2018). 100 mg  $\text{TiO}_2$  was dispersed into 30 mL of water by ultrasonicator for 30 min. 20 mg  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  was added to the mixture and again ultrasonicated for 10 min, then it stirred for 2 h. The resulting solution was heated until all the water evaporated. The products were dried at  $80^\circ\text{C}$  for 12 h and calcinated at  $400^\circ\text{C}$  for 2 h. (Hafeez et al., 2018)

The borohydride reduction method was used for Au doping on  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  nanocomposite. Required amount of the Au solution for doping was added to 100 mg of  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  and dispersed in 50 mL of distilled water. The weight ratio of Au to  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  in this representative reaction was 5%. Then 0.0175 M 20 mL  $\text{NaBH}_4$  solution as a reducing agent was added drop by drop to the suspension and stirred for 1 h at room temperature to reduce adsorbed Au ions to metallic nanoparticles onto nanocomposite surface. The obtained nanoparticles washed distilled water and absolute ethanol several times, and then dried in an oven at  $60^\circ\text{C}$  for 24 h (Güy and Özacar, 2016).

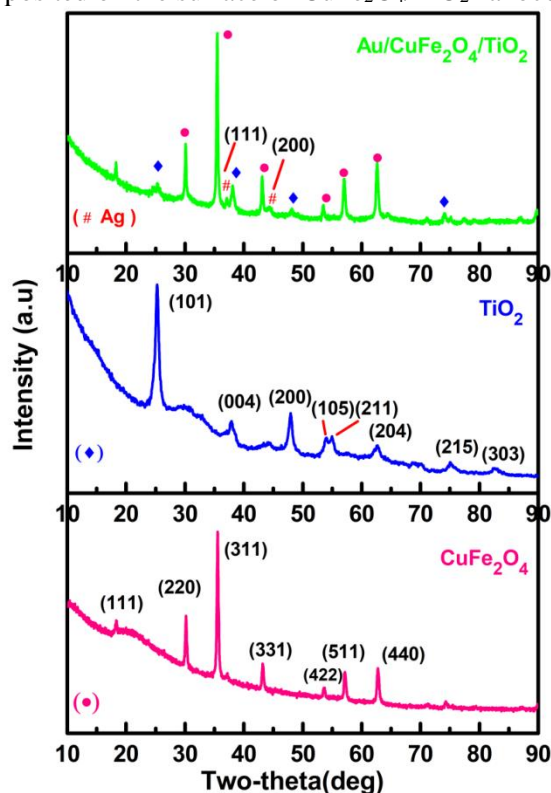
### Photoelectrochemical water splitting experiments

The PEC characterizations were performed by a potentiostat/galvanostat to examine the hydrogen production using a three-electrode electrochemical cell system.  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  and  $\text{Au-CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  onto ITO substrates as working electrodes, Ag/AgCl (saturated 0.3 M KCl) as reference and Pt wire as counter electrode were used, respectively (Atacan et al., 2018). The electrolyte was 0.5 M of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  aqueous solution, which was deoxygenated by bubbling with  $\text{N}_2$  for 1 h before the experiments. Linear sweep voltammetry (LSV) was measured in a voltage window from  $-2 \text{ V}$  to  $+2 \text{ V}$  versus Ag/AgCl at a scan rate of  $10 \text{ mV/s}$ . A 500 W Xenon (Xe) lamp of  $100 \text{ mW cm}^2$  light intensity was used as the visible light source and lamp was placed 15 cm away from the reactor (Atacan et al., 2018). A transparent burette was placed around the counter electrode (Pt wire) and the burette was filled with the electrolyte solution up to the highest level (Atacan et al., 2018). Hydrogen gas was collected at the counter electrode in the PEC cell. The volume of hydrogen gas produced was determined by measuring the differences in the electrolyte level in the graduated burette at different time intervals for 120 minutes.

## RESULTS AND DISCUSSION

The XRD patterns of  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  and  $\text{Au-CuFe}_2\text{O}_4/\text{TiO}_2$  are exhibited in Fig. 1. For  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ , the diffraction peaks at  $2\theta = 18.35, 30.15, 35.52, 43.18, 57.12, 62.73,$  and  $74.25^\circ$  corresponds to (111), (220), (311), (331), (511), (400), and (533) crystal planes of  $\text{CuFe}_2\text{O}_4$  with cubic spinel structure (ICSD no. 98-018-4951) (Atacan et al., 2018). As can be seen in Fig. 1, the diffraction peaks of  $\text{TiO}_2$  observed at  $25.3^\circ, 37.8^\circ, 48.0^\circ, 53.9^\circ, 55.1^\circ, 62.7^\circ, 69.7^\circ, 75.6^\circ$  and  $83.0^\circ$  attribute to the (101), (004), (200), (105), (211),

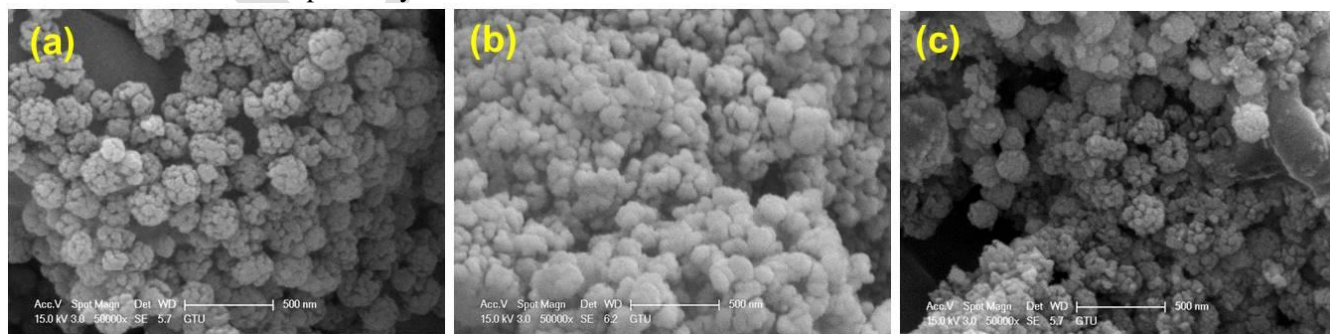
(204), (220), (215) and (303) reflections of anatase phase of TiO<sub>2</sub> (ICDS: 98-015-4601). For Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocomposite, the diffraction peaks are well matched to (101), (220), (311), (004), (331), (200), (422), (511) and (215) planes of anatase phase of TiO<sub>2</sub> and cubic spinel structure CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. The diffraction peaks marked with “#” matched with the (111), and (200) crystalline planes of metallic Au. These two peaks may be related to metallic Au (ICSD database No. 98-018-0878). These results indicate that the metallic Au [nanoparticles](#) have been deposited on the surface of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocomposite.



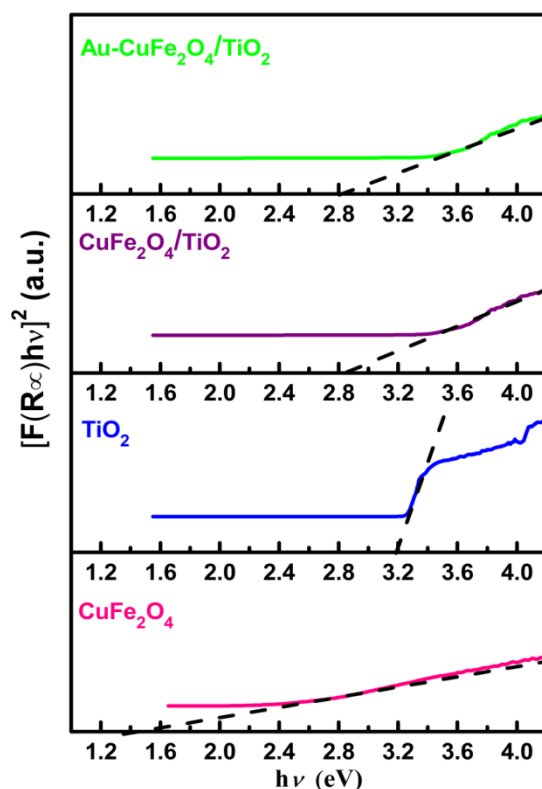
**Figure 1.** XRD patterns of samples

The morphology of all the products were examined by scanning electron microscope, as displayed in Fig. 2. Fig. 2a exhibits that CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs are agglomerated due to their magnetic properties (Atacan et al., 2018). As can be seen in Fig. 2b, TiO<sub>2</sub> morphology has shape of cauliflower containing small spherical particles. The nanocomposite particles demonstrate an irregular flake, and have a large degree of agglomeration owing to the magnetic interaction between nanoparticles (Fig. 2c).

Optical features and optic band gap energies of the products were determined with UV–Vis diffuse reflectance spectroscopy (DRS) and Kubelka-Munk function, as illustrated in Fig. 3. As shown from in Fig. 3, only TiO<sub>2</sub> exhibits a strong absorption only in the UV spectrum due to its wide band gap. Unlike TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> show absorption in the visible region due to the low band gap energy of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. The determined band gap energies of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> are 1.36, 3.2, 1.62 and 1.57 eV, respectively.

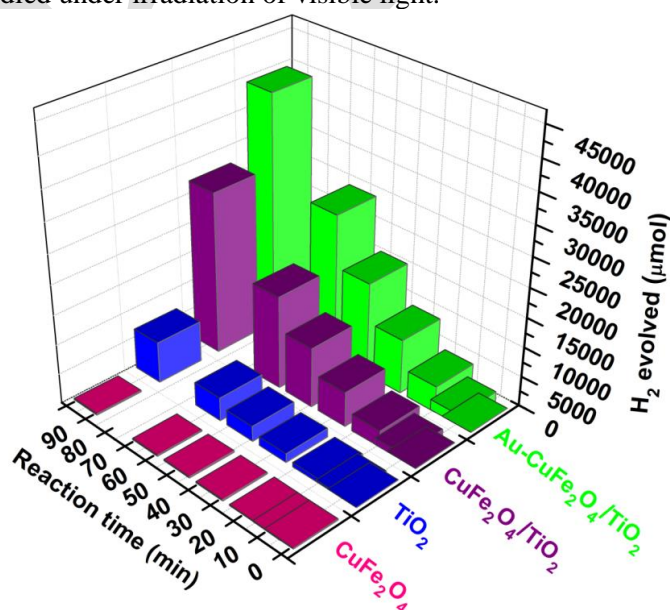


**Figure 2.** SEM images of (a) CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, (b) TiO<sub>2</sub> and (c) Au doped CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/ TiO<sub>2</sub>.



**Figure 3.** The band gap energies of samples.

The capabilities to product H<sub>2</sub> via PEC water splitting of the CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated surfaces were analyzed. The H<sub>2</sub> yields of the as-prepared bare CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated ITO surfaces are presented in Fig. 4. The results represent that the amount of H<sub>2</sub> produced by the coated ITO surfaces enhance with visible light irradiation, indicating excellent photostability in the photochemical water splitting process. As can be seen in Fig. 5, Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated ITO has importantly increased cabability to product H<sub>2</sub>. The H<sub>2</sub> production rates of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>, CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> and Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated ITO surfaces are 223.8, 6906.8, 27374.7 and 39442.2 μmol, respectively. To explain the advanced mechanism of 3D plasmonic Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated ITO, the PEC efficiencies were further studied under irradiation of visible light.



**Figure 4.** H<sub>2</sub> evolution by photoelectrochemical water splitting of the samples.

TiO<sub>2</sub> and CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, are known n-type and p-type semiconductor, respectively. So, when ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> is combined with ZnO to occur a heterojunction structure, while the fermi level of p-type ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> moves up, and fermi level of n-type ZnO will move down. When two Fermi levels are aligned, the p-n junction inner electric field

(IEF) is formed at the interface of TiO<sub>2</sub> and CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Liu et al., 2019, Kim et al., 2014). When the experimental results have been taken into account, the possible mechanism of the generation of H<sub>2</sub> via PEC water splitting has been proposed for Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> coated ITO electrode. When the visible light ( $\lambda > 420$  nm) is used for PEC water splitting process, TiO<sub>2</sub> can't be excited owing to its large band gap. The visible light may excite CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and the plasmonic Au NPs. During Au NPs are induced with visible light, hot electrons are produced due to its SPR effect (Liu et al., 2019, Kim et al., 2014). The photoexcited hot electrons migrate to the CB of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, and both hot electrons and CB electrons of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> to that of TiO<sub>2</sub>. So, by extending the life of the photogenerated electrons in the heterostructure, the recombination of the charge carriers is effectively inhibited and the efficiency of PEC hydrogen production is enhanced.

## CONCLUSION

The aim of this study is to increase the PEC activity of CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> by Au doping, because Au nanoparticles act as electron traps capturing photoelectrons, develop the interfacial charge-transfer and delay the recombination of photoinduced electron-hole pairs. CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> was prepared by ultrasonic assisted wet impregnation method. Au was doped on CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> by borohydride reduction method. Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> ternary nanocomposite could be a promising candidate as a photocatalyst for water splitting. PEC water splitting measurements show that the Au NPs act as a plasmonic photosensitizers to inject hot electrons into the CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and then transport to the TiO<sub>2</sub>. The as-prepared Au-CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocomposites exhibited several advantages such as stability, monodispersity, low-cost, simplicity and rapid separation performance comparison of other catalysts. It is believed that this study approach may open up a new gate to obtain the production of hydrogen evolution used in energy applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation has been supported by the Scientific Research Projects Commission of Sakarya University (Project number: 2018-3-12-79). The authors thank Dr. Keziban Atacan for helping. M.Ö. thanks Turkish Academy of Sciences (TUBA) for partial support.

## REFERENCES

- Atacan K, Topalo B, Özacar M 2018. General New CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/amorphous manganese oxide nanocomposites used as photocatalysts in photoelectrochemical water splitting. *Applied Catalysis A* 564: 33–42.
- Gadelhak Y., Rouby WMA, El, Farghali, AA 2019. Au-decorated 3D/1D titanium dioxide flower-like /rod bilayers for photoelectrochemical water oxidation. *Electrochim. Acta* 306, 185–197.
- Liu L, Wang W, Long J, Fu S, Liang Y, Fu J. 2019. Solar Energy Materials and Solar Cells Three-dimensional plasmonic photoanode of Au nanoparticles/ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanosheets coated onto ZnO nanotube arrays for photoelectrochemical production of hydrogen. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 195: 330–338.
- Güy N, Özacar M 2016. The influence of noble metals on photocatalytic activity of ZnO for Congo red degradation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 20100-20112.
- Park J, Deshmukh PR, Sohn Y, Gyu W 2019. ZnO-TiO<sub>2</sub> core-shell nanowires decorated with Au nanoparticles for plasmon-enhanced photoelectrochemical water splitting. *Journal of Alloys Compounds* 787: 1310-1319.
- Khore SK, Kadam SR, Naik SD, Kale BB, Sonawane, RS 2018. Solar light plasmonic Au@TiO<sub>2</sub> nanocomposite with superior photocatalytic performance for H<sub>2</sub> production and pollutant degradation. *New Journal of Chemistry* 42: 10958–10968.
- Kim HS, Kim D, Sub B, Bo G, Um M, Kang M 2014. Synthesis of magnetically separable core@shell structured NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@TiO<sub>2</sub> nanomaterial and its use for photocatalytic hydrogen production by methanol/water splitting. *Chemical Engineering Journal* 243: 272–279.
- Ünlü B, Çakar S, Özacar M, 2018. The effects of metal doped TiO<sub>2</sub> and dithizone-metal complexes on DSSCs performance. *Solar Energy* 166: 441–449.
- Yang H, Yan J, Lu Z, Cheng X, Tang Y 2009. Photocatalytic activity evaluation of tetragonal CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for the H<sub>2</sub> evolution under visible light irradiation. *Journal of Alloys Compounds* 476: 715–719.
- Hafeez H, Kumar, Lakhera SK, Karthik P, Anpo M, Neppolian B 2018. Facile construction of ternary CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> nanocomposite supported reduced graphene oxide (rGO) photocatalysts for the efficient hydrogen production. *Applied Surface Science* 449:772–779.



## Kara kimyon türevlerinin karaciğer kanseri üzerindeki inhibisyon etkisi

Faik Gökcalp

Kırıkkale University, Faculty of Education, Science Education, Yahşihan/Kırıkkale, Turkey

\* Sorumlu yazar e-mail: akgokalp@gmail.com

### Özet

*Nigella sativa* L. tohumları ve bunlardan elde edilen yağlarının önemli bir bileşeni Timokinon dur. Çörek otu tohumlarının aktif bileşeni olan Timokinon temel olarak tıbbi amaçlar için kullanılır. *Nigella sativa* 'daki farmakolojik olarak etkisi olan aktif bileşenler Timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) en önemlilerindedir. Çörek otu tohumlarının temel bileşeni olan timokinonun en fazla bulunan aktif bileşen olduğu etanolik ekstraktından tespit edilmiştir. *Nigella Sativa*'nın etkili bileşeni olan timokinon antikanser ajanı olarak en önemli lipit çözünen bileşenlerdir. Ayrıca, *Nigella sativa*, karaciğer gibi çeşitli enflamatuar kanserler için güçlü yararlar sağlamakla birlikte bu tıbbi bitki kan sisteminde böbrekler, akciğerler, prostat, karaciğer kanserlerine karşı etkilidir. Bu çalışmada, Timol, Timokinon ve Timohidrokinon 'un karaciğer kanseri üzerindeki inhibisyon etkisi, doking kullanılarak hesaplanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Timol, Timokinon, Timohidrokinon. karaciğer kanseri, doking

### The inhibition effect of black cumin derivatives on liver cancer

#### Abstract

An important component of *Nigella sativa* L. seeds and their fats is Timokinone. Thymokinone, the active ingredient of black seed, is mainly used for medicinal purposes. Pharmacokinetic active ingredients in *Nigella sativa* Thymokinone (TQ), dithymokinone (DTQ), thymohydroquinone (THQ) and thymol (THY) are among the most important. It was determined from the ethanolic extract that thymokinone, which is the main component of black seed, is the most active ingredient. Thymoquinone, an effective component of *Nigella Sativa*, is the most important lipid-soluble components as an anticancer agent. In addition, *Nigella sativa* provides powerful benefits for various inflammatory cancers such as liver, but this medicinal plant is effective against kidney, lungs, prostate, liver cancers in the blood system.

**Keywords:** Thymol, Thymokinone, Thymohydroquinone. Liver cancer docking

### GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler yüzyıllardır birçok hastalığın tedavisiyle birlikte lezzet ve aroma amaçlı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde de oldukça geniş kullanım alanları olan çörekotu antioksidan etkileri ve çok geniş spektrumdaki tedavi edici özelliklerinden eczacılık, gıda endüstrisi ve kozmetik olmak üzere yaygın bir biçimde yararlanılmaktadır (Aslan ve Borazan,2019).

Ülkemizde ve diğer müslüman coğrafyalardaki haklar tarafından geleneksel tıp ve gıda baharatı olarak oldukça önemli olan çörek otu bitkisi “Ölüm dışında hiçbir hastalık yoktur ki çörek otunda onun için bir deva bulunmasın

(Buhari,)” hadisi nedeniyle kompleks ve tüm zamanların şifa ve sağlık veren bitkisi olarak taneleriyle, yağıyla önemsenmiştir. Diğer toplumlarda da çörek otu önemi bilinen ve kullanılan tıbbi bitkidir.

Hipokrat, Dioskorides gibi hekimlerin çörek otunu tedavi amacıyla kullandıkları, bazı lahit buluntuları arasında çörek otu tohumlarının ortaya çıkmasıyla anlaşılmaktadır(Gün,2012)

Çörek otu ile ilgili elde edilen bulgular, modern tıbbın da ilgisini çekmiş, günümüzde ise çörek otundaki timokinonlar gibi etken maddeleri ve fitokimyasalları araştırmaya, koruyucu ve tedavi edici özelliklerini meydana çıkararak araştırmalar yapmaya sevk etmiştir.

### Çörek Otu (*Nigella sativa*)

*Nigella* cinsinin yaygın bilinen üç türünden biri olan *Nigella sativa* Türkçe’de “çörek otu” olarak bilinmekle birlikte halk arasında kara kimyon, siyah susam olarak da adlandırılmaktadır.

Kapsül içerisindeki siyah tohumunda oldukça etkili uçucu yağlar ve fitokimyasallar barındırmakla birlikte çok yağlı bir tohum değildir. Timokinon, ditimokinon, timol,timohidrokinon diğer uçucu yağlar, sabit yağlar, proteinler ile melantin, nigellin, saponinler ve tanen önemli fitokimyasallarıdır (Aslan ve Borazan,2019).

### Çörek otunun biyoaktif fitokimyasalları

Çörek otunun içeriğindeki aktif maddelerin; antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antitümöral ve immun stimulan etkilerinin oluşmasında önemli bir rolü vardır ve etkili biyoaktif kimyasalları arasında ilk akla gelenler timokinon, timohidrokinon, ditimokinondur. Asıl aktif maddenin fenol halkalı olan kinon yapısındaki timokinon olduğu yapılan araştırmalardan anlaşılmaktadır.

Timokinon, thymol, dihidrotimokinon, karvakrol, p-simen, alfa ve beta pinen, alfa tujen ve t-anethol gibi uçucu yağları çörek otunu önemli kullanılan bir tıbbi bitki haline getirmektedir.

Bu yağlar gıdalarda oksidasyonun ve peroksidasyonun baskılanması, insan ve hayvan organizmalarında serbest radikallerin meydana getirdiği oksidasyon-peroksidasyon reaksiyonlarına bağlı hücre hasarlarının önlenmesi ve onarılması süreçlerinde rol alan önemli antioksidanlardır (Sultan ve ark.,2009; Burtis ve Bucar,2000 ).

### Çörek otuyla özdeş fitokimyasal: timokinon

Timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) çörek otu tohumunun en önemli aktif bileşenleridir (Perera, ve ark.,2019). *Nigella sativa* ve aktif bileşenleri karaciğer gibi çeşitli enflamatuvar kanserler için güçlü yararlar sağlar (Randhawa ve ark.,2011). Bununla birlikte bu tıbbi bitki kan sisteminde böbrekler, akciğerler, prostat, karaciğer kanserlerine karşı etkilidir (Mollazadeh ve ark.,2017).

*Nigella sativa* L. (Black Cumin) tohumlarında ve yağlarının önemli bir bileşeni Timokinon dur (Erisgin ve ark.,20197). Timokinonlu kara kimyon tohumları aktif bileşen temel olarak tıbbi amaçlar için kullanılır (Abd El-Hack ve ark.,2016).

### MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada çörek otundan elde edilen önemli aktif maddelerden timokinon, timohidrokinon ve timol ün karaciğer resöptörleri üzerindeki inhibe edici etkisi doking (Bikadi ve Hazai, 2009) kullanılarak karşılaştırılıp ne tür etkileşimler olabileceği ortaya konulmaya çalışılacaktır. Bu teorik çalışmalar deneysel çalışmalara yön vermesi, zaman ve madde kaybını önlemesi açısından oldukça önemlidir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

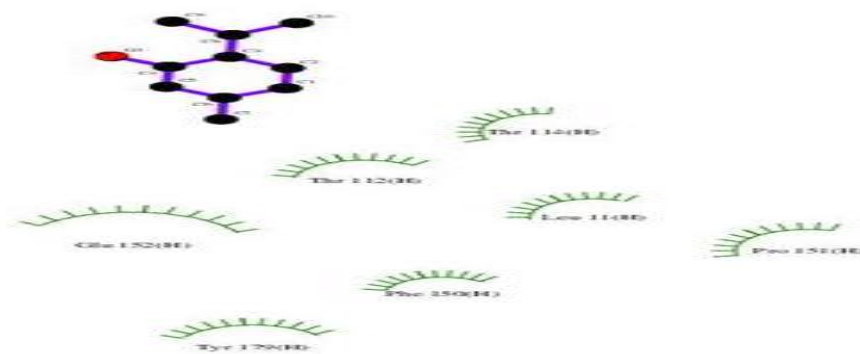
Doğal bileşiklerin ilaçlar olarak çekiciliği, kısmen kanserojen yolaktaki birçok bileşeni etkileme potansiyellerinden kaynaklanmaktadır. Bu çalışma, kanser ilerlemesinde ve farklılaşmasında rol oynayan kilit moleküler hedeflere odaklanmaktadır. karaciğer kanseri reseptörleri PDB ID: 3S35 (.Santhi ve ark., 2016) olarak belirlenmiştir.

Çörekotu bitkisi (*Nigella sativa*) içindeki önemli aktif bileşiklerin karaciğer resöptörleri üzerindeki inhibe edici etkisiyle ilgili doking sonuçları Tablo 1 de verilmiştir.

**Tablo 1.** *Nigella sativa*'nın aktif bileşiklerinin karaciğer kanseri üzerindeki inhibisyon etkisi

Active compounds/ Liver cancer) (3s35))	E free binding energy score(kcal/mol)	Inhibition constant (Ki)	H-binding energy	Electrostatic energy	Internal energy
Thymol	-3.54	2.53 mM	-4.04	-0.18	-4.22
Timokinon	-4.04	1.09 mM	-4.24	-0.10	-4.34
Timohidrokinon	-3.08	5.50 mM	-3.85	-0.18	-4.03

Çörek otu bitkisinin önemli bir aktif bileşeni olan Timol'ün karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi Şekil 1 de verilmiştir.



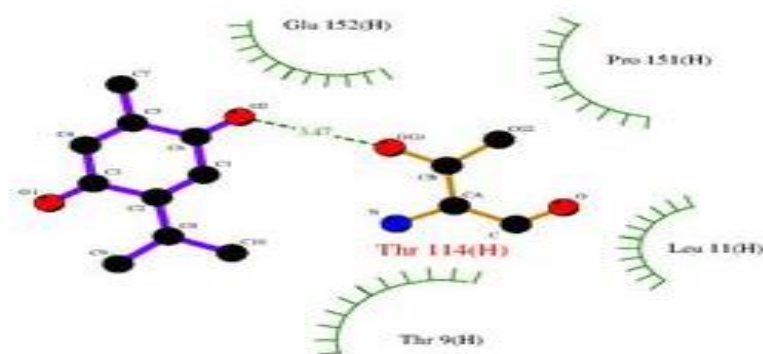
Şekil 1. Timol'ün karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi

Timol'ün karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi ve etkileşim yaptığı bölgeler Tablo 2 de özetlenmiştir.

Tablo 2 Timolün karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi ve yaptığı etkileşimler

polar	hydrophobic	other
<b>GLU152 (-1.0886)</b>	PRO151 (-0.5781)	TYR179 (-0.6132)
	LEU11 (-0.4502)	THR112 (-0.5493)
	PHE150 (-0.3708)	THR114 (-0.4281)

Çörek otu bitkisinin önemli bir aktif bileşeni olan Timokinon'un karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi Şekil 2 de verilmiştir.



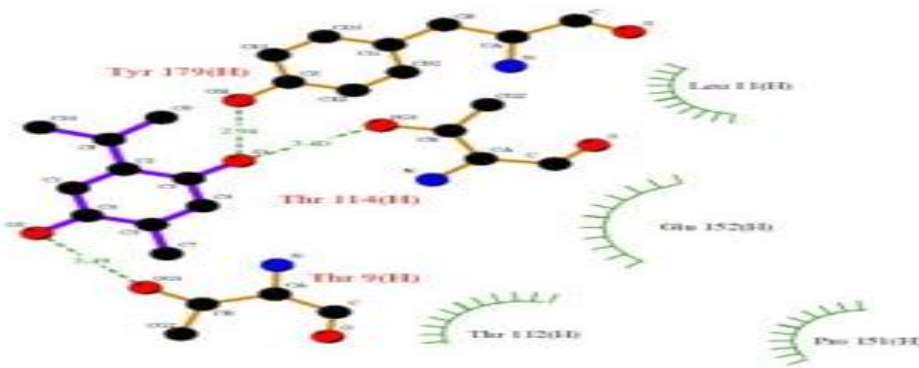
Şekil 2. Timokinon'un karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi

Timokinon'un karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi ve etkileşim yaptığı bölgeler Tablo 3 de özetlenmiştir.

Tablo 3 Timokinon'un karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi ve etkileşim yaptığı bölgeler

hydrogen bonds	polar	hydrophobic	other
<b>THR114 (-0.3622)</b>	THR9 (-0.7612)	PRO151 (-0.7228)	GLU152 (-0.5905)
		LEU11 (-0.4792)	

Çörek otu bitkisinin önemli bir aktif bileşeni olan Timohidrokinon'un karaciğer kanseri reseptörü ile etkileşimi Şekil 3 de verilmiştir.



Şekil 3. Timohidrokinon'un karaciğer kanseri receptörü ile etkileşimi

Timohidrokinon'un karaciğer kanseri resöptörü ile etkileşimi ve etkileşim yaptığı bölgeler Tablo 4 de özetlenmiştir.

**Tablo 4** Timohidrokinon'un karaciğer kanseri resöptörü ile etkileşimi ve etkileşim yaptığı bölgeler

hydrogen bonds	hydrophobic	other
THR9 (-0.5334)	PRO151 (-0.5025)	GLU152 (-0.8775)
TYR179 (-0.3459)	LEU11 (-0.4408)	THR112 (-0.5576)
THR114 (0.0149)		

## SONUÇ

Çörekotu en fazla bulunan ve aktif bileşeni olan Timokinonun karaciğer kanseri resöptörü üzerindeki inhibe edici etkisinin yukarıda bahsedilen verilere göre diğerlerinden oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni etkileşim yaptığı bölgelerden de anlaşılacağı gibi hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve polar etkileşim olduğu sonucuna varılabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma kısmen Kırıkkale Üniversitesi BAP, proje sayısı (BAP-2016 / 016,2017 / 019,2018 / 033) tarafından desteklendi ve Kırıkkale Üniversitesi Yüksek Performanslı Bilgi İşlem Merkezi ve Gaussian 09W64 programında hesaplamalar yapıldı.

## KAYNAKLAR

- Aslan,R.,Borazan S.,2019,. Siyah Reçete: Çörek Otu Nigella Sativa, Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi,-7-74
- Gün M. 2012, Holly Seed: Nigella Sativa. Some Knowledge Corresponding to Nigella Sativa's Therapy Ailment. Lokman Hekim Journal 2(1): 43-46
- Sultan MT, Butt MS, Anjum FM, Jamil A, Akhtar S, Nasir M.,2009; Nutritional profile of indigenous cultivar of Black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. Pak J Bot. 41: 1321-30; Burtis M, Bucar F., 2000, Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research. 14: 323-28
- Perera, P.K., Karunaratne,D.T., Kalka,N., 2019, Antiinflammatory Actions and Potential Usage for Arthritic Conditions, Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition), Academic Press,, Pages 323-341
- Randhawa,M.A.,Al-Ghamdi, M., Al-Ghamdi, M.,2011,Anticancer Activity of Nigella sativa (Black Seed) - A Review, The American Journal of Chinese Medicine 39(6):1075-91
- Mollazadeh H, Afshari AR, Hosseinzadeh H. 2017, Review on the Potential Therapeutic Roles of Nigella sativa in the Treatment of Patients with Cancer: Involvement of Apoptosis: - Black cumin and cancer. J Pharmacopuncture.;20(3):158-172
- Erisgin,Z., Atasever,M., Cetinkaya,K., Dizakar,S.A., Omeroglu, S.,Sahin,H., 2019, Protective effects of , Nigella sativa oil against carboplatin-induced liver damage in rats, Biomedicine & Pharmacotherapy, 110, 742-747.

- Abd El-Hack, M.E., Alagawany, M., Farag, M.R., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., 2016. Nutritional, Healthical and Therapeutic Efficacy of Black Cumin (*Nigella sativa*) in Animals, Poultry and Humans. *International Journal of Pharmacology*, 12: 232-248
- Bikadi, Z., Hazai, E., 2009 Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock *J. Cheminf.* 1, 15
- Buhari (Tıp) 7; Müslim (Selam) 89/2215; Tirmizi (Tıp) 5/2042, 22/2071.
- Santhi, M.P. G. Bupesh, V. Senthil Kumar, K. Meenakumari, K. Prabhu S. Sugunthan. Manikandan, K. Saravanan 2016., Anticancer Activity And Drug Likeliness Of Quinoline through Insilico Docking Against Cervical And Liver cancer Receptors, *Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences*; 3(9)

DRAFT

## Erguvan (*Cercis siliquastrum* L.)’da çimlenme engelini giderici baz ön işlemler

Erol Kırdar, Halil Barış Özel\*

Bartın Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Bartın, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: halilbarisozel@gmail.com

### Özet

Erguvan (*Cercis siliquastrum* L.), ülkemizde geniş bir coğrafik yayılış alanına sahiptir. Bu nedenle türün özellikle peyzaj düzenleme çalışmalarında dekoratif görünümü nedeniyle yaygın bir kullanıma sahiptir. Ancak bu peyzaj kullanım değeri yüksek olan türün tohumdan yetiştirilmesinde bazı önemli sorunlar söz konusudur. Bu sorunların giderilmesi amacıyla bitki büyüme düzenleyiciler ile bazı ön işlemler uygulanarak tohum çimlenme engeli giderilmeye ve üretim potansiyeli artırılmaya çalışılmıştır. Gökçebey Orman Fidanlığından yapılan bu çalışmada; 1- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 3 saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 3 saat 400 mg/l Baikal EM1, 2- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 4 saat 400 mg/l Biohumus, 3- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 4 saat Baikal EM1 + Biohumus ve hiçbir ön işlemin uygulanmadığı kontrol olmak üzere 4 farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamaların gerçekleştirildiği tohumlardan alınan örnekler kullanılarak bir ay süreyle gerçekleştirilen çimlenme testleri sonucuna uygulanan varyans analizinin sonuçlarına göre P<0,01 güven düzeyinde istatistiki açıdan anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu kapsamda ön işlemleri gruplandırmak amacıyla gerçekleştirilen Duncan testi sonucunda %73,4 çimlenme yüzdesi ile 3. ön işlem birinci grupta yer alırken, %68,7 çimlenme yüzdesi ile 2. Ön işlem ikinci grupta, %51,3 çimlenme yüzdesi ile 1. ön işlem üçüncü grupta ve kontrol grubu da dördüncü grupta sıralanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Erguvan, Ön İşlem, Çimlenme Engeli, Çimlenme

### Pre-treatment of seed dormancy in judas trees (*Cercis siliquastrum* L.)

#### Abstract

Judas Trees (*Cercis siliquastrum* L.) has a wide geographical distribution area in our country. Therefore, it has a widespread use due to its decorative appearance especially in landscaping works. However, there are some important problems in the cultivation of the species with high value of landscape use from seed. In order to solve these problems, some pre-treatments with plant growth regulators have been applied to eliminate seed germination and to increase production potential. In this research made from Gökçebey Forest Nursery; 1- 6 hours of treatment with glass fractures + 3 hours H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 3 hours 400 mg / l Baikal EM1, 2- 6 hours of treatment with glass fractures + 2 hours H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 4 hours 400 mg / l Biohumus, 3- 6 hours with glass fractures treatment + 2 hours H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 4 hours Baikal EM1 + Biohumus and no pretreatment (control). According to the results of the variance analysis applied to the results of germination tests carried out for one month using the samples taken from the seeds from which these applications were performed, a statistically significant difference was found at P < 0.01 confidence level. In this context, Duncan range test performed with the aim of grouping 73.4% germination percentage with 3% pre-treatment in the first group, 68.7% with the percentage of pre-treatment in the second group, 51.3% with the percentage of germination 1. pre-treatment the third group and the control group were listed in the fourth group.

**Keywords:** Judas Trees, Pre-Treatment, Seed Dormancy, Germination

### GİRİŞ

Küresel iklim değişikliğinin neden olduğu olumsuz çevre koşullarının etkilerinin ortadan kaldırılmasında ormanların ve ormanları meydana getiren en önemli elementlerden birisi olan bitkilerin ve ağaçların çok önemli bir rolü bulunmaktadır. Ancak tüm dünya ormanlarından yapılan bilinçsiz ve plansız yararlanmalar, yangınlar, açık maden işletmecilikleri, böcek ve fırtına gibi abiyotik ve biyotik faktörlerin zararları, bu önemli ve değerli kaynağın bitme noktasına gelmesine neden olmuştur. Nitekim dünya ormanlarının durumunu ortaya koymak amacıyla FAO tarafından 2018 yılında açıklanan son rakamlara göre, başta ekvator bölgesinde bulunan tropikal ve sub-tropikal ormanlardan yapılan aşırı ve sömürücü yararlanmalar ile özellikle Akdeniz rejiminde ve Güney Amerika kıtasında yaşanan büyük yangınlar nedeniyle dünyanın verimli orman alanlarının son 50 yılda %37,6’sının tamiri mümkün olmayacak şekilde yok edildiği bildirilmektedir (FAO, 2018). Diğer taraftan başta karbon depolama olmak üzere birçok fonksiyonel ve koruyucu işlevi yerine getiren dünya orman kaynakları çevresel kirliliklerin neden olduğu etkiler sonucunda sahip olduğu biyolojik çeşitliliğin de önemli

bir kısmını özellikle bitkisel anlamda yitirmiş durumdadır. IUCN tarafından 2018 yılı sonunda bildirilen açıklamalara göre başta ağır metal kirliliği ve evsel atıkların neden olduğu çevre kirliliği sonucunda kent ve orman rejimi içinde bulunan alanlar dahil olmak üzere sadece Avrupa kıtasında son 20 yılda 17 bitki türünün neslinin yitirildiği ve bu türlerin gen bankalarında dahi genetik rezervlerinin artık kalmadığı ifade edilmektedir (IUCN, 2018). Tüm bilgiler çerçevesinde yeni orman alanlarının tesis edilmesi, bozulan ve verimsizleşen orman kaynaklarının yeniden ıslah edilerek verimli hale getirilmesi, özellikle sağlıklı kent yaşamını ve koşullarını oluşturmak adına başarılı kent ve yeşil kuşak ormanlarının ve bitki alanlarının tesis edilmesi tüm insanlığın geleceğinin güvence altına alınması açısından tüm ülkelerin kısa ve uzun vadede hedefleri ve milli politikaları içinde yer almalıdır. Bununla birlikte yapılacak olan ağaçlandırma ve bitkilendirme çalışmalarında başarıyı elde etmek için çalışmaların tekniğine uygun şekilde yapılması kadar, uygun tür, orijin ve hatta klonların da seçimi oldukça önemlidir. Bilhassa kent içi ağaçlandırmalarda insanların biyolojik ve psikolojik sağlıklarını korumak amacıyla gerçekleştirdikleri rekreasyonel faaliyetlerde hoş kokuları ve güzel dekoratif görünümleri ile kullanım ve peyzaj değeri yüksek olan türlerin ve orijinlerin seçimi çok daha olumlu etkilerin yaşanması açısından değerlidir (Ürgeç, 1998).

Bu araştırmada da, ülkemizde geniş bir coğrafik yayılış alanına sahip olan ve dekoratif görünümü nedeniyle peyzaj düzenleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Erguvan (*Cercis siliquastrum* L.) türünün, generatif olarak yetiştirilmesinde ortaya çıkan çimlenme engellerinin giderilmesi amacıyla uygulanan bazı biyokimyasal ön işlemlerin etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Erguvan, kanaatkar bir tür olması ve dekoratif görünümü nedeniyle ülkemizin başta Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgeleri ile İç Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinde yapılan rüzgar perdesi, yeşil kuşak ağaçlandırmaları, kent ormanları ve kent parklarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tohumunda sert tohum kabuğu nedeniyle yaşanan çimlenme engeli, türün üretiminde bazı sorunların yaşanmasına neden olmaktadır (Hartmann ve ark., 1997; Ürgeç, 1998). Bu araştırmada da, Kdz. Ereğli orijinli erguvan tohumları ön işlem uygulamalarında ve çimlendirme testlerinde kullanılmıştır. Tohumlar Eylül 2018'de toplanmış ve saf su ile yıkanıp temizlendikten sonra Gökçebey Orman Fidanlık Müdürlüğünde bulunan üretim serasında %30 kum + %30 perlit + %40 torf maddelerinden meydana gelen üretim ortamına çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekilmiştir. Tohumların üretim ortamını oluşturan serada; gündüz ortam sıcaklık 21,7°C, gece ortam sıcaklığı 16,2°C, tohumların çimlenme ortamının sıcaklığı 15,8°C, çimlenme ortamının nemi %75,4 ve çimlenme ortamına etki eden ışık entansitesi de %71,8'dir.

### Metot

Araştırmada kullanılan tohumlar 2018 yılının Eylül ayında Kdz. Ereğli'den toplanırken, tohumların genel olarak ağaçların tepe boyunun yaklaşık ortasından toplanmasına ve tohumların taze tohumlar olmasına çok önem verilmiştir. Erguvan tohumlarının çimlenme engelini ortadan kaldırılması amacıyla uygulanan biyokimyasal ön işlemler Tablo 1'de verilmiştir. Bu ön işlemler uygulanırken her bir ön işlem için 3 replikasyon gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrürde 100 adet erguvan tohumu olmak üzere toplam her bir ön işlem için 300 adet tohum kullanılmıştır. Araştırmanın genelinde ise kontrol işlemi de dahil olmak üzere toplam 1200 adet tohum yer almıştır. Toplanan tohumlar denemenin kurulduğu sera koşullarına getirildikten sonra saf su ile temizlenmiş, kantitatif filtre kağıtlarında fazla nem muhtevaları alındıktan sonra Tablo 1'de belirtilen ön işlemlere tabi tutulmuştur.

**Tablo 1.** Erguvan Tohumlarına Uygulanan Bazı Ön İşlemler

Ön İşlemler	Örnekleme Miktarı (adet)
1- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 3 saat H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 3 saat 400 mg/l Baikal EM1	300 adet tohum
2- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 4 saat 400 mg/l Biohumus	300 adet tohum
3- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 4 saat Baikal EM1 + Biohumus	300 adet tohum
4. Kontrol	300 adet tohum

## İstatistik Analizler

Tohumlara uygulanan ön işlemlerin ve kontrol numunesi arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplandırmalarda da Duncan testi uygulanmıştır. Bu analizlerin gerçekleştirilmesinde SPSS paket istatistik programından yararlanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Erguvan türüne ait tohumların sahip olduğu çimlenme engelini giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, çimlenme engelini ortadan kaldırılarak daha yüksek çimlenme yüzdesinin tohumlarda elde edilmesi için bazı biyokimyasal ön işlemler uygulanmıştır. Bu biyokimyasal ön işlemlerden sonra tohumların çimlenme yüzdesine ilişkin değerlere uygulanan tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve  $P < 0,05$  güven düzeyinde gerçekleştirilen Duncan testinin sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Erguvan Tohumlarına Uygulanan Ön İşlemlerden Elde Edilen Çimlenme Yüzdesi Değişkenine İlişkin Ortalama Değerlere Uygulanan Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Ön İşlemler	$P < 0,01$
	Çimlenme Yüzdesi (%)
1- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 3 saat $H_2SO_4$ + 3 saat 400 mg/l Baikal EM1	68,7 <sup>b</sup>
2- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat $H_2SO_4$ + 4 saat 400 mg/l Biohumus	51,3 <sup>c</sup>
3- 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat $H_2SO_4$ + 4 saat Baikal EM1 + Biohumus	73,4 <sup>a</sup>
4. Kontrol	23,8 <sup>d</sup>

a, b ve c: Farklı harfler, farklı grupları göstermektedir ( $P < 0,05$ )

Tablo 2’deki sonuçlar incelendiğinde, erguvan tohumlarına sahip oldukları çimlenme engelini gidermek ve çimlenme yüzdesini artırmak için uygulanan bazı biyokimyasal ön işlemler arasında gerçekleştirilen varyans analizi sonucunda  $P < 0,01$  güven düzeyinde istatistiki açıdan önemli bir farklılığın olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda tohumlara uygulanan biyokimyasal ön işlemleri çimlenme yüzdesi değişkeni yönünden gruplandırmak için  $P < 0,05$  güven düzeyinde gerçekleştirilen Duncan testi sonucunda 4 farklı grup ortaya çıkmıştır (Tablo 2). Buna göre, tohumlara uygulanan standart işlem olan 6 saat cam kırıkları ile muameleden sonra sülfirik asit, Baikal EM1 ve Biohumus kombinasyonu sonucunda erguvan tohumlarında 4 aylık çimlenme sürecinde %73,4 ile en yüksek çimlenme yüzdesi değeri elde edilmiştir. Bu grubu sülfirik asit ve Baikal EM1 kombinasyonunun uygulandığı tohumlar %68,7’lik çimlenme yüzdesi ile takip etmiştir. Üçüncü grupta ise sülfirik asit ve Biohumus kombinasyonunun uygulandığı tohumlar %51,3’lük çimlenme yüzdesi ile yer almıştır. Hiçbir ön işlemin uygulanmadığı kontrol grubunda yer alan tohumlarda ise çimlenme yüzdesi %23,8 olarak belirlenmiştir. Nitekim erguvan tohumlarının çimlenme engelini giderilmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada da, değişik dozlarda uygulanan ve önemli bir biyokimyasal olan Giberellik asitin (GA3) tohumlardaki sert kabuk yapısından kaynaklanan çimlenme engelini kırarak 20. hafta sonunda çimlenme yüzdesini %80’lere kadar yükselttiği belirlenmiştir (Gebre ve Karam, 2004). Yine erguvan tohumlarının çimlenme engelini giderilmesi amacıyla farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyiciler kullanılarak gerçekleştirilen bir başka çalışmada da Giberellik asit (GA3) ve Absisik asit (ABA) ile yapılan kombinasyonların 18-22 haftalar sonunda tohumlardaki çimlenme yüzdesini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Grbić ve ark., 2014). Bu karşılaştırmalı bulgular doğrultusunda bitki büyüme düzenleyicilere göre çok daha doğal olan ve sentetik hiçbir madde içermeyen Baikal EM1 ve Biohumus maddelerinin 4 ay sonunda erguvan tohumlarının sert kabuk yapılarından kaynaklanan çimlenme engelini kaldırarak, çimlenme yüzdesini bu türün tohumlarından yapılacak üretim çalışmaları için oldukça iyi bir düzeye ulaştırdığı söylenebilir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Erguvan tohumlarının çimlenme engelini kaldırılması ve çimlenme yüzdesinin artırılması amacıyla bazı biyokimyasal ön işlemlerin gerçekleştirildiği bu çalışmadan elde edilen bulgular ve sonuçlar ışığında, özellikle dekoratif görünümü ile kent içinde gerçekleştirilecek peyzaj ve diğer bitkilendirme çalışmalarında çok büyük bir değere sahip olan erguvanın tohumlarındaki çimlenme engelini kaldırılmasında ve çimlenme yüzdesinin artırılmasında 6 saat cam kırıkları ile muamele + 2 saat  $H_2SO_4$  + 4 saat Baikal EM1 + Biohumus kombine uygulamasının başarılı sonuçlar verdiğini söylemek mümkündür. Bu kombine uygulama ile 4 aylık



çimlendirme sürecinde elde edilen ve önemli ölçüde yüksek olduğunu kabul edebileceğimiz çimlenme yüzdesi değerlerini daha kısa sürelerde elde edilip edilmeyeceğini belirlemek için farklı doz denemelerinin yapılmasında yarar bulunmaktadır. Ayrıca söz konusu biyokimyasallar Giberellik Asit ve Absisik Asit gibi diğer çimlenme değerini ve yüzdesini artıran bitki büyüme düzenleyiciler ile de kombine edilerek denenmelidir. Bu kapsamda kanaatkar olması ve peyzaj değerinin yüksekliği ile önemli bir ağaç türü olan erguvanın neslinin korunması ve yaygın olarak özellikle kent içi ağaçlandırma çalışmalarında kullanılması özellikle rekreasyon uygulamalarına önemli bir değer katacaktır. Bununla birlikte söz konusu türün üretimi konusunda devlet ve özel fidanlıklarda da gerekli üretim alt yapısı oluşturulmalı ve rotasyon planlarına erguvan ağacının üretimi dahil edilmelidir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde yardımlarını bizlerden esirgemeyen Orman Genel Müdürlüğüne, Zonguldak Orman Bölge Müdürlüğüne ve Gökçebey Orman Fidanlık Müdürlüğüne teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

- FAO, 2018. World's Forest State 2018, Rome, 418 p.
- Gebre, G.H., Karam, N.S. 2004. Germination of *Cercis siliquastrum* seeds in response to gibberellic acid and stratification. *Seed Science and Technology* 32:255-260.
- Grbić M., Skočajić D., Đukić M., Đunisijević-Bojović D., Obratov-Petković D., Bjedov, I. 2014. *Breaking of judas tree seed dormancy by plant hormone treatments*. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 109: 73-84
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., Geneve, R.L. 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. Sixth Edition. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- IUCN, 2018. *International Union for Conservation and Nature Annual Report 2018*, 92 p. Switzerland.
- Ürgenç, S. 1998. Ağaç ve Süs Bitkileri Fidanlık ve Yetiştirme Tekniği, İ.Ü Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 3395/442, İstanbul, 717 s.

## Üç *Onopordum* türünün tohum protein profillerinin karşılaştırılması ve küme analizleri

Can Yılmaz<sup>1\*</sup>, Metin Konuş<sup>1</sup>, S. Mesut Pinar<sup>2</sup>, Hüseyin Eroğlu<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Van YYÜ, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye

<sup>2</sup> Van YYÜ, Fen Fakültesi, Van Sağlık Yüksekokulu, Van, Türkiye

<sup>3</sup> Van YYÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: cyilmaz@yyu.edu.tr

### Özet

*Onopordum* cinsi, yedisi ülkemize endemik olmak üzere, Türkiye’de 21 farklı tür içermektedir. Bu türlerin sınıflandırılmasında çoğunlukla morfolojik karakterler kullanılmış; tohum örnekleri üzerinde protein temelli bir sınıflandırma çalışmasına dünya literatüründe rastlanmamıştır. Oysa ki biyokimyasal belirteçlerin karakterize edilmesi muhtemel genetik erozyonun değerlendirilmesinde, bir varyetenin tanımlanmasında ve genetik çeşitliliğin ortaya konulmasında avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada, ülkemizdeki bu türlerden üçü doğal ortamlarından toplanarak uyku halindeki tohumları örnek olarak saklanmıştır. Tohum örneklerinden elde edilen proteinler farklı koşullarda hazırlanmış SDS-PAGE jellerinde koşturularak bant profilleri elde edilmiştir. Her tür için ayrı ayrı hesaplanacak Rf değerleri ile birlikte densiyometrik analizler yapılmış ve benzerlik katsayıları hesaplanarak uzaklık matrisi inşa edilmiştir. Bu matris değerleri UPGMA küme analizi yaklaşımı ile dendogramların oluşturulmasında kullanılmıştır. Böylece *Onopordum* tohum örnekleri üzerinde yapılmakta olan konvensiyonel sınıflandırmaya alternatif protein temelli moleküler sınıflandırma gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen veriler hem bu alanda ve bu örnek üzerindeki yeni çalışmalara kaynak oluşturacak, hem de konu üzerindeki literatür eksikliğini giderecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Onopordum*, tohum, protein, küme analizi

### Comparison of seed protein profiles of three *Onopordum* species and cluster analysis

#### Abstract

*Onopordum* species, seven of which are endemic to our country comprises 21 different species in Turkey. Morphological characters are mostly used in the classification of these species; a protein-based classification study on seed samples was not found in the world literature. However, characterization of biochemical markers is an advantage in the evaluation of genetic erosion, in defining a variety and in revealing genetic diversity. In this study, three of these species in our country were collected from their natural environment and their seeds were kept as samples. The proteins obtained from seed samples were run in SDS-PAGE gels prepared under different conditions and band profiles were obtained. Densitometric analyzes were made with the Rf values to be calculated separately for each species and similarity coefficients were calculated and the distance matrix was constructed. These matrix values were used to construct dendograms with UPGMA cluster analysis approach. Thus, protein based molecular classification was performed on the *Onopordum* seed samples as an alternative to the conventional classification. The data obtained at the end of the study will be the source of new studies in this area and on this sample and will contribute to the literature on the subject.

**Keywords:** *Onopordum*, seed, protein, cluster analysis

### GİRİŞ

*Onopordum* L. Asteraceae (Compositae) ailesine ait ilginç bir cinstir ve bu sınıfın türleri, gıda olarak ve çeşitli ülkelerin genel tıbbında kullanılmaktadır. Papatyagiller familyasından; 30-200 cm boylarında, dik, güçlü ve dikenli gövdeli, yoğun veya seyrak örümcek ağimsı tüylere sahip olan, geniş dallanma gösteren, yaprakları tabanda rozet, yukarıda almaşık dizilişli, dişli ve dikenli kenarlı, alt yüzleri genellikle pamuksu, sivri mızraklı yaprakları olan; Haziran-Ağustos aylarında, 2-2.5 cm çapında kömeçler halinde (Kapitulum) leylak rengi çiçekler açan, beyazımsı kazık köklü, iki yıllık, otsu bir bitkidir.

*Onopordum* cinsinin yeryüzünde çoğunluğu Batı ve Orta Asya, Avrupa’nın özellikle Akdeniz’e kıyısı olan ülkeleri, Kuzey Afrika ve Kanarya Adaları olmak üzere günümüzde yaklaşık 60 türü bulunmaktadır (Jeffrey, 2007). *Onopordum* cinsi üyeleri genellikle ruderal alanlarda, yol kenarlarında, kurak taşlık alanlarda, step alanlarda, tarla içi ve kenarlarında, az olarak ta korunmuş alanlar ile dağlık bölgelerde yayılış göstermektedir. Ülkemizde farklı bölgede farklı isimlendirilen *Onopordum* cinsi taksonlarına; at dikenini (Daday-Kastamonu),

galagan, kalagan (Erciş-Van), kaluğan (Kızılcahamam-Ankara), boğa diken, deve diken, gengel, eşek helvası, eşek kömürdeği, eşekközlemesi, kangal, kangal diken, eşek diken, sıyırma, sıyırma diken, sıyırma gibi isimler verilmiştir (Baytop, 1994; Güner ve ark 2000). Dünya’da ise Scotch thistle (İskoç diken), cotton thistle (pamuklu diken), heraldic thistle (hanedan diken), wooly thistle (yünlü diken), taurian thistle (boğa diken), giant thistle (dev diken) gibi değişik isimlerle adlandırılmaktadır (USDA, 2013).

*Onopordum* cinsi üyelerine ait kimyasal çalışmalarda izole edilen metabolitler arasında seskiterpenoidler, flavonoidler, asetilenik bileşikler, steroidler, triterpenler, lipidler ve azot içeren bileşikler bulunmaktadır (Brunoa, 2011).

Bu çalışmada, *O. canum* Eig, *O. sirsangense* Rech. f. ve *O. majori* Beauverd türlerine ait tohumlar örnek olarak kullanılmıştır.

Bitki türlerinin morfolojik ve fizyolojik karakterlerine göre tanımlanması ve ayrılması uygulanabilirlik açısından kolaylık sağlasa da, hem kullanılan bu karakterlerin yeterli sayı ve nitelikte olmaması hem de çevresel faktörlerden etkilenerek, tür tayininde yanlışlıklara yol açacak değişiklikler gösterebilmeleri bu tür işlemleri sınırlamaktadır. Bu nedenle de artık sıklıkla biyokimyasal ve moleküler belirteçler kullanılmakta ve morfolojik sınıflandırmayı tamamlamaktadır. Proteinlerde polimorfizm gen lokuslarının farklı ifadeleri sebebiyle, çok farklı şekillerde gözlemlenebilmektedir; ancak kesin olan çok büyük çeşitlilik gösterdiği (Zeng ve ark, 2013; Takasusuki ve ark, 2006).

Tohum proteinleri genetik çeşitliliğin ortaya konulmasında, genotipin iyi bir tanımlayıcısı olarak görülmektedir; ve bu proteinlerin %80’ini oldukça geniş bir gen ailesinin ürünleri olan, kararlı biyobelirteçler olarak kullanılabilen, depo proteinleri (çift çeneklilerde globulinler, tek çeneklilerde ise prolaminler) teşkil etmektedir (Konarev ve ark, 1987). Biyokimyasal belirteçler, özellikle tohum dokularında çevresel faktörlerden nispeten bağımsızdır ve erken gelişim evrelerinde ya da morfolojik karakterleri gözlemlenemeyecek nitelikte bozulmuş örneklerde büyük avantaj sağlamaktadır. Tohum depo proteinleri gelişen tohum içerisinde sentezlenir ve çimlenme esnasında hidrolize olurlar; böylece tohumdan gelişecek filiz için azot ve karbon kaynağı oluştururlar. Tohum depo proteinleri embriyogeneze spesifiktir ve kesinlikle tohuma özgüdür (Bewley ve Black, 1994). Ayrıca tohum depo proteinleri çevresel faktörlerden etkilenmeyecek derecede kararludur (Neto ve ark, 2002); örneğin *Sadja* ve arkadaşları bu özelliği bazı *Brassica* türleri (*B. rapa*, *B. napus*, *B. carinata* ve *B. Juncea*) üzerine yaptıkları çalışmada (*Sadja* ve ark, 2009) göstermiştir.

Biyokimyasal belirteçlerin karakterize edilmesi muhtemel genetik erozyonun değerlendirilmesinde, bir varyetinin tanımlanmasında ve genetik çeşitliliğin ortaya konulmasında avantaj sağlamaktadır. Geleneksel tür tayininde kullanılan morfolojik karakterler, özellikle tohum üzerinden gerçekleştirildiğinde, tohum şekli, boyutları, rengi vb karakterlerin takibini içermektedir. Bu karakterlerin gözlenmesinin temelinde yatan biyokimyasal ve genetik arka plan pek çok tür için çözümlenmiştir. Ayrıca hastalık direnci ve depo ürünleri gibi diğer bazı karakterler morfolojik olarak tespit edilemezken, moleküler biyoloji teknikleriyle, tür tayini işlemine dahil edilebilmekte ve böylece sınıflandırmanın doğruluk oranı yükseltilmektedir (Cai ve Bullen, 1992). Bu noktada, bu tür farklılıkları güvenli bir şekilde ortaya koyacak SDS-PAGE gibi laboratuvar teknikleri genetik ve biyokimyasal temelli tür tayinine hizmet etmektedir (Mukhlesur ve ark, 2004).

Aktif genlerin ürünleri olduklarından ve oldukça polimorfik ve çoğunlukla kalıtlı olabilir özellikte bulduklarından protein polimorfizmi genetik belirteç olarak değerlendirilmektedir (Geptsi 1990). Protein profillerinde gözlemlenen polimorfizm genomun aktif kısmındaki farklılıkları işaret eder. Bu tür polimorfik değişiklikleri analiz etmenin farklı yöntemleri olsa da, geçerliliği ve doğruluğu (Ahmad ve Slinkard, 1992) sebebiyle, en çok tercih edilenlerinden biri poliakrilamid jel elektroforezidir (Ferguson ve Grabe, 1986; Raymond ve ark, 1991). Bu teknik farklı bitki türleri arasındaki genetik çeşitliliği ortaya koymada uzun zamandır kullanılmaktadır (Mukherjee ve Datta, 2008).

Özellikle ekonomik önemi bulunan tarım bitkilerinin türler arası/tür içi genetik çeşitliliğinin anlaşılmasında SDS-PAGE, diğer biyokimyasal teknikler içerisinde, kolay ve etkili olması sebebiyle oldukça sık kullanılan bir metottur. Tohum depo proteinlerinin genetik biyobelirteç olarak kullanıldığı dört ana alan mevcuttur:

- genom ilişkilerinin keşfi
- ürün/verim geliştirilmesi
- türler arası/tür içi çeşitliliğin analizi
- koruma ve yetiştirme faaliyetleri (özellikle evcil olmayan varyeteler için) (Bertozzo ve Valls, 2001; Stoyanova ve Boller, 2010; Takac ve ark, 2011).

“The unweighted pair-group method with arithmetic mean” (UPGMA) (Michener ve Sokal, 1957) protein temelli kümeleme çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir “uzaklık analizi” yöntemidir. Karşılaştırılan deneysel gruplar arasında ikili uzaklıklardan oluşan bir matris oluşturulduktan sonra en düşük uzaklık değeri esas alınarak diğer gruplar, bu iki grubu içerecek şekilde analize katılır. Ortak ata olarak kabul edilen kök

düğümüne bu iki grup dallarla bağlanır ve böylece ilk iki gruba en az iki farklı dal oluşturulur. Bu dalların uzaklıkları, iki grubun uzaklığının yarısı olarak hesaplanır. Diğer gruplar ise, mevcut iki dala olan uzaklıklarına göre ağaçta yerlerini alırlar.

## MATERYAL VE METOD

### Onopordum türlerine ait tohum örneklerinin toplanması ve sınıflandırılması

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinde yayılış gösteren *Onopordum* cinsine ait 3 farklı taksonun doğal habitatlarından toplanan örneklerin tohumları araştırma materyalini oluşturmaktadır. Proje'nin konusu oluşturan taksonlardan *O. canum* Şanlıurfa ili Birecik ilçesi, Halfeti civarında, *O. majorii* Muğla ili Yatağan ilçesi civarında ve *O. sirsangense* Van ili Çatak ilçesi, Bilgi köyü civarında yayılış göstermektedir. Çalışılacak taksonlara ait tohum örneklerinin toplanabilmesi için özellikle bu cinse ait türlerin tohum bağlama dönemleri olan Ağustos-Eylül ayları arasında yayılış gösterdikleri yukarıda adı geçen illerde arazi çalışmaları yapılmıştır. Toplanan bitkilerin teşhisleri Türkiye Florası'na (Danin, 1975) göre yapılmış, teşhis işlemlerinde kullanılan bitkiler herbaryum kartonlarına yapıştırılarak, Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (VANF) herbaryumuna saklanmıştır.

### Onopordum türlerine ait tohum örneklerinden protein özütlenmesi

Tohum örnekleri sıvı azot içerisinde olmak kaydıyla havan ve havan eli kullanılarak toz haline getirilmiştir. PVPP eklendikten sonra, sukroz-SDS-2-ME (3:1:5)'den oluşan ekstraksiyon tamponu içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika boyunca nazikçe karıştırılarak özütlenme uygulanmıştır. Santrifüj uygulandıktan sonra, süpernatant, 1 ml'lik alikotlar halinde ayrılmıştır. Tüpler TCA / Aseton (%5) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Tekrar santrifüj edilip 0.7 M amonyum asetat içeren metanol içinde 10dk inkübe edilmiştir. Bir kez daha santrifüj uygulanıp süpernatantı ayırdıktan sonra, soğuk % 80 aseton ile muamele edilmiştir. Bir santrifüj aşaması daha uygulanıp, metanol eklenmiş ve santrifüj sonrası pellet % 80 aseton ile karıştırılmıştır; Daha sonra 5 dakika boyunca 16000 g'de santrifüj uygulanıp aseton uzaklaştırılmıştır.

### Toplam protein miktarlarının tayini

Örneklerdeki protein miktarları Coomassie (Bradford) Protein tayininin ELISA plaka okuyucuya uyarlanmış olan prosedürü ile gerçekleştirilmiştir.

### SDS-PAGE uygulamaları ile örneklerin protein bant profillerinin oluşturulması

Protein örnekleri ve protein markörü, 200 mM Tris-HCl (pH:6,8), %8 SDS ve %0,4 Bromofenol Mavisini içeren örnek tamponunda çözündürülmüş ve her bir kuyucuğa eşit miktarda protein gelecek şekilde, Tablo 1'de içerikleri detaylı olarak verilen SDS-PAGE jellerinde 60 V'da koşurulmuştur.

Tablo 1. SDS-PAGE jellerinin hazırlanışı

Monomer Konsantrasyonu	Ayırma Jeli (0.375 M Tris, pH:8.8)			Yükleme Jeli (0.125 m Tris, pH:6,8)
	12%	10%	7.5%	4%
Akrilamid/bis	12 ml	13.3 ml	10 ml	2.6 ml
dH <sub>2</sub> O	11.1 ml	16.1 ml	19.4 ml	12.2 ml
1.5 m Tris-HCl, pH: 8.8	8.25 ml	10 ml	10 ml	-
0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8	-	-	-	5 ml
10% (w/v) SDS	300 µl	400 µl	400 µl	200 µl
10% APS	150 µl	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>30 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>40 ml</b>	<b>20 ml</b>

### SDS-PAGE jellerinin boyanması ve görüntülenmesi

Jellerdeki bantların görüntülenmesinde Coomassie Boyaması uygulanmıştır. Jeller Wilbur UV-Vis Jel Görüntüleme Sistemi içerisinde, gün ışığında (beyaz ışık, Vis) görüntülenmiş ve fotoğraflar bilgisayar ortamına taşınmıştır.

### Densiyometrik bant analizleri, UPGMA ile dendogram oluşturulması, ve diğer istatistiksel analizler

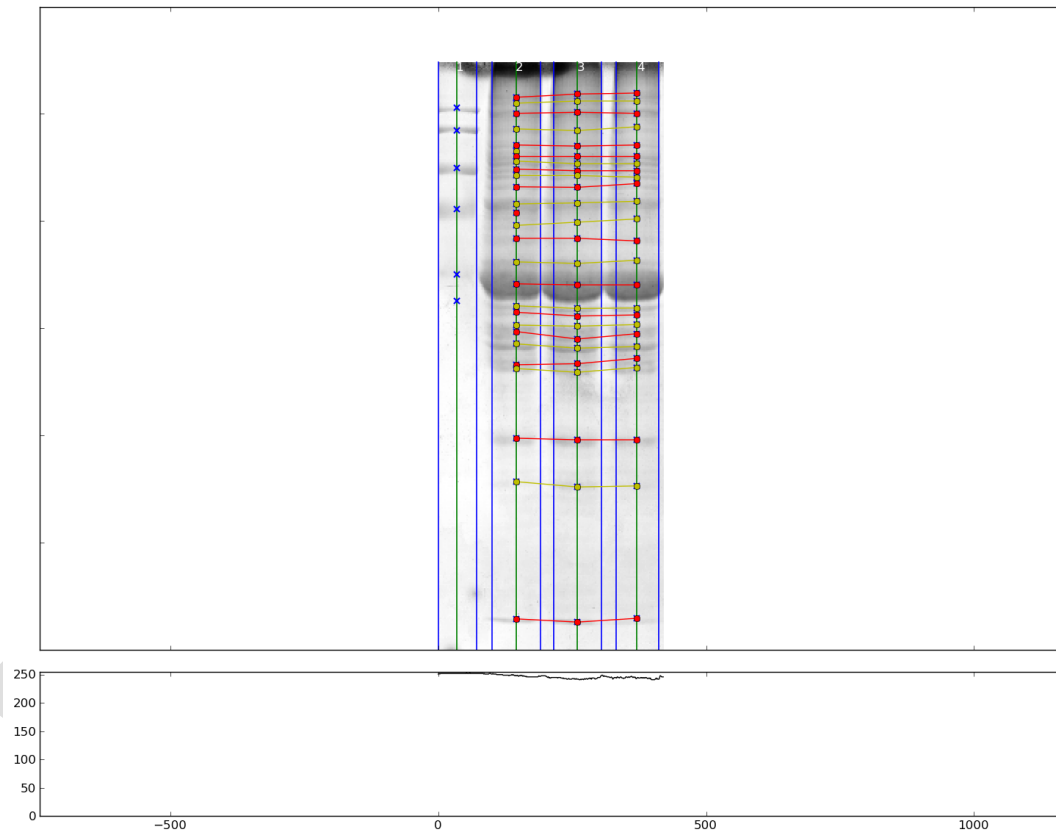
Bilgisayar ortamına aktarılan jel fotoğrafları PyElph 1.4 yazılımında analiz edilmiştir. Yazılım, jel üzerinde bantların sıralandığı şeritleri otomatik olarak tanımlamaktadır. Ancak eksik/fazla şeritler ile şerit genişlikleri elle düzeltilmiş ve kontrol edilmiştir. Daha sonra, her bir şerit üzerindeki bantlar tanımlanmış ve daha net bir

görüntü sağlayacak şekilde arka plan düzenlenmiştir. Bantların yoğunlukları (boyut ve renk yoğunluğu) yazılım tarafından hesaplanmıştır. Yanyana şeritlerdeki bantlar eşleştirilmiş ve eksik/fazla bantların pozisyonları tanımlanmıştır.

Örnekler arasındaki analizde ile olarak uzaklık matrisi inşa edilmiştir; her bir bant pozisyonu için şeritlerde mevcut olanlara karşılık "1", olmayanlar için "0" değeri verilerek oluşturulan matris; UPGMA kümeleme analizi öncesi temel teşkil etmiştir. PyElph 1.4 yazılımı, kısaca özetlenen bu prosedürü temel alarak, bir küme ağacı oluşturmaktadır.

## SONUÇ

Bant profilleri takip edildiğinde, ilk olarak, en uygun ayırma jeli konsantrasyonu %10 olarak belirlenmiştir. Bu yoğunlukta hazırlanan jellerden gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sonrası elde edilen jel görüntülerinin PyElph 1.4 yazılımı ile işlenmesiyle öncelikle bant eşleştirilmesi Şekil.1’de gösterilmiştir. Tüm kuyucuklara 50 µg protein eklenerek %10’luk ayırma jelinde gerçekleştirilen SDS-PAGE prosedürü sonrası jeller yazılım ile işlenmiştir. Şeritler ve bantlar otomatik olarak belirlendikten sonra elle eksik/fazla bantlar düzenlenmiştir. 1 nolu örnek *O. canum* tohumlarından, 1 nolu örnek *O. majorii* tohumlarından ve 1 nolu örnek *O. sirsangense* tohumlarından elde edilmiştir.



Şekil 1. PyElph 1.4 yazılımı ile elde edilen protein bant profilleri.

Daha sonra da matrislerin inşası gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.a ve Şekil 2.b).



## KAYNAKLAR

- Ahmad F and Slinkard AE (1992), "Genetic relationships in the genus *Cicer* L. As revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins", *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 84, pp. 688.
- Baytop, T., 1994. *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*. Türk Dil Kurumu Yayınları: 578.
- Bertoza MR, Valls JFM (2001). Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoi* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48(2): 121-130.
- Bewley, J.D. and M. Black. 1994. *Seeds. Physiology of development and germination*, 2nd Edn. Plenum Press, New York, 445 p.
- Brunoa, M., Maggioa, A., Rossellia, S., Safder, M., Bancheva, S. 2011. The Metabolites of the Genus *Onopordum* (Asteraceae): Chemistry and Biological Properties. *Current Organic Chemistry*, 15: 888-927.
- Danin, A., 1975. *Onopordum* L. In: Davis P.H. (ed.) *Flora of Turkey and The East Aegean Island* 5: 356-369. Edinburgh Univ. Press., Edinburgh.
- Ferguson J M and Grabe DF (1986), "Identification of cultivars of perennial rye grass by SDS-PAGE of seed proteins", *Crop Sci.*, Vol. 26, pp. 170.
- Gepts P (1990), "Genetic diversity of seed storage proteins in plants", *Plant Popul Genet, Breeding and Genet Resour*, pp. 64-82.
- Güner, A., Özhatay N., Ekim T., Başer, K.H.C., 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (Supplement). Edinb. Univ. Press, Edinburgh 11: 72-73.
- Jeffrey, C., 2007. Compositae: Introduction with key to tribes. *Families and Genera of Vascular Plants, Vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales* (Editör: Kubitzki). Springer-Verlag, Berlin. 61-87.
- Konarev, V. G., Gavriljuk, I. P. ve Gubareva, N. K., 1987, Storage proteins in the identification of species, cultivars and lines. *Seed Sci. Technol.* 15: 675-678
- Michener, C.D., Sokal, R.R. (1957): A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*, 11:490-499.
- Mukherjee M and Datta A K (2008), "Evaluation of genetic diversity in five species of *Ocimum* by SDS-PAGE", *Indian J. Genet. Plant Breed*, Vol. 68, p. 212.
- Mukhlesur R M, Hirata Y and Alam SE (2004), "Genetic variation with in *Brassica rapa* cultivars using SDS-PAGE for seed protein and isozyme analysis", *J. Biol. Sci.*, Vol. 4, No. 2, p. 239.
- Neto, C. C., Owens, C. W., Langfield, R. D., Comeau, A. B., Onge, J. S., Vaisberg, A. J. and Hammond, G. B. (2002). Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas, *J. Ethnopharmacol.*, 79: 133-138.
- Q. Cai ve M. R. Bullen, 1992, Identification of timothy cultivars by SDS-PAGE analysis of seed storage proteins, *Can. J. Plant Sci.* 72: 1215-1222
- Raymond J, Inquello V and Azanza J L (1991), "The seed protein of sunflower: comparative studies of cultivars", *Phytochemistry*, Vol. 30, p. 2849.
- Sadia, M., Malik, S. A. Rabhani, M. A. and Pearce, S. R. (2009) Electrophoretic characterization and relationship between some *Brassica* species. *Elec. J. Biol.*, 5: 1-4.
- Stoyanova S, Boller B (2010). Seed Protein Electrophoresis for Assessment of Genetic Variation within Genotypes of Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds). *Czech J. Genet. Plant Breed.* 46(Special Issue): S75-S81.
- Takac T, Pechan T, Samaj J (2011). Differential proteomics of plant development. *J. Proteomics*, 74(5): 577-588.
- Takasusuki, M. C. R., Viana, L. H. D., Baitala, T. V., Nicolin, K. C. and Toledo, V. A. A. (2006) Characterization of esterases in *Tetragonisca angustula* and *Tetragona clavipes*. *Broc. J. morphol. Sci.* 23(3-4): 431-434.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network-(GRIN)* National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?104466>. Erişim tarihi: 10 February 2013.
- Zeng., Zhongren wang., Jif., Shhijang Zhou., Jiayu Bai and Haishui Zheng. (2003) Allozyme variation and population genetic structure of *Betula alnoides* from Guangxi, China. *Biochemical Genetics.* 41: 61-75.

## Türkiye kökenli *Salmonella* serovaryetelerinde biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi ve pelikül yapılarının özelliklerinin tanımlanması

Nefise Akçelik<sup>1\*</sup>, Başar Uymaz Tezel<sup>2</sup>, Mustafa Akçelik<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup>Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Çanakkale, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: nakcelik@ankara.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada Türkiye kökenli *Salmonella* serovaryetelerinin oluşturduğu biyofilmlerin morfotipi; agar ortamlarında Kongo Red boyaması yanında, indikatör boyalar kullanılarak biyofilm yapılarında kıvrımlı fimbriya ve selülöz içerip içermedikleri de tespit edilerek tanımlanmıştır. Bu testler sonucunda denemeye alınan suşlardan *S. Virchow* DMC16 suşunun PDAR, diğer 14 suşun ise RDAR biyofilm morfolojisi içerdiği saptanmıştır. Bu çalışmalar, morfotip tanısı için literatürde genellikle önerilen agar ortamlarında Kongo Kırmızısı boyamasının tek başına yeterli olmadığını ve yanıltıcı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu nedenle çalışmamız sonucunda kıvrımlı fimbriya ve selülöz belirleme çalışmalarının morfotiplendirmede mutlaka kullanılması önerilmektedir. Diğer yandan özellikle klinik uygulamalar ve gıda endüstrisi açısından önem taşıyan pelikül oluşturma özellikleri, *Salmonella* biyofilmlerinin detaylı tanısı için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda ayrıca pelikül yapılarının tanımlanmasına esas teşkil eden; halka yapısı, pelikülün stabilitesi ve sıvı ortamda agregasyon ve sesil hücre dağılımları gibi özelliklerin belirlenmesi testleri tanımlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Salmonella*, Biyofilm, Pelikül, Morfotip, PDAR, RDAR

### Identification of biofilm morphotypes and pellicle structure characteristics of Turkey originated *Salmonella* serovarieties

#### Abstract

In this study, biofilm morphotypes formed by *Salmonella* serovarieties originated from Turkey were determined by whether they contain curli fimbria and cellulose in their biofilm structures by using indicator dyes in addition to Congo Red staining in agar media. As a result of these tests, *S. Virchow* DMC16 strain was found to contain PDAR while the other 14 strains contained RDAR biofilm morphotype. These studies have shown that only Congo Red staining, highly recommended technique in the literature, on agar medium is not adequate and gives inaccurate results for the diagnosis of biofilm morphotype. For this reason, it is recommended that the use of curli fimbria and cellulose determination tests should also be used in morphotyping. On the other hand, pellicle formation characteristics, which is especially important for clinical applications and the food industry has great importance for the detailed diagnosis of *Salmonella* biofilms. Therefore, in the present study detailed pellicle structure assessment tests such as ring structure, pellicle stability to physical forces, cell aggregation characteristics and sessile cell distribution in broth media were described.

**Keywords:** *Salmonella*, Biofilm, Pellicle, Morphotype, PDAR, RDAR

#### GİRİŞ

*Salmonella* cinsi *Enterobacteriaceae* familyasında yer almakta ve *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür içermektedir. *Salmonella enterica* subspecies *enterica*'nın altı alt türü vardır ve memeli hayvanlarda en çok hastalığa neden olan serovaryeteleri kapsamaktadır (Popff ve ark., 2001; Morigen ve ark., 2009). *Salmonella*; Gram negatif, hareketsiz, morfolojik olarak çubuk şeklinde ve fakültatif anaerob bir bakteridir (Takaya ve ark., 2003; Wattiau ve ark., 2011). Günümüzde gıda kökenli enfeksiyonların başlıca etkenlerinden biri olan *Salmonella* serovaryetelerinin temel bulaş kaynakları arasında; kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema yer almaktadır. Bunun dışında; soslar, salatalar, pudingler ve geleneksel süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında bulunmaktadır (Kim ve Wei, 2009; Xia ve ark., 2009; Kim ve ark., 2018). Biyofilm yapısındaki bakteriler genellikle çevresel stres koşullarına karşı (Ör: dezenfektanlar, antibiyotikler, kuruma, sıcaklık, tuz konsantrasyonu) oldukça dirençli olmaları nedeniyle endüstriyel yüzeylerden ve ekipmanlardan giderilmeleri zor olmaktadır. Ayrıca ısı transfer sistemlerinde biyofilm yapılarının oluşması enerji tüketimini arttırmak gibi pek çok mekanik blokaja neden olmanın yanı sıra metal yüzeylerde korozyonu hızlandırmaktadır (Zhou ve ark., 2013). Bu nedenlerden dolayı



biyofilm yapısını etkileyen faktörlerin belirlenmesi suretiyle biyofilm oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda etkin stratejilerin geliştirilmesi; başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok endüstri kolu yanında, tarımsal üretim, insan ve hayvan sağlığı ve çevre açısından da büyük önem taşımaktadır (Lee ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013).

Bir biyofilm topluluğu bir ve/veya birden fazla bakteri türünden meydana gelebilmekte ve tek tabakalı ya da üç boyutlu (3D) yapılar oluşturabilmektedir. Olgun biyofilm yapıları; metabolitler, besin maddeleri ve atıkların dağıtımına olanak sağlayacak şekilde organize olmuş su kanallarını içeren yüksek organizasyonlu ekosistemlerdir (Lee ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2013; Liaquat ve ark., 2019). Gıda endüstrisi yüzeylerinde biyofilm oluşması durumunda, burada üretimi yapılan gıdalar kontaminasyona açık hale gelmekte ve bu da söz konusu ürünlerin raf ömrünü kısaltmakta ve gıda kökenli hastalıkların yayılmasına neden olmaktadır (Kostaki ve ark., 2012). Kısaca biyofilm yapıları; endüstriyel, çevresel, halk sağlığı ve tıbbi alanlarda ciddi sorunlara neden olmaktadır (Cole ve ark., 2014; Maskimova, 2014).

Hastalık Kontrolü ve Önlenmesi Merkezleri (The Centers for Disease Control and Prevention), non-tifoidal salmonellozun birleşik devletlerde her yıl 1.4 milyon insanı etkilediği ve bu enfeksiyon vakalarının %95'inin gıda kökenli bakterilerden kaynaklandığını tahmin etmektedir. Epidemiyoloji yıllık raporuna göre, Avrupa Gıda Güvenliği uzmanlığı (EFSA) ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) işbirliği ile yapılan çalışma sonucunda Avrupa Birliğindeki gıda kaynaklı enfeksiyon hastalıklarından *Compylobacter*'den sonra 2. sırada *Salmonella* sorumlu bulunmuştur. Salmonelloz salgını; maydanoz, rezene, kavun, kereviz sapı, pastörize edilmemiş portakal suyu gibi geniş taze ürün yelpazesi ile ilişkilendirilmiştir. Bugüne dek yapılan çalışmalar bu bakterilerin oldukça farklı yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma konusunda çok güçlü olduklarını göstermiştir (Römling ve ark., 2000; Silva ve ark., 2011; Cole ve ark., 2014). Yüzeye tutunma ve biyofilm yapısının oluşumuna aracılık eden moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olmasına karşın, *agfD* promotörünün *Salmonella* sp.'nin biyofilm oluşumuna katıldığı belirlenmiştir (Römling ve ark., 2000). *agfD*'nin ifadesini kontrol eden regülasyon mekanizması konusunda bilgi sınırlı olsa da, bakterilerin gen ifadelerini sıcaklık, ozmolarite, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, nitrojen bileşenleri, besin miktarı, inorganik iyon konsantrasyonu gibi çevresel sinyallere yanıt olarak regüle ettikleri bilinmektedir. Dolayısıyla bakteri hücrelerinin tutunması; geliştikleri besin ortamı, hareketlilikleri, hücrelerin gelişme fazı, tutunacakları yüzeyin tipi ve özellikleri, organik materyallerin varlığı, sıcaklık, pH, temas süresinin uzatılması, ekstraselüler polisakkaritlerin üretimi ve hücre-hücre iletişimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Stepanovic ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2013).

*Salmonella* tarafından üretilen biyofilm yapısı temelde 2 ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; protein yapısındaki "curli" ya da "ince agregatif fimbriya" (curli, tafi, thin aggregative fimbriya) ve biyofilm yapısının ekzopolisakkarit fraksiyonunu oluşturan "selüloz" dur (Maskimova, 2014). Curli ve selülozun beraber-ekspresyonu hücrelerin oldukça kararlı bir yapı oluşturacak şekilde bir araya gelmesine neden olur. Matriks içerisinde sıkıca bir araya gelen bu hücreler, hidrofobik özelliktedir. Bu iki bileşen, hücre dışı matrikste hücrelerin sıkı bir biçimde tutunmasını ve hidrofobik bir çalışma ağı oluşturmalarını sağlamaktadır (Solano ve ark., 2002; Uğur ve ark., 2018). Agregatif fimbriyalar selülozun meydana getirdiği esnek ve kararlı bağların aksine hücreler arasında sert ve kırılabilir bağlar kurar. Biyofilm matrikslerinde ince agregatif fimbriya ve selüloz barındıran bakteriler, sıvı besiyerlerinin sıvı-hava arafazının altında, çözülmesi son derece zor olan biyofilmler oluşturmaktadır. Bakterilerin söz konusu iki bileşenle birlikte oluşturdukları biyofilmlerde, inert hidrofobik bir matriks meydana gelir. Bu durum *Salmonella*'nın tek hücreli yaşam formundan farklı olarak çok hücreli bir yaşam formu sergilemesine olanak sağlar. Yukarıda özetlenen nedenlerle biyofilm morfoloğinin belirlenmesi, biyofilmler ile mücadelede ve bu doğrultuda yürütülecek bilimsel çalışmalarda temel hareket noktasıdır. Ancak halen literatürde, morfoloğinin belirlenmesinde çok yanıltıcı sonuçlar doğuran agar ortamlarında Congo Red boyaması sonucu koloni morfolojilerinin görüntülenmesi genel bir yöntem olarak kabul görmektedir (Ausubel ve ark., 1994).

*Salmonella* biyofilmlerinin (sıvı-hava ara fazında oluşan biyofilmler pelikül olarak adlandırılmaktadır) yapısal özelliklerinin ve morfoloğilerinin tanımlanması, biyofilmlerle mücadelede en kritik noktadır. Bu nedenle çalışmamızda biyofilm yapılarının fiziksel ve biyokimyasal karakteristikleri yanında, morfoloğinin tanımlanmasında kesin sonuç verecek kriterler ve hızlı testler belirlenerek, literatürde var olan yöntemlerin kesin sonuçlar verecek kapsama ulaştırılması hedeflenmiştir.

## **MATERYAL VE METOD**

### **Bakteri Suşları**

Bu çalışmada kullanılan DMC kodlu *Salmonella* suşları Avşaroğlu ve ark. (2007) tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Planktonik kültür koşulları için *Salmonella* suşları 12 saat boyunca 37 °C'de 200 rpm/dak koşullarında üretilmiştir. Biyofilm üretimi için bakteriler, tuz içermeyen Luria Bertani (LB/NaCl<sup>-</sup>) ortamında,

statik koşullar altında 20 ° C'de üretildi. Gerektiğinde üreme ortamlarına, sırasıyla 100 µg/mL ve 25 µg/ mL'lik nihai bir konsantrasyonlara ulaşmak için ampisilin (Sigma) ve kloramfenikol (Sigma) ilave edildi.

### **Salmonella Suşlarında Biyofilm Morfotiplerinin Tanımlanması**

Denemede kullanılan suşlar stoktan alınıp LB besiyerine % 1 oranında inoküle edildi. 18 saat çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dk) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrası aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl içermeyen LB broth (LB<sup>-NaCl</sup>) ortamına aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo Kırmızısını içeren LB<sup>-NaCl</sup> agar (10 g Tripton, 5 g Maya Özütü, 0.04 g Kongo Kırmızısı, 15 g Agar, 1000 mL Distile Su, pH 7.0 ± 0.02) besiyerlerine aktif kültürlerden 5'er µL, 10'ar µL, 15'er µL ve 20'şer µL damlatıldı. Bu ortamlar 20 °C'de, 8 gün süreyle inkübasyona bırakıldı (Römling ve Rodhe, 1999). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu ortamlarda oluşturulan biyofilm yapılarının stereo mikroskop altında (Leica, Germany) fotoğrafları alındı. Suşların oluşturduğu biyofilm morfotipleri; biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran "rdar" (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran "bdar" (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran "pdar" (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulundurmeyen "saw" (düz ve ıslak) olmak üzere sınıflandırılmıştır (Vestby ve ark., 2009). Morfotiplendirmede kesin bir kanıya varmak için, biyofilm yapılarında ayrıca selülöz ve kıvrımlı fimbriya varlığının tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Selülöz varlığının belirlenmesi amacı ile suşlar; 40 µg/mL kalkoflor ilave edilmiş NaCl içermeyen LB broth ve LB agar (Merck) besiyerlerine inoküle edilmiş ve 20 °C de 9 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre bitiminde agar ortamlarında biyofilm, ve sıvı ortamlarda pelikül yapılarının incelenmesi için, Petri plakları ve tüpler 366 nm ultraviyole ışınlarına (Biyometra TI-2) maruz bırakılarak, floresans ışın fotoğrafları alınmıştır (Römling ve Rodhe, 1999).

Kıvrımlı fimbriya (curli fimbria) varlığının belirlenmesi amacı ile ise, 5 mL M63 ortamına [(13.6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g FeSO<sub>4</sub>, 1 mL KOH(6.8 M), 0.2 g MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mg Vitamin B1, 20 mL Mannitol (% 10) ve 1000 mL Distile Su] inoküle edilen bakteriler, statik koşullarda OD<sub>600</sub>=1 olacak düzeye ulaşıncaya kadar geliştirilmiş (20 °C) ve bu süre bitiminde 5000 rpm de 1 dk santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürülmüştür. Bu işlem 1.5 mL lik mikrosantrifüj tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra bakteri çökeltisi üzerine 1.5 mL Kongo red çözeltisi ilave edilerek 20 °C de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre bitiminde 5000 rpm de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutulan ortamlardan üst sıvı dökülmüş ve çökelti fotoğraflanmıştır (Reichardt ve ark., 2015). Tüm çalışmalar 2 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

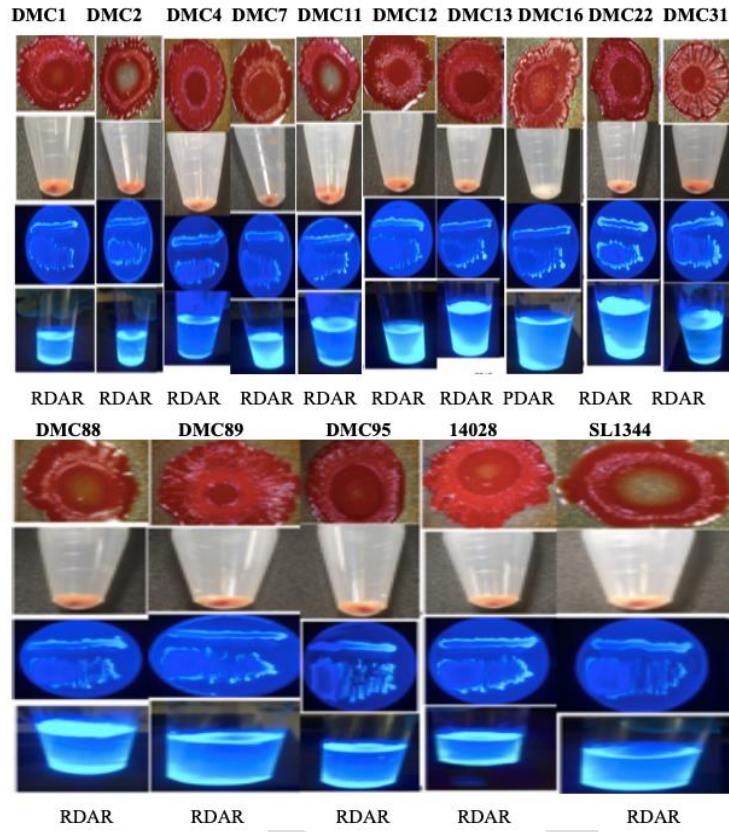
### **Sıvı ortamlarda pelikül oluşumunun tanımlanması**

Tüm pelikül yapısının incelendiği denemelerde, *Salmonella* suşlarının aktif kültürlerinden 0,5 mL alınarak 4,5 mL LB<sup>-NaCl</sup> broth ortamına inoküle edilmiş ve 20 °C'de 8 gün (pelikül üretimi için optimum süre ve sıcaklık) inkübasyona bırakılmıştır. Suşların pelikül oluşumu her gün sıvı hava ara fazında halka yapısı oluşumu, yapısı, oluşan pelikülün karıştırma işlemine karşı direnci, besiyerinde planktonik hücrelerin varlığının indikatörü olan bulanıklık ve tüplerin tabanında hücre birikimi esas alınarak incelenmiştir (Solano ve ark., 2005).

## **BULGULAR**

### **Doğal suşlar ve onların *dam* ve *seqA* mutantlarının biyofilm morfotipleri**

Doğal *Salmonella* suşları ve onların *dam* ve *seqA* genleri arasına kloramfenikol gen kaseti insersiyonu yolu ile oluşturulan mutantlarında biyofilm morfotiplerinin tanısı amacı ile Kongo Red içeren LB<sup>-NaCl</sup> agar ortamlarında oluşturulan kolonilerin mikroskopik incelemeleri yanında; biyofilm yapısında selülöz ve kıvrımlı fimbriya üretimleri, indikatör boyalar kullanılarak ayrıca agar ve broth ortamlarında tanımlanmıştır. Tüm bu testlerde görülen uyum dikkate alınarak, doğal suş ve mutanlarda nihai morfotiplendirme gerçekleştirilmiştir. Doğal suşlar içerisinde sadece *S. Virchow* DMC16 biyofilmi PDAR (pembe, kuru ve pürüzlü), diğer suşların tamamının (*S. Group* C1 DMC1 ve DMC2, *S. Typhimurium* DMC4, DMC95, 14028 ve SL1344, *S. Infantis* DMC7 ve DMC12, *S. Virchow* DMC11 ve DMC16, *S. Rogueform* DMC13, *S. Enteritidis* DMC22 ve DMC31, *S. Montevideo* DMC88 ve DMC89) biyofilm morfotipi ise RDAR (kırmızı, kuru ve pürüzlü) olarak tanımlanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. *Salmonella* suşlarında biyofilm morfolojileri

#### Doğal Suşların Pelikül Oluşturma Özellikleri

Sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma özellikleri incelendiğinde, *S. Montevideo* DMC89 suşu hariç çalışmada kullanılan tüm serovaryetelerde ve bunlara ait farklı suşlarda sıvı-hava ara fazında pelikül yapılarının oluşturulduğu saptanmıştır. Test edilen örneklerden *S. Typhimurium* SL1344, *S. Infantis* DMC7 ve DMC12 ile *S. Montevideo* DMC88 kolay dağılma özelliğinde, diğerlerine nazaran daha dayanıksız pelikül yapıları meydana getirmiştir. Sıvı besiyerinde bulanıklık ve üreme tüpleri tabanında hücre agregasyonu pelikül karakteristiklerine uygun olarak düşük ve orta seviyelerde (+ ya da ++) saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. *Salmonella* suşlarının pelikül oluşturma özellikleri

Suş Kodu	Pelikül Halka Yapısı	Pelikül Yapısı	Besiyerinde Bulanıklık	Hücre Çökeltisi
14028	Var	Var (Sert)	+	++
SL1344	Var	Var (Kırılgan)	+	++
DMC1	Var	Var (Sert)	+	+
DMC2	Var	Var (Sert)	+	+
DMC4	Var	Var (Sert)	+	++
DMC7	Var	Var (Kırılgan)	+	++
DMC11	Var	Var (Sert)	+	+
DMC12	Var	Var (Kırılgan)	+	++
DMC13	Var	Var (Sert)	+	++
DMC16	Var	Var (Sert)	+	++
DMC22	Var	Var (Sert)	+	++
DMC31	Var	Var (Sert)	+	++
DMC88	Var	Var (Kırılgan)	+	+
DMC89	Yok	Yok	+	+
DMC95	Var	Var (Sert)	+	++

## TARTIŞMA

*Salmonella* suşlarında biyofilm morfolojileri, Kongo Kırmızısı içeren agar ortamlarında; biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulandırmayan saw (düz ve ıslak) olarak tanımlanmaktadır (Römling ve Rodhe, 1999; Jonas ve ark., 2007). Ancak; bu ortamların bileşimi, iç ve dış çevresel etkilerle genetik regülasyon karakteristiklerinde ve buna bağlı olarak gen ifadesinde meydana gelebilecek değişimler, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı, optimum biyofilm üretim zamanı, kullanılan mikroskopların ışık kalitesi, pozlama süresi gibi birçok etken, söz konusu biyofilm morfolojilerinin ve agar üzerinde gelişen biyofilm yapılarının fenotipik incelemeler sonucu kesin olarak tanımlanmasında yanılığlara yol açmaktadır (Løbner-Olesen ve ark., 2005; Grancharova ve ark., 2010; Monteiro ve ark., 2011; Li ve ark., 2014; Lamas ve ark., 2016). Bu nedenle, Kongo Kırmızısı içeren agar ortamlarında yaptığımız morfolojilerimize çalışmalarını kesinleştirmek için, ayrıca biyofilm yapılarının (agar ve broth ortamlarında) selüloz ve kıvrımlı fimbriya içerikleri de ayrı ayrı belirlenmiştir. Agar ve broth ortamlarında (LB agar ve LB broth) kalkoflor bağlanma denemeleri selülöz, Kongo Kırmızısı bağlanma denemeleri de kıvrımlı (curli) fimbriya varlığının kesin kanıtları olarak kullanılmak suretiyle, çalışmamızda kullanılan doğal ve mutant suşların biyofilm morfolojilerinin kesin tanısı gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde yalnız Kongo Kırmızısı içeren LB agar üzerinde geliştirilen biyofilm yapılarının mikroskopik incelemelerine dayanan morfolojilerinin önemli yanılığlara yol açtığı açıkça görülmüştür. Bu nedenle, doğrudan biyofilmin selülöz ve kıvrımlı fimbriya içeriğinin belirlenmesini hedef alan yöntemler mutlaka morfolojilerimizde destekleyici kanıtlar olarak kullanılmalıdır (Li ve ark., 2014; Abdelwaheb ve ark., 2015; Armbruster ve Parsek, 2018).

Doğal *Salmonella* suşlarının sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturma özellikleri, genelde hakim oldukları RDAR morfolojilerinin karakteristiklerini göstermiştir. Bu durum söz konusu yapıların gıda endüstrisinde sadece katı gıdalar için değil, sıvı gıda ve içecekler için de ciddi bir sorun oluşturabileceğine işaret etmektedir. Diğer yandan suşların bu özellikleri klinik açıdan özellikle kataterler ve deri geçişli implantlar için büyük bir önem taşımaktadır (Li ve ark., 2014; Lamas ve ark., 2016).

## SONUÇ

Araştırma bulgularımız, gıda ve sağlık alanlarında Temel mikrobiyolojik risk kaynaklarından birini oluşturan *Salmonella* serovaryetelerinde biyofilm ve pelikül yapılarının detaylı ve kesin tanısının literatür verilerinde genel geçer kriterlerle belirlenmesinin önemli yanılığlara yol açtığını göstermiştir. Bu nedenle kesin tanıya yönelik ilave testler tanımlanmış ve hızlı bir tanı şeması geliştirilmiştir. Bu özelliği ile çalışma bulgularımız, *Salmonella* biyofilmleri ile mücadelede doğru bir stratejinin oluşturulmasında ciddi bir destek sağlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 215Z087).

## KAYNAKLAR

- Abdelwaheb C, Lobna M, Bouchra M, Bouchra BA, Ahmed SK 2015. Fatty acids composition and biofilm production of attenuated *Salmonella typhimurium* dam and *seqA* mutants after exposure to UV-C. *Current Microbiology*, 71: 741–745.
- Armbruster CR, Parsek MR 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115: 4317-4319.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: John Wiley and Sons.
- Avşaroğlu MD, Helmuth R, Junker E, Hertwig S, Schroeter A, Akçelik M, Bozoğlu F, Guerra B 2007. Plasmid mediated quinolone resistance conferred by *qnrS1* in *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated from Turkish food of avian origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 1146–1150.
- Cole JK, Hutchison JR, Renslow R, Kim YM, Chrisler W, Engelmann H 2014. Phototrophic biofilm assembly in microbial-mat-derived unicyanobacterial consortia: Model systems for the study of autotroph-heterotroph interactions. *Frontiers in Microbiology*, 5: 109-114.
- Grancharova N, Peters V, Monteiro C, Zakinkhany K, Römling U 2010. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 192: 456-466.
- Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova LM, Melefors Ö 2007. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, 7: 70-77.
- Kim SH, Wei CL 2009. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 72: 1841-1847.

- Kim SJ, Chang J, Rimal B, Yang H, Schaefer J 2018. Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1860: 749-756.
- Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas GJ, Giaouris E 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 2586-2595.
- Lamas A, Fernandez IC, Miranda JM, Vasquez B, Capeda A, Franco C 2016. Biofilm formation and morphotypes of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* differs from those of other *Salmonella enterica* subspecies in isolates from poultry houses. *Journal of Food Protection*, 7: 1127-1134.
- Lee K, Periasamy KWK, Mukherjee M, Kjelleberg S, Rice SA 2013. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed species community biofilm. *The ISME Journal*, 8: 894-907.
- Li Z, Niu H, Wu S, Huang R 2014. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerging Microbes And Infections*, 23: 722-729.
- Liaqat I, Liaqat M, Ali S, Haneef U, Mirza SA, Tahir HM 2019. Biofilm formation, maturation and prevention: a review. *Journal of Bacteriology and Virology*, 6: 1-4.
- Løbner-Olesen A, Skovgaard O, Marinus MG 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 154-160.
- Maksimova YG 2014. Microbial biofilms in biotechnological processes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50: 750-760.
- Monteiro C, Fang X, Ahmad I, Römling U 2011. Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover. *Journal of Bacteriology*, 193: 6443-6451.
- Morigen M, Odsbu I, Skarstad K 2009. Growth rate dependent numbers of SeqA structures organize the multiple replication forks in rapidly growing *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 14: 643-57.
- Popff MY, Bockemühl J, Gheesling LL 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*, 154: 173–174.
- Reichardt C, Jacobson AN, Maher MC, Uang J, McCrate O, Eckart M, Cegelski L 2015. Congo red interactions with curli producing *E. coli* and native curli amyloid fiber. *PLOS One*, 20: 1-10.
- Römling U, Rohde M 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, 180: 91-102.
- Römling U, Rohde M, Olsén A 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella* typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36:10–23.
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in Microbiology*. 2: 114-119.
- Solano C, García B, Geale G, Lasa I 2005. Genetic diversity of *Salmonella* biofilms, *Molecular Cell Biology*. 47: 234-239.
- Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J, Gamazo C, Lasa I 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43: 793-808.
- Stepanovic S, Irkovi I, Ranin L, Svabi-Vlahovi M 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 428–432.
- Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Yamamoto NA 2003. Lon, a stress-induced ATPdependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infection and Immunity*, 71: 690–696.
- Uğur S, Akçelik N, Yüksel FN, Karatuğ NT, Akçelik M 2018. Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Pathogens and Global Health*, 112: 368-377.
- Vestby LK, Møretrø T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5: 20.
- Wattiau P, Boland C, Bertrand S 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7877–7885.
- Xia X, Zhao S, Smith A, McEvoy J, Meng J, Bhagwat AA 2009. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 93-98.
- Zhou Y, Smith DR, Hufnagel DA, Chapman M 2013. Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli. *Methods in Molecular Biology*, 966: 53-75.

## DNA metilasyonu ve tecridinin (sequestration) *Salmonella* serovaryetelerinde biyofilm üretimi ve virülanslık üzerine etkisi

Nefise Akçelik<sup>1\*</sup>, Pınar Şanlıbaba<sup>2</sup>, Mustafa Akçelik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: nakcelik@ankara.edu.tr

### Özet

*Salmonella* biyofilmleri, özellikle gıda endüstrisi ve sağlık alanında ciddi sorunlara neden olmaktadır. Biyofilm yapılarının çevresel stres faktörlerine karşı planktonik formlardan çok daha yüksek dirençlilik özelliklerine sahip olması, bu yapılarla mücadeleyi çok zorlaştırmaktadır. Sürekli kontaminasyonların ve inatçı enfeksiyonların kaynağını teşkil eden biyofilm formları ile etkin mücadele biçimleri, bu yapıların regülatör sistemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu sistemlerin tanımlanması sayesinde alternatif mücadele ajanlarının geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bu alternatif yaklaşımlardan biri de DNA metilasyonu ve tecridinde rol alan regülatörlerin biyofilm yapılarındaki etkinliğinin belirlenmesidir. Bu derleme makalede, bu alanda yürütülen son çalışmalar özetlenerek konunun öneminin vurgulanması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Salmonella*, Biyofilm, Dam, SeqA, Regülasyon

### The effect of DNA methylation and sequestration on biofilm production and virulence of *Salmonella* serovarieties

#### Abstract

*Salmonella* biofilms cause serious problems, especially in the food industry and public health concern. The fact that biofilm structures have much higher resistance to environmental stress factors than their planktonic forms makes it more difficult to struggle with these structures. The effective struggle methods to combat with biofilm structure, the main source of continuous contaminations and persistent infections, focus on regulatory systems. With the identification of these systems, it would be possible to develop alternative antibiofilm agents. One of these trends is to determine the effectiveness of regulators involved in DNA methylation. In this review article, it is tried to emphasize the importance of the subject by summarizing the recent studies in this field. In this review we aimed to emphasize the importance of the subject by summarizing the recent studies conducted in this field.

**Keywords:** *Salmonella*, Biofilm, Dam, SeqA, Regulation

#### GİRİŞ

Bakterilerin alt popülasyonlarında yapısal ve fizyolojik özelliklerin, çoğunlukla epigenetik mekanizmalar (DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan gen ifadesi değişiklikleri) tarafından kontrol edildiği bilinmektedir. Bu doğrultuda yürütülen çalışmalar, biyofilm yapısının da epigenetik düzenlenmelerin kontrolünde olduğuna işaret etmiştir (Dubnau ve Losick, 2006; Casadesús ve Low, 2013; Rumbo-Feal ve ark., 2013). Epigenetik mekanizmaların oluşumunda rol oynayan önemli bir enzim grubu, DNA metilazlardır. DNA adenin metiltransferaz (Dam) enzimi, *S. Enterica*'nın da dahil olduğu pek çok bakterinin virülens genlerinin ifadesi için gerekli olan 5'GATC3' dizisinde bulunan Adenin'i N-6 bölgesinden metillemektedir (Balbontin ve ark., 2006; Rumbo-Feal ve ark., 2013). Bu bakteride biyofilm üretiminin regülasyonu oldukça karmaşık bir sistemdir ve *csgDEFG* operonuna RpoS, OmpR, H-NS, CpxR, I-HF ve MlrA gibi çeşitli regülatör proteinlerin bağlanmasına ihtiyaç duyar (Gerstel ve Römling, 2001; Davidson ve ark., 2008). Bu operonda yer alan ilk gen olan *csgD*, *Salmonella* biyofilm yapısında kıvrımlı fimbriya (curli) ve selülozun da dahil olduğu pek çok bileşenin üretimini düzenlemektedir (Gerstel ve Römling, 2001; Davidson ve ark., 2008; Zakikhany ve ark., 2010).

Dam metilasyonu 5'GATC3' tanıma dizilerindeki adeninin 6. pozisyonunda gerçekleştirilir. Dam metil transferaz enzimi, diğer metil transferazlar gibi, S-adenozin metionini metil grubu vericisi olarak kullanır. DNA metilasyonu bakterilerde; gen regülasyonu, transpozisyon, DNA replikasyonunun zamanının belirlenmesi, eşlenen DNA'nın yavru hücrelere dağılımı, replike edilen orijin bölgelerin tecridi (sequestration) ve DNA eşlenmesinden kaynaklanan hataların tamirinde rol oynamaktadır (Heithoff ve ark., 1999; Davidson ve ark., 2008). DNA replikasyonundan sonra Dam metilasyonunun başlamasını ve dolayısı ile DNA

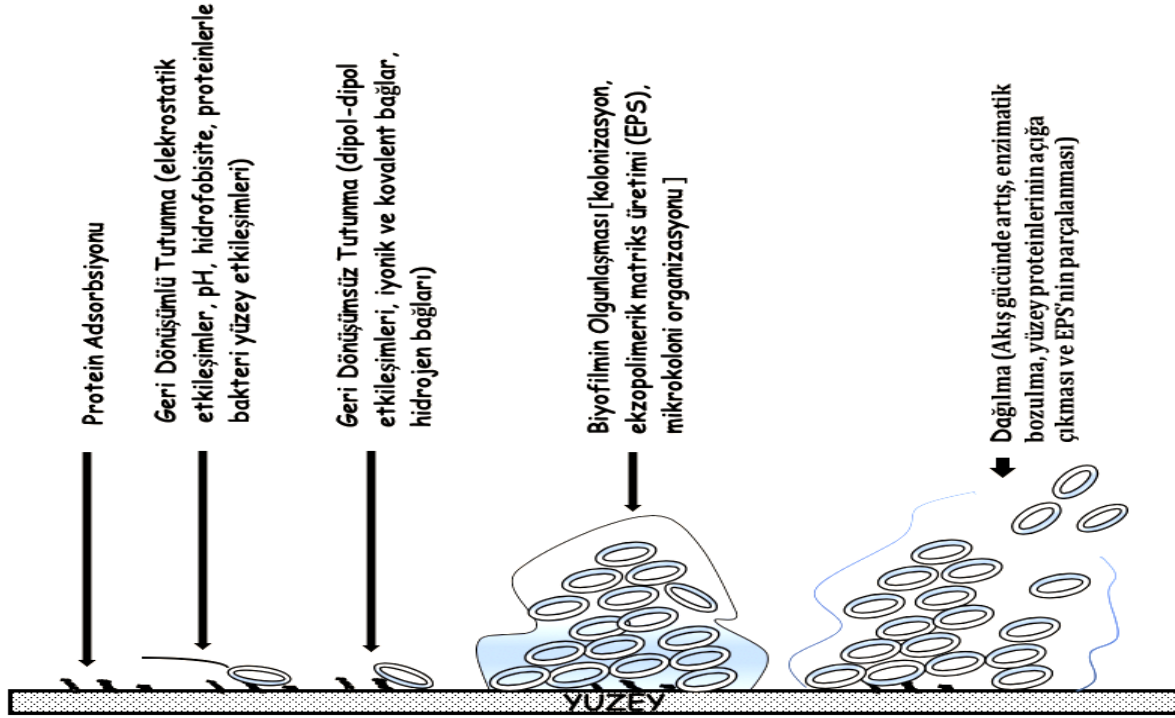
replikasyonunun başlama zamanını regüle eden bir diğer protein ise SeqA proteindir. Dam enzimlerine göre daha yakın bir zamanda tanımlanan bu protein, replikasyon orijininden replikasyonun başlamasından hemen sonra üretilen hemimetillenmiş DNA çift zincirlerine spesifik olarak bağlanır ve Dam metil transferaz enziminin bağlanmasını engellemek suretiyle, eşlenen replikasyon orijinlerinden yeniden replikasyonun başlamasını, hücre döngüsünün 1/3'ü oranında durdurur. Bu süre sonunda hedef serilerden ayrılarak dam metil transferazın bağlanmasına ve metilasyonunun tamamlanmasına olanak sağlar. Bu sayede replikasyonel hata tamiri ve eşlenen kromozomların segregasyonel stabilitesi garanti altına alınır (Jakomin ve ark., 2008). SeqA proteini, dam metil transferazdan farklı olan bu aktivitelerini, dam metil transferazın da hedef serisi olan, 5'GATC3' tanıma dizilerine bağlanarak gösterir. SeqA regülatör proteini, hemimetillenmiş 5'GATC3' dizilerine dam metil transferazdan daha yüksek bir ilgi ile bağlandığından, replikasyonun erken aşamalarında dam metilaz bağlanmasını inhibe ederek, replikasyonun başlamasının regülasyonunu gerçekleştirir. Ayrıca; SeqA proteininin, değişik genlerin transkripsiyonel regülasyonuna katıldığı da saptanmıştır. SeqA'nın sadece hemimetillenmiş DNA dizilerine değil, aynı zamanda her iki zinciri de metillenmiş tanıma dizilerine bağlanma aktivitesi göstermesi, söz konusu proteinin genetik regülasyon kapasitesinin dam metil transferazlardan daha yüksek olabileceğine işaret etmektedir (Jakomin ve ark., 2008; Chatti ve ark., 2014). SeqA proteininin transkripsiyonel regülasyon aktivitesini; bağlanma bölgelerinde süperkangal dönüşleri artırarak ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma etkinliğini değiştirerek sağladığı saptanmıştır (Jakomin ve ark., 2008). Son yıllarda yürütülen çalışmalarda SeqA proteini üretimi engellenmiş *Salmonella* mutantlarında virülensliğin önemli ölçüde düştüğünün, membran fosfolipitlerinin yapısal değişime uğradığının ve fimbriyal genlerin faz varyasyonunun (*papI* ve *papB*) regülasyonuna katıldığıının belirlenmesi, *seqA* geninin potansiyel bir global transkripsiyonel regülatör olarak önemini artırmıştır (Løbner-Olesen ve ark. 2005; Aloui ve ark., 2010; Chatti ve ark., 2014).

### **Bakteriyel Biyofilm Yapıları**

Biyofilm, birbirine tutunan mikroorganizmaların, kendi ürettiği hücre dışı polimerik madde (EPS) tarafından çevrenmesi sonucu meydana gelen, canlı veya inert bir yüzeye bağlı yapılandırılmış bir konsorsiyum olarak tanımlanabilir. Biyofilmler; içerdikleri tür çeşitliliği ve kombinasyonlarına göre değişmekle birlikte, % 10-25 hücre ve % 75-90 EPS içerir (Flemming ve Wingender, 2010). Bu, EPS'nin hücreleri bir arada tutan yapışkan bir maddeden çok daha fazla fonksiyona sahip olduğunun en açık göstergesidir. Nitekim EPS'nin, biyofilm topluluğunu oluşturan hücrelere; antibiyotik direnci, hücre dışı enzimlerin depolanması, besin yakalama ve depolama, gradyan oluşumu ve çevresel stres faktörlerinden korunma gibi tek hücrelerin (planktonik) içermediği, zorlu koşullarda yaşamda kalma anlamında büyük önem taşıyan ve yarışmacı flora karşı ekosistem hakimiyetine destek veren bir dizi özellik kazandırdığı belirlenmiştir (Flemming ve ark., 2016). Özellikle omik teknolojilerinde, moleküler biyolojide ve bilgisayar teknolojisindeki muazzam gelişmeler, biyofilm araştırmalarında devrim yaratmıştır. Bakterilerin monokültürünün incelenmesi ve manipüle edilmesi kolay olmasına rağmen, hiçbir habitatın sadece tek bir bakteriyel tür tarafından işgal edilmediği gerçeği, biyofilmlerle çalışmanın önemini vurgulamaktadır. Farklı mikroorganizma türlerinin tüm habitatlarda istikrarlı topluluklar oluşturmak için aralarında çeşitli etkileşim ve iletişim biçimleri kurduğu bilinmektedir. Tüm bu belirlemeler; biyofilmlerin yapısının, oluşumunun ve regülasyon mekanizmalarının araştırılmasını beraberinde getirmiştir. Araştırmacılar, örneğin, birden fazla türden oluşan biyofilmlerin, tek türden oluşan biyofilmlere oranla daha kararlı olduğunu ve daha düşük düzeyde besin gereksinimi gösterdiğini saptamıştır (Burmolle ve ark., 2006; Ren ve ark., 2015). Bu durumun ayrıca; dezenfektanlara, antimikrobiyal maddelere ve predasyona karşı da toleransı artırdığı belirlenmiştir. Biyofilm, monofilmler olarak da adlandırılan tek bir bakteri türü tarafından oluşturulabildiği gibi çeşitli bakteri türlerinden de meydana getirilebilir (multifilmler). Monofilmler, istenen bir ürünün artan verimi ve kalitesi için gerekli süreçleri kontrol etmede endüstriyel anlamda önem taşır. Diğer yandan multifilmler biyogaz üretimi ve farmasötik formülasyonların çok kademeli süreçleri için daha kullanışlıdır (Maksimova, 2014).

Biyofilm oluşumu genel olarak çok aşamalı bir süreçtir. İlk aşama, biyotik veya abiyotik yüzeylere bakteriyel bağlanma sürecidir. Bu süreç geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma olmak üzere iki evrede incelenmektedir. Geri dönüşümlü tutunmada bakteri hücresi biyotik ve abiyotik yüzeye çok yakın olmakla birlikte kararlı fiziksel temas henüz sağlanmadığı aşamadır. Bu süreçte elektrostatik güçler yanında yüzey pH'sı, besin konsantrasyonu, sıcaklık ve hidrofobisite etkin rol oynar. Tutunmanın ikinci evresi olan geri dönüşümsüz tutunmada; dipol-dipol etkileşimleri, iyonik ve kovalent bağlar, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları kritik rol oynamaktadır. Geri dönüşümsüz tutunmadan sonra, yüzeye tutunan bakteriler bölünerek mikrokoloniler oluşturur. Bir biyofilm yapısında yüzeye farklı bölgelerden tutunan bakteri sayısına bağlı olarak çok sayıda mikrokoloni üretilebilir. Daha sonra bağlı hücreler olgunlaşır ve mikrokolonileri oluşturan hücreler tarafından üretilen hücre dışı polimerik madde (EPS) içine alınır. Bu EPS üç boyutlu mimari yapının oluşumundan ve biyofilmlerin stabilizasyonundan sorumludur. EPS içerisindeki mikrokoloniler

arasında, üç boyutlu formda, besin ve atık iletiminde görev yapan su kanalları ve ilkel bir boşaltım sistemi ağı meydana gelir. Olgunlaşmasını tamamlayan biyofilmler son aşamada dağılma sürecine girer. Bu evrede enzimatik süreçlerin bozulması ve diğer fiziksel ve kimyasal etmenlere bağlı olarak matriks bütünlüğünün bozulması ve planktonik hücrelerin biofilm matriksinden ayrılması söz konusudur (Kim ve ark., 2018) (Şekil 1). Bugüne kadar elde edilen bilgiler ışığında, mikrokoloni oluşumu için bakterilerin genellikle çevresel sinyaller, flagella, dış membran proteinleri, pili veya lipopolisakaritleri (LPS) birlikte kullandığı ve biyofilm olgunlaşmasında ise QS moleküllerinin etkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte; biyofilm oluşumu sırasında yüzeyin bakteriler tarafından algılanmasına ve biyofilm oluşum aşamalarında rol alan genetik ve biyokimyasal mekanizmalarla ilgili birçok soru halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Armbruster ve Parsek, 2018).



Şekil 1. Bakteriyel biyofilmlerin temel oluşum, olgunlaşma ve dağılma süreçleri

Özetle biyofilmler günümüzde insan sağlığı ve farklı endüstriyel süreçler için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Biyofilm ile ilgili endüstriyel problemleri gidermeye ya da biyofilmlerin neden oldukları hastalıkları çözmeye yönelik stratejilerin geliştirilmesi yerine, biyofilm oluşumunu önleyebilen yaklaşımların bulunması daha avantajlıdır. Bunun için, bakterilerin farklı ortamlarda nasıl hareket ettiğinin, biyotik ve abiyotik yüzeylere nasıl bağlandığının ve ne tür etkileşimlerde bulunduğunu anlamak, karmaşık biyofilm sistemlerinin genetik ve fizyolojik kontrolünü esas alan yeni yaklaşımlar önerilmektedir.

#### **Salmonella Biyofilmlerinin Özellikleri ve Önemi**

Son yıllarda, salmonelloz salgınlarının kontamine bitki kaynaklarına kadar izlenmesi, genel bir önleme stratejisinin geliştirilmesi açısından bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu çalışmalar neticesinde, bitki yüzeylerinin *Salmonella* kontaminasyonu için çok uygun olmadığı, ancak *Salmonella*'nın spesifik yüzey proteinlerini kullanarak bitkisel dokulara tutunabilme yeteneğinden dolayı, mümkün olabildiği saptanmıştır. *Salmonella*, bitkilerde tutunma ve kolonizasyon için ince agregatif fimbriya ve polimerler (selüloz ve o-antijen kapsülleri) gibi hücre dışı matris bileşenlerini kullanır ve tutunma sonrasında burada biyofilm yapısı oluşturarak enfeksiyon kaynağı haline gelir (Barak ve ark., 2002). *Salmonella*'nın bitki yüzeylerine genellikle biyofilm oluşumu ile sonuçlanan bir tutunma gerçekleştirdiğinin tanımlanması, tüketimden önce sebzeleri temizlemenin bugüne kadar bilinen konseptinin değişmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Zira basit bir şekilde su ile durulama, bakteriyel planktonik formların temizlenmesi için yeterli olabilir iken, biyofilm formlarına karşı tamamen etkisiz bir uygulamadır.

Iturriaga ve ark., (2007) seralarda domateslerin üretimi veya hasat sonrası taşıma sırasında, yüksek nem varlığının meyve yüzeyinde biyofilm gelişimini teşvik ettiğini saptamıştır. Bu biyofilmler patojenler için koruyucu bir ortam sağlar ve tüketimden önce meyveyi temizlemek için kullanılan dezenfektanların ve diğer inhibitör ajanların etkinliğini azaltır. *S. enterica* serovar Montevideo'nun, dış besin maddeleri yetersiz olsa bile, çok çeşitli sıcaklık ve bağıl nem kombinasyonları altında domates yüzeylerinde yaşamda kaldığı ve



ürediği gösterilmiştir. Bu bulgular, *Salmonella* biyofilm gelişiminin insidansını azaltmak için, meyve ve sebzelerin uygun depolama koşulları altında korunmasının önemini açıkça ifade etmektedir.

Patel ve Sharma (2010) beş *S. enterica* serovaryetelerinin sağlam ve kesilmiş marul (iceberg, Romanya) ve lahana yüzeylerine bağlanma ve kolonize olma yeteneğini araştırdıkları çalışmalarında, biyofilm oluşumunun serovaryeteye bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterdiğini tespit etmiştir. Genel olarak, Tennessee ve Thompson serovaryetelerinin, Braenderup, Negev ve Newport'tan önemli ölçüde daha fazla biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Stepanovic ve ark., (2004) tarafından belirlenen kriterleri kullanarak güçlü biyofilm üreticisi oldukları belirlenen Tennessee ve Thompson serovaryetelerinin, diğerlerine oranla bitki yüzeylerinde üreme ve kalıcılık yeteneğinin daha yüksek bulunması, araştırmacıların güçlü biyofilm üreticileri ile kontamine bitkilerin daha riskli *Salmonella* enfeksiyon kaynakları olduğu görüşünü desteklemektedir.

Bhowmick ve ark., (2011), çalışmalarında *S. enterica* serovar Weltevreden deniz izolatlarında biyofilm oluşumunda etkin alternatif bir düzenleyici yolun varlığını tanımlamıştır. Bu bakteri, deniz ürünleriyle ilişkili en yaygın *Salmonella* serovaryetesidir. Bu serovaryetenin neden olduğu hastalık, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde nadir olmakla birlikte, Asya'da sıklıkla belirlenmektedir. *S. enterica* serovar Typhimurium'da *gcpA* geni, özellikle düşük besin koşullarında gerçekleşen biyofilm oluşumunda kritik bir rol oynamaktadır. Araştırmacılar, *S. enterica* serovar Weltevreden'de de *gcpA* geninin delesyonunun, selüloz üretiminin ve polistiren substrat üzerinde biyofilm oluşumunun engellenmesi ile sonuçlandığını belirlemiştir. Bu bulgu, *S. enterica* serovar Weltevreden'de, *gcpA* 'nın selüloz sentezi ve biyofilm oluşumunu aktive etmek için kritik olduğuna işaret etmektedir. Biyofilm oluşumunda yer alan genlerin karakterizasyonu, belirli ortamlarda biyofilmlerin gelişimini kontrol etmek veya ortadan kaldırmak için yürütülen uygulamalarda kritik kontrol noktalarını tanımlamaya yardımcı olacak temel bilgi kaynaklarını oluşturması açısından ciddi bir değer taşımaktadır.

Küçük RNA'lar (sRNA), bakteriler tarafından üretilen ve 50-250 nükleotit uzunluğunda olabilen kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Kint ve ark., (2010) çalışmalarında, biyofilm oluşumunun çeşitli *S. enterica* serovar Typhimurium mutantlarında sRNA moleküllerinin üretiminden etkilendiğini saptamıştır. sRNA, yeter sayı algılama sistemi (QS) sintazı LuxS ile aynı bölgede kodlanmaktadır. QS bakterilerde lokal popülasyon yoğunluğu tarafından stimüle edilen koordineli gen ifade yanıtının oluşturulmasından sorumlu bir regülasyon sistemidir. Otoindükleyici-2 (AI-2), bakterilerde de yaygın olan evrensel bir sinyal molekülü olarak kabul edilmektedir. AI-2 sentezi için LuxS enzimi gereklidir. QS sistemleri, *Salmonella*'da biyofilm oluşumunda ve konakçı sistemde hayatta kalmada önemli bir rol oynamaktadır. MicA, bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinde yüksek düzeyde korunmuş küçük RNA moleküllerinin bir ailesidir. Bu küçük RNA ailesi üyelerinin, birçok bakteri türünde biyofilm oluşumu için gerekli düzenleyici bir mekanizma olduğu ve dengeli ifade seviyesini ayarlayarak olgun *Salmonella* biyofilmlerinin gelişimi için kritik bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bhowmick ve ark., 2011).

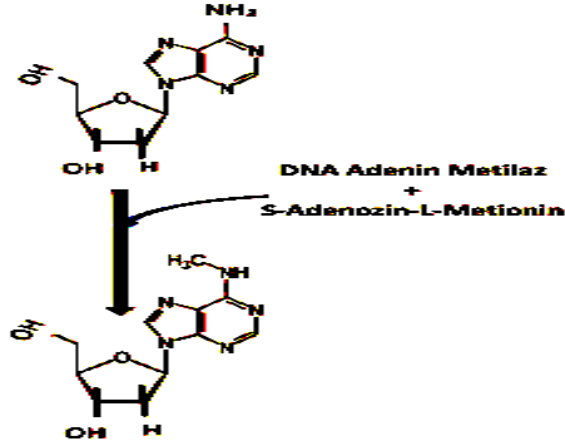
*S. enterica* serovar Typhimurium'un insandan insana bulaşma özelliği, onu küresel bir patojen yapan ana özelliklerinden biridir. Bu serovarin rastgele transpozon mutantları kolesterol kaplı yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma özellikleri bakımından incelendiğinde; bu özellikleri taşıyan 49 mutant tanımlanmıştır. Bu mutantlarla yürütülen çalışmada flagella biosentezinde rol alan genlerin ve flagella yapısının öncelikle kolesterole bağlanmaya aracılık ettiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak, flagellar filamentin safra tuzlarına bağlanma ve biyofilm oluşumunu teşvik etmede anahtar rol oynadığı da bu çalışmada tanımlanmıştır. Biyofilm oluşumunun erken aşamaları çalışılarak elde edilen bu bulgular, biyofilm yapılarının daha iyi anlaşılması ve güçlü mücadele ajanlarının geliştirilmesi açısından kilometre taşlarıdır (Jennings ve ark., 2011).

#### **Dam ve SeqA Proteinlerinin Genel Aktivite Özellikleri**

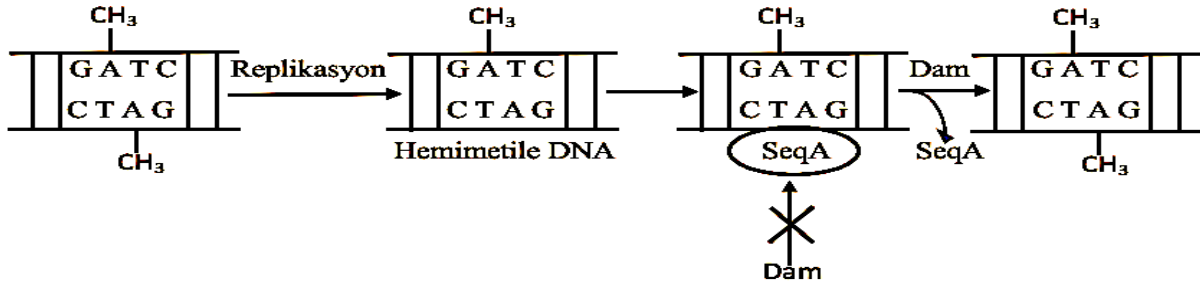
*Escherichia coli*'de *dam* geni DNA adenin metil transferaz enzimini kodlar. Bu enzim, çift zincir DNA molekülü üzerinde bulunan 5'GATC3' dizileri tanıyarak bağlanır ve söz konusu dizinin N<sup>6</sup> pozisyonundaki Adenin bazına bir metil gurubu ilave eder (Crawford ve ark., 2010) (Şekil 2). Dam enziminin katalitik bölgesinde bulunan SAM bağlanma bölgesinde kofaktör bağlanması gerçekleştiğinde, alosterik transformasyon meydana gelerek enzimin hedef serisine bağlanma ilgisi artar. Bu reaksiyonda enzim spesifitesi enzim katalitik merkezi ile 5'GATC3' dizisinin N<sup>6</sup> pozisyonundaki Adenin bazının üç boyutlu uyumu sonucu gerçekleşir (Şekil 2). DNA replikasyonunda sadece yeni sentezlenen zincirde metilasyon bulunmadığı için, bu durumdaki çift zincir DNA molekülleri hemimetillenmiş DNA molekülleri olarak adlandırılırlar. Yeni sentezlenmiş çift zincir DNA'nın bu hemimetile durumu; hatalı eşlenmiş bazların tamiri, gen ifadesinin regülasyonu ve kromozom replikasyonunun başlama aşamasının baskılanması gibi hücrel anlamda hayati süreçlerin aktivasyonunda ya da baskılanmasında rol oynar. Bu nedenle söz konusu reaksiyon ve dolayısı ile *dam* genleri hücre yaşam döngüsü ile doğrudan ilişkilidir (Alencon ve ark., 1999).

SeqA proteini bazı prokaryotlarda belirlenmiş olan ve DNA replikasyonunda metilasyon/hemimetilasyon döngüsünde görev alan bir proteindir. Bu protein esas olarak kromozom replikasyon orijininin aktivasyonunun

regülasyonunu gerçekleştirmektedir. Deneysel çalışmalar, SeqA proteininin hemimetillenmiş DNA dizilerine, çift zinciri metillenmiş serilerden daha yüksek ilgiyle bağlandığını kanıtlamıştır (Bae ve ark., 2003). Bu protein sadece şablon DNA zincirinde bulunan metillenmiş 5'GATC3' dizilerine bağlanma aktivitesi göstermektedir. Hemimetillenmiş DNA dizileri replikasyon fonksiyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar ve Dam enzimi tarafından metilasyona uğratılana kadar bu durumda kalır. Bu durumda SeqA proteini replikasyon çatalını takip ederek hemimetillenmiş DNA'nın bir bölgesini kaplar. Böylece, Dam enziminin bu bölgelere bağlanması ve metilasyon aktivitesi göstererek replikasyon orijinlerinin yeniden aktive edilmesi engellenmiş olur. Replikasyonun aktivasyonunun bu regülasyonu sayesinde, hücre yaşam döngüsü de düzenlenir (Morigen ve ark., 2009) (Şekil 3).



Şekil 2. Dam enzimi tarafından gerçekleştirilen metil grubu transferi



Şekil 3. DNA metilasyon/hemimetilasyon döngüsü (Morigen ve ark., 2009).

SeqA proteininin kromozomal replikasyonundaki ve nükleik segregasyondaki rolleri yanında, belirli genlerin regülasyonuna da katıldığı saptanmıştır. Bu regülasyon karakteristikleri lamda bakteriyofajının bazı promotorlarında ve *Salmonella* ve *E. coli* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinin genlerinde tespit edilmiştir (Aloui ve ark., 2011).

### Dam ve SeqA Proteinlerinin Hücresel Fonksiyonları

SeqA proteininin üretiminin bloke edilmesi durumunda DNA moleküllerinde nükleoit yoğunluğunun ve süper sarmal dönüşlerin arttığı gözlenmesi sonucunda, SeqA proteininin bir nükleoit düzenleyici protein olduğu görüşünü güçlenmiştir. Kurulum katılan proteinler ve Kromozom yapısının oluşumu ve korunması işlevlerinde görev alan H-NS, Fis, IHF ve Hu gibi proteinlerin aynı zamanda global regülatörler olduğu ve birçok genin ifadesini etkilediği saptanmıştır (Bach ve Skarstad, 2005). Fakat benzer bir fonksiyon bugüne kadar SeqA proteini için tespit edilmemiştir.

Wang ve Smith, (1986) tarafından yürütülen bir çalışmada, Dam metilasyonunun bloke edildiği mutantlarda, önemli bir bölümü SOS DNA tamir siteleri üzerinde etkin olan regülona ait az sayıda genin ifadesinin değiştiği tespit edilmiştir. SOS regülon ekspresyonunun artmasının temeli, kromozomun herhangi bir yerinde bulunan DNA'nın herhangi bir zincirinde (iplikçiğinde) kırılmaya neden olabilen aktif bir MutHLS onarım sistemidir. MutHLS onarım sisteminde öncelikle tek zincir kırıkları yada boşlukları üretilir ve onlar da çift zincir kırılmalarına yol açar. *aroK17* :: *cat* mutantlarında beklenen durum Kromozomun *oriC*-*dnaA* bölgesinin uzun süre (hücre yaşam döngüsünün uzun bir bölümünde) hemimetile durumda kalmasıdır. Bu bölgelerdeki bazı genlerin (*dnaA*, *gidAB* ve *mioC*) senkronize edilmiş kültürlerde metilasyon ve eklips dönemden (replikasyonun yeniden başlamasının baskılandığı dönem) etkilendiği bazı araştırmacılar tarafından

tanımlanmıştır (Geier ve Modrich, 1999; Morigen ve ark., 2009). Løbner-Olesen ve ark., (2002) ise, senkronize etmedikleri kültürlerde, aynı genlerin ekspresyonunda SeqA'ya bağlı varyasyonda önemli bir değişme belirlememiştir. Bu durum, başlamadan sonra gerçekleşen transkripsiyonun geçici baskılanmasının, hücre döngüsünün geri kalanında artan transkripsiyonla telafi edildiğini göstermektedir. Örneğin antijen 43'ü kodlayan *flu* geni, tam ekspresyon için metilasyona ihtiyaç duyan bir gen olduğu ve Dam ifadesinin aşırı gerçekleşmesine bağlı olarak ifade düzeyinin 20 kez arttığı bu çalışmada belirlenmiştir. Bu tespit, maksimum transkripsiyon için promotor bölgelerde yer alan 5'GATC3' dizilerinin metilasyona ihtiyaç duyduğunu kanıtlamaktadır. OxyR transkripsiyonel represörünün, metilasyon durumuna bağlı olarak, promotor bölgeye bağlanmasının engellendiğine dair literatür verileri de bu bulguları desteklemektedir. Løbner-Olesen ve ark., (2002) tarafından yürütülen çalışmada ayrıca, *gatYZABCD* genlerinden oluşan galaktikol operonunun da tam ifade için metilasyona gereksinim duyduğu saptanmıştır. Bu operonun tam ifadesi için SeqA proteinine de ihtiyaç vardır ve Dam metilasyonunun aşırı düzeyde gerçekleşmesi, transkripsiyon oranını değiştirmemektedir. SeqA proteininin, bu operonun aktivitesinde nasıl fonksiyonel olduğu ise halen gizini korumaktadır. Bu çalışmada ilginç bir diğer bulgu ise, aşırı Dam üreten *seqA* mutantlarının doğal suşlarla nerede ise tamamen aynı transkripsiyon profillerine sahip olmasıdır. Dam'ın aşırı üretiminin *seqA* geninin transkripsiyonunu baskılamadığı belirlenerek, söz konusu durum açıklanmıştır. Araştırmacılar bu bulgular ışığında geliştirdikleri modelde, replikasyon çatalının arkasında kalan hemimetile bölgede Dam ve SeqA'nın bağlanma için birbirleri ile yarıştığını ileri sürmüşlerdir. Dam enzimini aşırı oranda üreten ve *seqA* mutanı olan hücrelerde, daha az hemimetillenmiş DNA kalır. Doğal hücrelerde ise aşırı üretilen Dam yoktur, bununla birlikte aktif SeqA aşırı üretilen Dam gibi görev yapar. Dolayısı ile de bütün kromozomlarda metilasyon durumu aynı kalır. Ancak promotor bölgelerinde 5'GATC3' dizileri bulunmayan genlerin regülasyonunda halen SeqA proteininin regülasyonda görev alması ise, bu protein için daha önceki çalışmalarda ileri sürülen nukleoit düzenleyici fonksiyonuna işaret eden bulgular olarak değerlendirilmiştir (Løbner-Olesen ve ark., 2003; Bach ve Skarstad, 2005). *E. coli* kromozomu, merkez yapıya bağlı 50 DNA ilmeği ile organize olmuştur (van der Woude ve Henderson, 2008). Bu oran, Løbner-Olesen ve ark., (2003) tarafından belirlenen SeqA/Dam domainleri ile neredeyse aynıdır. Bu bulgu, her bir düğümlenmiş ilmeğin negatif süper dönüşünde SeqA proteininin rol aldığına işaret etmektedir.

Dam ve SeqA aktivitelerinin *Salmonella*'da farklı fonksiyonlara sahip birçok genin düzenlenmesine katıldığı belirlenmiştir. Bu bakteride *dam* ve *seqA* genleri bakımından oluşturulmuş mutant suşlarda; özellikle biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunma ve konak hücre işgali fonksiyonlarının, doğal suşlara oranla büyük bir ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. Diğer yandan; *S. Typhimurium* (Aloui ve ark., 2011), *E. coli* ve *Acinetobacter baumannii* gibi bazı bakterilerde, biyofilm oluşumunun epigenetik düzenlemelerin kontrolü altında olduğu gösterilmiştir (Rumbo-Feal ve ark., 2013; Aya Castaneda ve ark., 2015). Bununla birlikte, Dam metilasyonunun *Salmonella*'daki biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini açıklayan sadece birkaç çalışma vardır (Løbner-Olesen ve ark., 2003; Aya Castaneda ve ark., 2015). Aya Castaneda ve ark., (2015) *S. Enteritidis*'te DNA metilasyonunun, *csqD* ifadesini değiştirerek selüloz ve kıvrımlı fimbriya gibi biyofilm üretiminde etkili faktörlerinin ekspresyonunu arttırdığını tespit etmiştir. Araştırmacılar bu bulgulardan hareketle dam metilasyonunun *S. Enteritidis*'te biyofilm oluşumunu tetiklediğini ileri sürmüştür. Bununla birlikte, mutant suş ve doğal tip arasında yapılan karşılaştırmalı analizler sonucu, *seqA* geninin ve dolayısı ile SeqA proteininin biyofilm oluşumunda etkili olmadığı görüşüne varılmıştır (Løbner-Olesen ve ark., 2003). Badie ve ark., (2007) patojenik ve nonpatojenik *Salmonella* izolatları ile yürüttükleri karşılaştırmalı genomik analizler sonucunda; değiştirilmiş Dam enzim seviyelerinin, patojen *Salmonella* suşu 14028'de bakteriyel virulans gen ekspresyonu, hareketlilik ve flagella sentezi gibi virülans ilişkili gen ifadesini, bir laboratuvar suşu olan LT2'dan daha yüksek düzeyde değiştirdiğini saptamıştır. Bu bulgular da dam metilasyonunun *Salmonella*'da biyofilm oluşumunda etkili faktörlerle ilişkili olduğunun belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Diğer yandan, bazı araştırmacılar *dam* ve/veya *seqA* mutasyonlarının *S. Typhimurium*'da membran fosfolipitlerinin bileşiminin değişimine yol açtığını tanımlamıştır (Geier ve Modrich, 1999; Løbner-Olesen ve ark., 2003). Hem *dam* ve hem de *seqA* mutantlarında, ilgili genler tarafından kodlanmış DNA metilaz ve SeqA proteinleri, bu aktivitelerini, promotör bölgelerde RNA polimeraz enzimi veya transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini değiştirerek gerçekleştirebilirler. SeqA ve Dam proteinlerinin *S. Typhimurium*'da, yağ asidi biosentezini düzenleme yeteneği yanında, membran akışkanlığını, biyofilm oluşumunda önem taşıyan flagella ve ekzopolisakkarit sentezini de etkilediği saptanmıştır (Abdelwaheb ve ark., 2015). Bu çalışmalar *Salmonella*'da *dam* ve *seqA* genlerinin dolaylı da olsa biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğuna işaret etmesi açısından önem taşımaktadır. Özetle *dam* genlerinin *Salmonella*'da biyofilm oluşumuna katıldığına dair doğrudan tespit yapan çalışmalar sınırlıdır. *seqA* genlerinin bu etkisinin olup olmadığının belirlenmesine yönelik ise literatürde, çalışma grubumuz tarafından yapılan çalışmalar sonucunda üretilen yayın (Uğur ve ark., 2018) haricinde başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada araştırma grubumuz, Türkiye kökenli 7 farklı *Salmonella*

serovaryetesinde ve kontrol olarak kullanılan *S. Typhimurium* 14028 ile SL1344 suşlarında *dam* yanında *seqA* genlerinin de doğrudan biyofilm regülasyonuna katıldığını ve biyofilm üretimi üzerine *seqA* genlerinin ve dolayısı ile DNA tecridinin, Dam metilasyonundan daha yüksek bir pozitif etkinlik gösterdiğini belirlemiştir.

## SONUÇ

Dam metilasyonunun ve DNA tecridinin *Salmonella* biyofilmleri üzerinde pozitif regülatör olarak işlev gördüğünün belirlenmesi, *Salmonella* biyofilmleri ile mücadeleye yeni bir ufuk kazandıracak nitelik taşımaktadır. Zira gerek biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve gerekse biyofilm kaynaklı enfeksiyonların eradikasyonunda bu proteinlerin inhibitörlerinin kullanımının etkin bir çözüm olabileceğine işaret etmektedir. Diğer yandan, bakteri alt populasyonlarının regülasyonunda rol alan global epigenetik regülasyon mekanizmalarının tespiti, prokaryotlarda genetik ifadenin farklanmasına ve çeşitliliğine ışık tutacak niteliktedir. Özetle bu alanda yürütülecek ileri araştırmalar hem bilimsel ve hem de pratik sorunların çözümüne ivme kazandıracaktır.

## Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 215Z087).

## KAYNAKLAR

- Abdelwaheb C, Lobna M, Bouchra M, Bouchra BA, Selma K, Ahmed L 2015. Fatty acids composition and biofilm production of attenuated *Salmonella typhimurium dam* and *seqA* mutants after exposure to UV-C. *Current Microbiology*, 71: 741–745.
- Alencon E, Taghbalout A, Kern R, Kohiyama M 1999. Replication cycle dependent association of SeqA to the outer membrane fraction of *E. coli*. *Biochimie*, 81: 841-846.
- Aloui A, Kouass SS, Mihoub M, El May A, Landoulsi A 2011. The Absence of the “GATC - binding protein SeqA” affects DNA replication in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *IntechOpen*, doi: 10.5772/21249.
- Aloui A, Mihoub M, Sethom MM 2010. Effects of *dam* and/or *seqA* mutations on the fatty acid and phospholipid membrane composition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7: 573–583.
- Aloui A, Tagourti J, May ELA, Joseleau PD, Landoulsi A 2011. The effect of methylation on some biological parameters in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Pathologia Biologia*, 59: 192-198.
- Armbruster CR, Parsek MR 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115: 4317-4319.
- Aya Castaneda MR, Sarnacki SH, Noto LM 2015. Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 16: 15–22.
- Bach T, Skarstad K 2005. An oriC-like distribution of GATC sites mediates full sequestration of non-origin sequences in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 350: 7–11.
- Badie G, Heithoff DM, Sinsheimer RL 2007. Altered levels of *Salmonella* DNA adenine methylase are associated with defects in gene expression, motility, flagellar synthesis, and bile resistance in the pathogenic strain 14028 but not in the laboratory strain LT2. *Journal of Bacteriology*, 189: 1556–1564.
- Bae SH, Cheong HK, Cheong C, Kang S, Hwang DS, Choi BS 2003. Structure and dynamics of hemimethylated GATC sites: implications for DNA-SeqA recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 45987-45993.
- Balbontin R, Rowley G, Pucciarelli MG 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene Expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188: 8160–8168.
- Barak JD, Whitehand LC, Charkowski AO 2002. Differences in the attachment of *Samonella enterica* serovars and *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4578-4763.
- Bhowmick PP, Devananda D, Karunasagar I, Ruwandeepika HA 2011. Presence of *Salmonella* genes in seafood associated *Salmonella* serovars and the role of *sseC* gene in survival of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in epithelial cells. *Microbiology*, 157: 160-168.
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ, Kjelleberg S 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3916-3923.
- Casadesús J, Low DA 2013. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 288(20): 13929–13935.

- Chatti A, Aloui M, Tagourti J, Mihoub M, Landoulsi A 2014. Novobiocin sensitivity of *Salmonella typhimurium dam* and/or *seqA* mutants. Polish Journal of Microbiology, 63: 51-56.
- Crawford RW, Reeve KE, Gunn J 2010. Flagellated but not hyperfimbriated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. Journal of Bacteriology, 192: 2981-90.
- Davidson CJ, White AP, Surette MG 2008. Evolutionary loss of the *rdar* morphotype in *Salmonella* as a result of high mutation rates during laboratory passage. The ISME Journal, 2(3): 293-307.
- Dubnau D, Losick R 2006. Bistability in bacteria. Molecular Microbiology, 61: 564-572.
- Flemming HC, Wingender J 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews in Microbiology, 8: 623-633.
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. Nature Reviews in Microbiology, 14: 563-575.
- Geier GE, Modrich P 1999. Recognition sequence of the *dam* methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. The Journal of Biological Chemistry, 274: 1408-1413.
- Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. Science, 284 (5416): 967-970.
- Iturriaga MH, Tamplin ML, Escartin EF 2007. Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature. Journal of Food Protection, 70: 30-34.
- Jakomin M, Chessa D, Baumler AJ, Casadesus J 2008. Regulation of the *Salmonella enterica std* Fimbrial Operon by DNA Adenine Methylation, SeqA, and HdfR. Journal of Bacteriology, 190: 7406-7413.
- Jennings ME, Quick LN, Soni A, Davis RR, Crosby K, Ott CM, Nickerson CA, Wilson JW 2011. Characterization of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ydjI* gene, which encodes a conserved DNA binding protein required for full acid stress resistance. Journal of Bacteriology, 193: 2208-2217.
- Kim SJ, Chang J, Rimal B, Yang H, Schaefer J 2018. Surface proteins and the formation of biofilms by *Staphylococcus aureus*. Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 1860: 749-756.
- Kint G, De Coster D, Marchal K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC 2010. The small regulatory RNA molecule MicA is involved in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation. BMC Microbiology, 10:276.
- Løbner-Olesen A, Skovgaard O, Marinus MG 2005. *Dam* methylation: coordinating cellular processes. Current Opinion in Microbiology, 8: 154-160.
- Maksimova YG 2014. Microbial biofilms in biotechnological processes, Applied Biochemistry and Microbiology, 2014, 50, 750-760.
- Morigen M, Odsbu I, Skarstad K 2009. Growth rate dependent numbers of SeqA structures organize the multiple replication forks in rapidly growing *Escherichia coli*. Genes Cells, 14: 643-57.
- Patel J, Sharma M 2010. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. International Journal of Food Microbiology, 139: 41-47.
- Ren D, Madsen JS, Sorensen SJ, Burmolle M 2015. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. The ISME Journal, 9: 81-89.
- Rumbo-Feal S, Gómez MJ, Gayoso C, Álvarez-Fraga L, Cabral MP, Aransay AM, Rodríguez-Ezpeleta N, Fullaondo A, Valle J, Tomás M, Bou G, Poza M 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. PLoS ONE, 8(8):e72968
- Stepanovic S, Irkovi I, Ranin L, Svabi-Vlahovi M 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology, 38: 428-432.
- Uğur S, Akçelik N, Yüksel FN, Karatuğ NT, Akçelik M 2018. Effects of *dam* and *seqA* genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. Pathogens and Global Health, 112: 368-377.
- van der Woude MW, Henderson IR 2008. Regulation and function of Ag43 (flu). Annual Review of Microbiology, 62: 153-69.
- Wang TC, Smith KC 1986. Inviability of *dam recA* and *dam recB* cells of *Escherichia coli* is correlated with their inability to repair DNA double-strand breaks produced by mismatch repair. Journal of Bacteriology, 165: 1023-1025.
- Zakikhany K, Harrington CR, Nimtz M, Hinton JC, Römling U 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Molecular Microbiology, 77(3): 771-786.

## Elazığ ili Murat Nehrinde bor metalinin araştırılması

Murat Topal<sup>1\*</sup>, E. Işıl Arslan Topal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: murattopal@munzur.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, Elazığ ilinde bulunan ve su potansiyeli yüksek olan Murat Nehrinde bor konsantrasyonları İlkbahar ve Yaz sezonu boyunca tespit edildi. Murat Nehrinde bor konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla su örnekleri alındı. Alınan su örneklerinde bor konsantrasyonları ICP/MS cihazı ile analiz edildi. Elde edilen verilere göre, ilkbahar mevsiminde B konsantrasyonları Mart ayından Mayıs ayına kadar çok fazla değişkenlik göstermedi. Mart, Nisan ve Mayıs aylarında ortalama B konsantrasyonu 974, 1036 ve 917 µg/L olarak tespit edildi. Yaz mevsiminde ise B konsantrasyonları Haziran ayından Ağustos ayına kadar azalma gösterdi. Haziran ayında ortalama B konsantrasyonu 804, 580 ve 489 µg/L olarak tespit edildi. Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği'nde nehirler ve göller için maksimum izin verilebilir çevresel kalite standardında bor konsantrasyonlarının 1472 µg/L'yi aşmaması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmamızda da ilkbahar ve yaz mevsiminde bor konsantrasyonları yönetmelikte verilen sınır değerden daha düşük konsantrasyonlarda olduğu tespit edildi Bu nedenle, Murat Nehri sularının bor açısından sulama suyu olarak kullanılmasında herhangi bir sakınca bulunmadığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Bor, Metal, Murat Nehri, Su kalitesi, Elazığ

### Investigation of boron metal in Murat River, Elazığ city

### Abstract

In this study, boron concentrations in the Murat River in Elazığ province, which has a high-water potential, were determined during spring and summer season. Water samples were taken in order to determine boron concentrations in Murat River. Boron concentrations were analyzed by ICP/MS device in water samples. According to the obtained data, B concentrations in spring did not vary much from March to May. In March, April and May, the average B concentration was 974, 1036 and 917 µg/L. In summer, B concentrations decreased from June to August. The mean B concentration in June was 804, 580 and 489 µg/L. The Regulation on Surface Water Quality states that the maximum permissible environmental quality standards for rivers and lakes should not exceed 1472 µg/L boron concentrations. In our study, boron concentrations in spring and summer were found to be lower than the limit value given in the regulation. Therefore, it was determined that there was not any harm in using Murat River water as irrigation water with regard to boron.

**Keywords:** Boron, Metal, Murat River, Water quality, Elazığ

### GİRİŞ

Yerüstü sularının kalitesinin belirlenmesi, su kaynaklarının korunması ve iyi bir şekilde yönetilmesi gerekmektedir. Su kaynaklarında fizikokimyasal ve biyolojik parametrelerin izlenmesi, söz konusu su kaynağının kalitesi ve kullanımı hakkında bilgi verir. Bu çerçevede, ülkemizde su kaynaklarının kalitesinin ve miktarının izlenmesi, korunması ve iyi su durumuna ulaşabilmek için alınması gereken tedbirler Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği'nde belirtilmiştir. Yerüstü su kaynaklarında bulunan belirli kirleticiler ve çevresel kalite standartları yönetmelikte verilmiştir. Bu kirleticiler arasında Bor (B) metal de bulunmaktadır.

Bor; volkanik, plütonik, sedimanter ve metamorfik ortamlarda yaygın olarak görülen bir kabuksal elementtir. Bor orta derecede uçucudur, oldukça çözünürdür ve kil mineralleri ve metal oksitler üzerinde önemli ölçüde adsorbe edilebilir. Bor, bitkiler ve diğer organizmalar için temel bir mikro besindir. Bor rezervuarları atmosferde, hidrosferde, biyosferde ve litosferde geniş ölçüde dağılmıştır. Borun içeriği, yağmur suyunda µg/L-mg/L arasında değişen değerler alabilir. Nehirlerde ise B konsantrasyonları normalde 40 ppb'den düşüktür. Ancak, insan aktiviteleri neticesinde, borun antropojenik yollarla nehirlere sürekli girişi nehirlerdeki B konsantrasyonlarının artmasına neden olmaktadır. Nehirlerde artan B konsantrasyonunun bazı nedenleri; petrolün kullanılması, kömürün yanması, endüstriyel ve kentsel atıksular ve tarımsal atıksulardır. Kömürün B

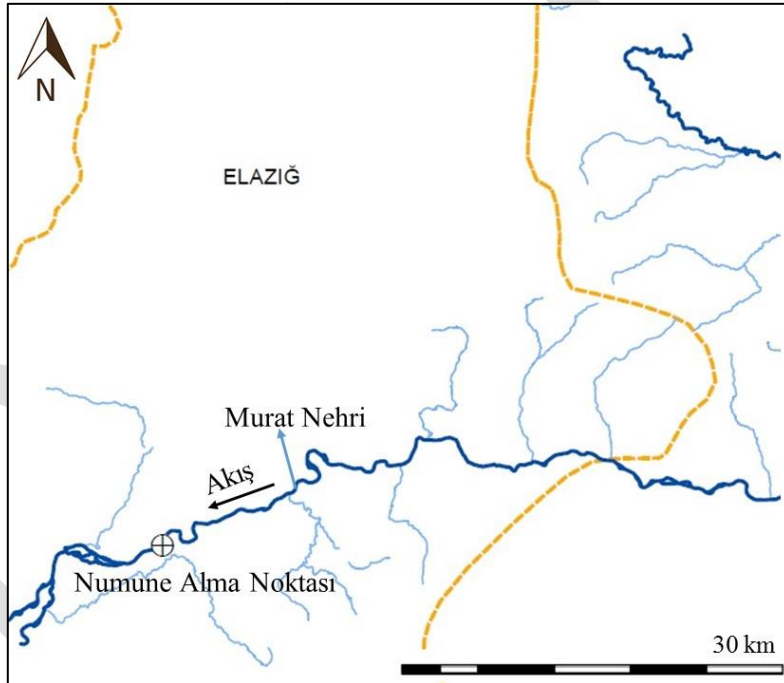
konsantrasyonları 10 ila 1000 ppm arasında değişmekte olup, ortalama B konsantrasyonu yaklaşık 47 ppm'dir. İki büyük B üreticisinden (Türkiye ve ABD) sağlanan bor cevher ürünleri cam (%51), seramik (%13), tarım (%14), deterjanlar (%3) ve diğer amaçlar (%19) için kullanılmaktadır. Deterjanlarda, gübrelerde ve böcek ilaçlarında kullanılan B muhtemelen nehirlere önemli ölçüde katkıda bulunur. Borun atmosferik girdiden nehirlere katkısı da bulunmaktadır (Mao vd., 2019).

Yerüstü sularında bor konsantrasyonlarının fazla bulunması su ekosisteminde yaşayan canlılar ile bitkilere toksik etki yapmakta ve birçok çevresel sorunlara da neden olmaktadır. Bor insanlar üzerine toksik etki yapabilir. İnsanlar meyve ve sebzelerden günlük olarak bor tüketir ve bor yüksek dozlarda vücuda alındığında gelişimsel ve üreme bozukluğuna (Pahl vd., 2001), kronik olarak maruz kalanlarda ise nörolojik etkilere, böbrek hasarına ve ishale neden olabilir (Nielsen, 1997). Bor toksisitesine uğramış bitkilerde gözlemlenen septomlar; klorofil ve lignin seviyesinin düşmesi, gövde ve yapraklarda büyümenin azalması ve metabolizmanın değişmesidir (Nable vd., 1997; Reid, 2007; Uluisik vd., 2018). Bu nedenlerle, besin zincirine dahil olan bor metalinin sürekli izlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, belirli kirleticiler arasında yer alan bor metali Elazığ ilinden geçen Murat Nehrinde ilkbahar ve yaz sezonu boyunca izlenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, çalışma alanı olarak Elazığ ili, Palu ilçesinden geçen Murat Nehri seçilmiştir. Murat Nehri, su potansiyeli yüksek olan ve üzerinde birçok barajı bulunduran önemli yüzeysel su kaynağıdır. Elazığ ilinden geçen Murat Nehri batıya doğru akarak Mercan, Kalan, Pülümür ve Peri çaylarını içeren Munzur suyunu alır ve Keban mevkiine gelerek Karasu çayı kolunu oluşturur. Murat Nehri etrafında tarım arazileri bulunmakta ve sulama suyu olarak kullanılabilir. Bu nedenle, çalışmamızda ilkbahar ve yaz mevsimi seçilmiştir. Çalışma alanı ve numune alma noktası Şekil 1'de gösterilmiştir.

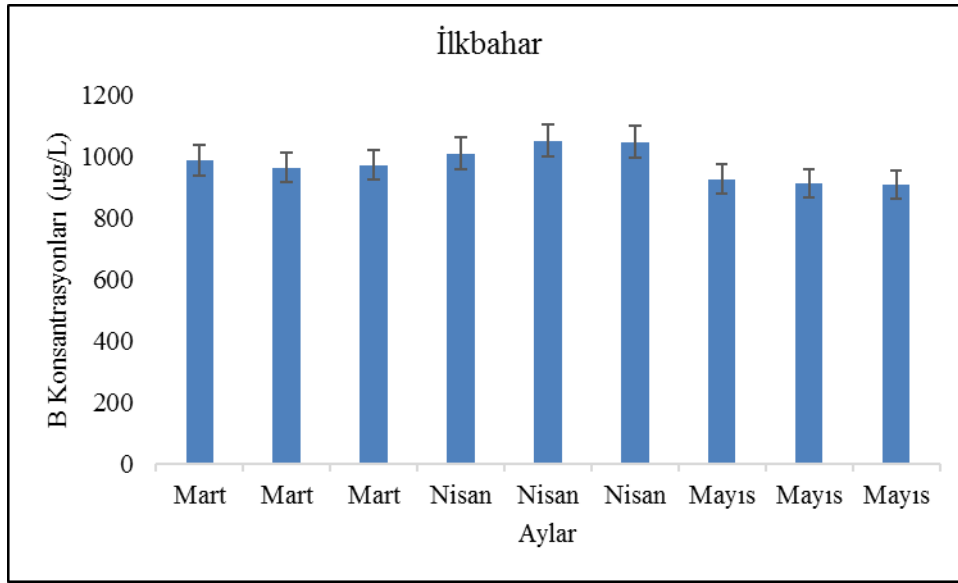


Şekil 1. Çalışma Alanı ve numune alma noktası

Murat Nehrinde bor konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla materyal olarak kullanılan su örnekleri ilkbahar ve yaz sezonu boyunca ayda 3 defa olmak üzere numune alma noktasının farklı noktalarından (4 farklı nokta) 500 mL olacak şekilde alındı. Toplanan su örnekleri 0.01 N HCl ile pH'sı 2'nin altında olacak şekilde asitlendirildi. Asitlendirme işleminden sonra su örneklerinde bor konsantrasyonlarının analizi ICP/MS cihazı ile gerçekleştirildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Elazığ ili Murat Nehrinden Mart, Nisan ve Mayıs aylarında alınan yerüstü sularında tespit edilen B konsantrasyonları Şekil 2'de verilmiştir.

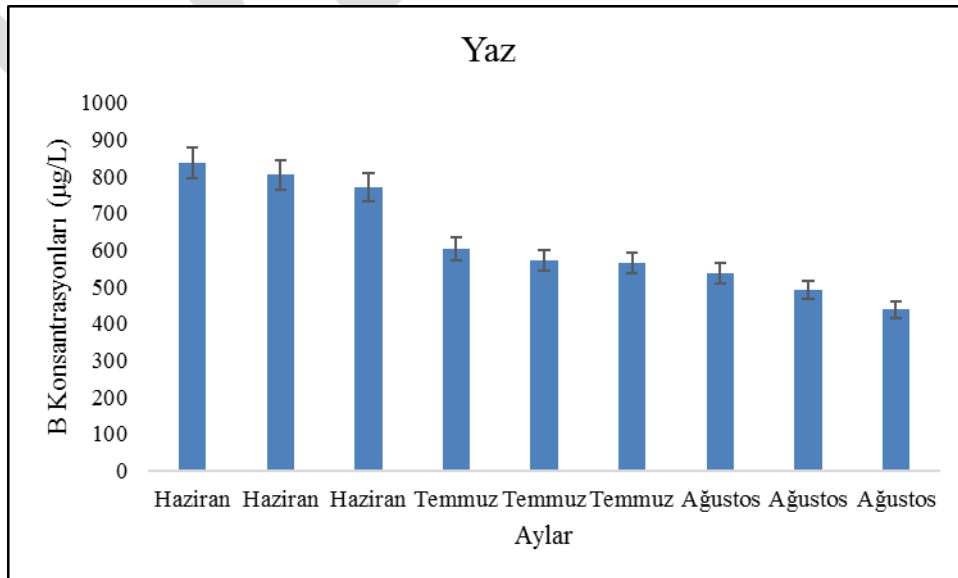


Şekil 2. İlkbahar Mevsimine ait Bor değerleri

Şekil 2 değerlendirildiğinde B konsantrasyonları Mart ayından Mayıs ayına kadar çok fazla değişkenlik göstermedi. B konsantrasyonları 909-1051 µg/L arasında değişen değerlerde tespit edildi. En düşük B konsantrasyonu Mayıs ayında gerçekleşirken, en yüksek B konsantrasyonu Nisan ayında gerçekleşti. Mart ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 974 µg/L olarak, Nisan ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 1036 µg/L olarak, Mayıs ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 917 µg/L olarak tespit edildi. İlkbahar mevsiminde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 976 µg/L olarak hesaplandı.

Elazığ ili Murat Nehrinden Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında alınan yerüstü sularında tespit edilen B konsantrasyonları Şekil 3’de verilmiştir.

Şekil 3’e göre B konsantrasyonları Haziran ayından Ağustos ayına kadar azalma gösterdi. Haziran ayında B konsantrasyonları 771-837 µg/L arasında, Temmuz ayında 565-603 µg/L arasında, Ağustos ayında 438-537 µg/L arasında değerler aldığı tespit edildi. En düşük B konsantrasyonu Ağustos ayında gerçekleşirken, en yüksek B konsantrasyonu Haziran ayında gerçekleşti. Haziran ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 804 µg/L olarak, Temmuz ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 580 µg/L olarak, Ağustos ayında alınan su örneklerinde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 489 µg/L olarak tespit edildi. Yaz mevsiminde tespit edilen ortalama B konsantrasyonu 624 µg/L olarak hesaplandı. Bildirilerde 11 punto Times New Roman yazı tipi kullanılmalıdır. Başlıklar Times New Roman olmalıdır.



Şekil 3. Yaz Mevsimine ait Bor değerleri



## SONUÇ

Elazığ ilinin önemli yerüstü su kaynaklarından biri olan Murat Nehrinde B konsantrasyonları İlkbahar ve Yaz sezonu boyunca izlendi. Elde edilen veriler, 30.11.2012 Tarih ve 28483 Sayılı Resmi Gazete’de yayınlanarak yürürlüğe giren Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği’nde (YSKY, 2012) verilen değerle mukayese edildi. YSKY’de nehirler ve göller için maksimum izin verilebilir çevresel kalite standardında bor konsantrasyonlarının 1472 µg/L’yi aşmaması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmamızda da ilkbahar ve yaz mevsiminde bor konsantrasyonlarının yönetmelikte verilen sınır değerden daha düşük konsantrasyonlarda olduğu tespit edildi. Bu nedenle, Murat Nehri sularının bor açısından sulama suyu olarak kullanılmasında herhangi bir sakınca bulunmadığı belirlendi.

## KAYNAKLAR

- Mao H-R, Liu C-Q, Zhao Z-Q 2019. Source and evolution of dissolved boron in rivers: Insights from boron isotope signatures of end-members and model of boron isotopes during weathering processes. *Earth-Science Reviews*, 190: 439-459.
- Nielsen FH 1997. Boron in human and animal nutrition. *Plant Soil*, 193: 199-208.
- Nable RO, Banuelos GS, Paull JG 1997. Boron toxicity. *Plant Soil*, 193: 181-198.
- Pahl MV, Culver BD, Strong PL, Murray FJ, Vaziri ND 2001. The effect of pregnancy on renal clearance of boron in humans: a study based on normal dietary intake of boron, *Toxicological Sciences*, 60: 252-256.
- Reid R 2007. Identification of boron transporter genes likely to be responsible for tolerance to boron toxicity in wheat and barley. *Plant Cell Physiology*, 48: 1673-1678.
- Ulusik İ, Karakaya HC, Koc A 2018. The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45: 156-162.
- YSKY (2012). Yerüstü Su Kalitesi Yönetmeliği, 30.11.2012 Tarih ve 28483 Sayılı Resmi Gazete.

## Atıksu arıtma tesisi arıtma çamurlarında civa konsantrasyonlarının izlenmesi: Malatya ili örneği

E. Işıl Arslan Topal<sup>1</sup>, Murat Topal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: eiarslan@firat.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, Malatya İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi (MİBAAT) arıtma çamurlarında Hg konsantrasyonları izlendi ve bazı ülkelerde verilen sınır değerlerle mukayese edildi. Elde edilen verilere göre, en yüksek Hg konsantrasyonu Eylül ayında 0,306 mg/kg olarak, en düşük Hg konsantrasyonu ise Şubat ayında 0,150 mg/kg olarak tespit edildi. Mevsimler incelendiğinde en yüksek ortalama Hg konsantrasyonu sonbahar mevsiminde 0,268 mg/kg olarak, en düşük ortalama Hg konsantrasyonu kış mevsiminde 0,151 mg/kg olarak tespit edildi. Ülkemizde arıtma çamurlarının toprakta kullanılabilmesi amacıyla Evsel ve Kentsel Arıtma Çamurlarının Toprakta Kullanılmasına Dair Yönetmelik yayımlanmıştır. Bu yönetmelikte Hg konsantrasyonu 10 mg/kg olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda da Hg konsantrasyonları 0,150-0,306 mg/kg arasında tespit edildiğinden MİBAAT'nden çıkan arıtma çamurlarının toprakta kullanılabileceği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Civa, yönetmelik, izleme, arıtma çamuru, arıtma tesisi

### Monitoring of mercury concentrations in wastewater treatment plant sewage sludges: a case study of Malatya city

#### Abstract

In this study, Hg concentrations were monitored in Malatya Advanced Biological Wastewater Treatment Plant (MABWWTP) sewage sludge and compared with the limit values given in some countries. According to the data obtained, the highest Hg concentration was 0.306 mg/kg in September and the lowest Hg concentration was 0.150 mg/kg in February. When the seasons were examined, the highest average Hg concentration was 0.268 mg/kg in the autumn season and the lowest average Hg concentration in the winter season was 0.151 mg/kg. In order to use the sewage sludge in the soil in our country, the Regulation on the Use of Domestic and Urban Treatment Sludges in Soil has been published. In this regulation, Hg concentration is indicated as 10 mg/kg. In our study, Hg concentrations between 0.150-0.306 mg/kg were determined and it was determined that the sewage sludge from MABWWTP could be used in soil.

**Keywords:** Mercury, legislation, monitoring, sewage sludge, treatment plant

### GİRİŞ

Arıtma çamuru değerli tarımsal özelliklere sahiptir. Arıtma çamurunun yüksek organik madde ve besin içeriği nedeni ile toprakların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirme kabiliyeti iyi bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı, arıtma çamurunun tarımsal topraklara uygulanması, hayvansal gübrelerin bitkisel üretim için yaygın olarak kullanılmasına alternatiftir. Ayrıca, atıksu arıtma çamurunun toprakta gübre olarak kullanılması, atık haldeki bir ürünün tarımsal uygulamalarda bir kaynak olarak güvenli bir şekilde geri dönüşümü imkanını da sunmaktadır. Arıtma çamurunun atık geri dönüşümü ve bertarafı yolu olarak tarımsal kullanımı, belediyeler için atık depolama ve yakma gibi diğer seçenekler ile karşılaştırıldığında daha düşük bir maliyete sahiptir. Bununla beraber, tarımsal uygulamalarda atık geri dönüşümü ile ilgili çevresel kaygılar iyi bilindiğinden, arıtma çamurunun kullanımıyla ilgili kısıtlamalar Avrupa Birliği ve yerel makamlar tarafından uygulanmaktadır. Avrupa Birliği, arıtma çamurunun tarımsal amaçlı uygulanmasını teşvik etmeyi ve bu çamurun kullanımını 21 Mayıs 1991 tarih ve 91/271/ EEC sayılı AET Konsey Direktifi ile düzenlemeyi amaçlamıştır. Önerildiği gibi arıtma çamuru, bitki besin ihtiyacına uygun olarak ve toprak, yüzey veya yeraltı suyunun kalitesini düşürmeden dikkatli uygulanmalıdır. Ekilebilir arazi kullanımına yönelik arıtma çamuru, kullanılmadan önce ağır metaller, kalıcı organik kirleticiler ve patojenik mikroorganizmalar açısından değerlendirilmelidir (Fumagalli vd., 2013).

Ağır metaller arasında, atom ağırlıkları ve yoğunlukları 5 g/cm<sup>3</sup> değerini aşan metaller ve metaloidler bulunur (Wu vd., 2017). Başlıca ağır metal kaynakları şunlardır: gübreler, böcek ilaçları, arıtılmamış veya kısmen arıtılmış endüstriyel atıksular, maden sahaları sızıntıları, endüstriyel atıklar (e-atıklar), eritme cevherlerinden kaynaklanan atıklar, arıtma çamurları (Ramachandra vd., 2018). Canlı organizmalar, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, V,

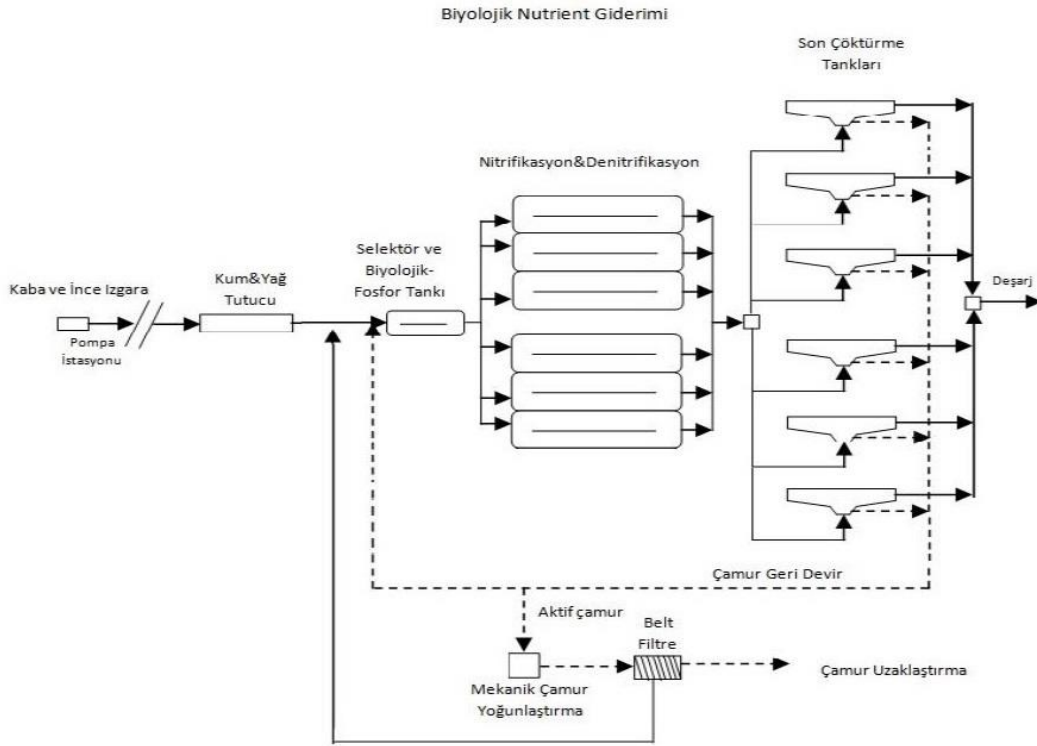
Sr ve Zn gibi bazı ağır metallerin eser miktarlarına ihtiyaç duyarlar fakat bunların yüksek konsantrasyonları organizmalar için zararlı olabilir. Hg, Cr, Cd, As, Pb, Sr, vb. ağır metaller ise canlılar için gerekli olmayan metallere aittir. Bu metallerin insanlar ve diğer canlılar için büyük bir tehdit oluşturduğu düşünülmektedir (Ahmad vd., 2018). Civa (Hg) gibi toksik elementlerin ve bunların toprak ve besin zincirlerine transferlerinin varlığı, tarım arazilerinde atıksu çamuru kullanımını sınırlandırmaktadır. Civa gibi toksik metallerin çamurla muamele edilmiş topraklardan aktarılabilmesini ve topraktaki metallerin bitki köklerine emilebileceği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bitkiler, topraktan köklere asimilasyon yoluyla Hg biriktirebilir. Bitkiler yoluyla asimilasyon, civanın karasal besin zincirine girmesinde büyük rol oynar. Civa, doğrudan havadan, bitkilerin yapraklarındaki stomalar yoluyla absorplanabilir ve bitkiler yapraklarından civa buharını doğrudan yayabilir. Bitkiler, yerküreden atmosfere civanın taşınmasında kanallar olarak işlev görürler. Civa; toksisitesi, bitkilerce alımı ve biyolojik birikim potansiyeli nedenleri ile önemli bir kirletici olarak kabul edilir (Karimpour vd., 2010). Civa besin zincirinde biyobirikme ve biyo-manyetikleşme eğilimi gösterdiğinden, insan fetüslerini bile olumsuz yönde etkileyebilir. Esasen civa, proteinlerde bulunan tiyol kalıntıları ile birleşerek insan vücudunun nörolojik ve zihinsel işlevlerini bozar. Kükürtün hücre içi civa ile etkisizleştirilmesi çeşitli hormonları, enzimleri ve kofaktörleri inhibe ederek ciddi hastalıklara neden olabilir (Vikrand ve Kim, 2019). Bu çalışmada, Malatya İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisinden çıkan arıtma çamurlarında Hg konsantrasyonları on iki ay boyunca izlendi ve bazı ülkelerde belirlenen sınır değerlerle mukayese edildi.

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, çalışma alanı olarak Malatya İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi seçildi. Atıksu arıtma tesisine ait akım şeması Şekil 1'de verilmiştir. Malatya Atıksu Arıtma Tesisi, Malatya merkez ilçeleri Battalgazi ve Yeşilyurt'un evsel atıksularının arıtılması amacı ile 183.923 m<sup>2</sup>'lik bir alanda kurulmuş, yaklaşık olarak 720.000 eşdeğer nüfusa hitap edecek şekilde, ortalama proje debisi 2010 yılı için 135.000 m<sup>3</sup>/gün, 2020 yılı için 180.000 m<sup>3</sup>/gün ve 2030 yılı için 220.000 m<sup>3</sup>/gün evsel atıksuyun arıtılmasına hizmet edecek kapasitede üç aşamalı projelendirilmiştir. Malatya Belediyesi Atıksu Arıtma Tesisi ön arıtma, biyolojik arıtma ve çamur giderme ünitelerinden oluşmaktadır.

Atıksu, tesis girişinde kaba ızgaradan geçirilir, terfi ettirilir ve daha sonra ince ızgaralarla atıksu içerisinde bulunan yüzen maddeler ve iri taneler tutularak kum ve yağ tutucuya gönderilir. Atıksu biyolojik fosfor giderimi için anaerobik tanka gönderilir. Anerobik tanktan sonra atıksu, havalandırma havuzlarına gönderilmekte ve burada biyolojik arıtım gerçekleştirilmektedir. Havalandırma havuzlarındaki atıksu/çamur karışımı, gravite ile son çökeltme tanklarına alınmaktadır. Arıtılmış su, toplama odaları ve arıtılmış su toplama kanalları yardımıyla gravite ile Boran Deresi ile Karakaya Baraj Gölü'ne deşarj edilmektedir. Son çökeltme havuzunda çöktürülen çamur, döner çamur sıyrıcılar yardımıyla tankların ortasındaki çamur konilerine süpürülür. Çamur buradan, hidrostatik basınç altında çamur toplama haznesine ve çamur pompa istasyonuna gravite ile gönderilir. Mekanik çamur yoğunlaştırmada fazla biyolojik çamurun, katyonik polimer (polielektrolit) ile şartlandırılmasından sonra, %5-7 kuru katı konsantrasyonuna kadar ön-kurutulması için uygulanır. Belt filtre presler, biyolojik fazla çamurun %22 ila 25 kuru katı konsantrasyon oranına kadar susuzlaştırılması için uygulanır. Susuzlaştırılan çamur kireçle %36 kuru katı konsantrasyon oranına kadar karıştırılır ve sonra nihai toplama alanına gönderilir ve belediye çöp alanına atılır.

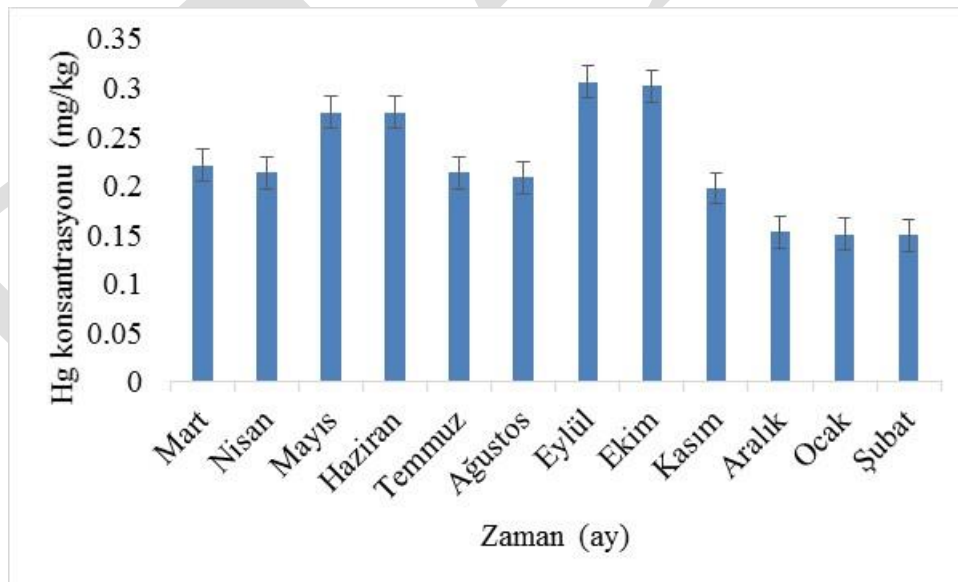
Bu çalışmada incelenen çamur örnekleri 12 ay boyunca MİBAAT'nin son çamur toplama alanından aylık olarak alındı. Alınan arıtma çamurlarında Hg konsantrasyonları izlendi ve alınan örneklerdeki Hg konsantrasyonları, ISO 9001: 2000 akreditasyonuna sahip bir laboratuvarında ICP/MS (ICP/MS-Perkin-Elmer ELAN 9000) cihazı ile tespit edildi.



Şekil 1. Malatya İleri biyolojik atıksu arıtma tesisi akım şeması (Özdemir, 2016)

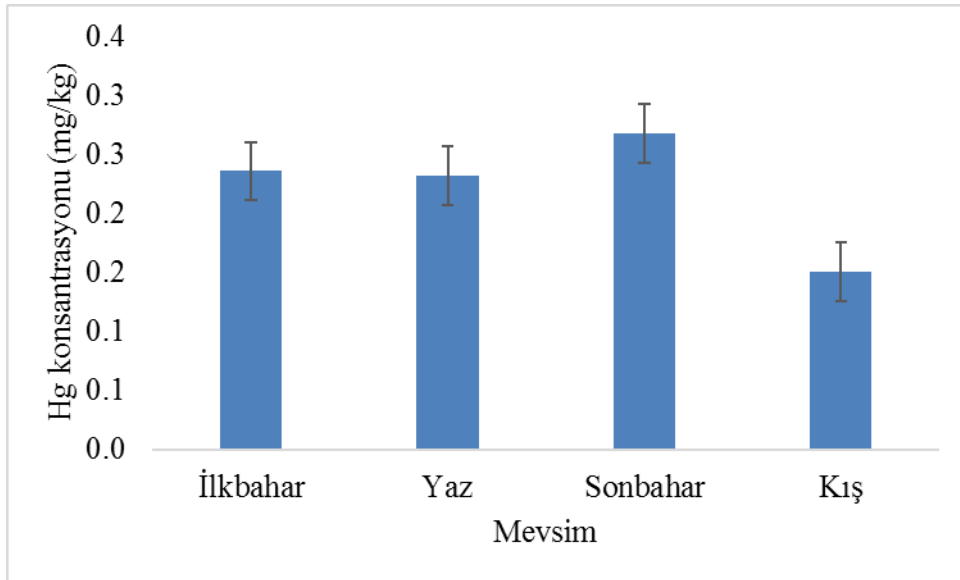
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Malatya İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi arıtma çamurunda Hg konsantrasyonları 12 ay boyunca tespit edildi ve mevsimsel olarak izlendi. Arıtma çamuru numunelerinde tespit edilen Hg konsantrasyonları Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. MİBAAT arıtma çamuru örneklerinde Hg konsantrasyonları

Şekil 2’ye göre MİBAAT arıtma çamurunda en yüksek Hg konsantrasyonu Eylül ayında 0,306 mg/kg olarak, en düşük Hg konsantrasyonu Şubat ayında 0,150 mg/kg olarak tespit edildi. MİBAAT arıtma çamurunda tespit edilen Hg konsantrasyonu Mayıs ayında artış, Temmuz ayında azalış, Eylül ayında tekrar artış ve Kasım ayında tekrar azalış gösterdi. Arıtma çamurunda Hg konsantrasyonlarının aylara göre değişiklik gösterdiği belirlendi. Malatya İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi arıtma çamurunda tespit edilen Hg konsantrasyonlarının mevsimsel değişimi Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 3. MİBAAT arıtma çamuru örneklerinde Hg konsantrasyonlarının mevsimsel değişimi

Şekil 3 değerlendirildiğinde, MİBAAT arıtma çamurundaki en yüksek ortalama Hg konsantrasyonu 0,268 mg/kg olarak sonbahar mevsiminde tespit edildi. En düşük ortalama Hg konsantrasyonu ise kış mevsiminde 0,151 mg/kg olarak tespit edildi. İlkbahar mevsiminde Hg konsantrasyonu 0,236 mg/kg olarak tespit edilirken yaz mevsiminde Hg konsantrasyonu 0,232 mg/kg olarak tespit edildi. Mevsimlere göre arıtma çamurunda Hg konsantrasyonları küçükten büyüğe doğru Kış<Yaz<İlkbahar<Sonbahar şeklinde sıralandı.

## SONUÇ

Ülkemizde, evsel ve kentsel atıksu arıtma tesislerinden çıkan arıtma çamurlarının toprakta kullanılması ile ilgili Evsel ve Kentsel Arıtma Çamurlarının Toprakta Kullanılmasına Dair Yönetmelik 03.08.2010 tarih ve 27661 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe girmiştir. Ayrıca, farklı ülkelerde de arıtma çamurlarında izin verilen Hg konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 1) (Aşık, 2011).

**Tablo 1.** Farklı ülkelerde arıtma çamurlarında izin verilen Hg konsantrasyonları

Ülkeler	Sınır Değerler (mg/kg)
Almanya	8
Fransa	10-20
Hollanda	0,75
Yunanistan	16-25
Norveç	3
Portekiz	16
<b>Türkiye</b>	<b>10</b>

Ülkemizdeki yönetmeliğe göre toprakta kullanılabilen stabilize arıtma çamurunda izin verilen en yüksek Hg konsantrasyonu 10 mg/kg olarak belirlenmiştir. MİBAAT arıtma çamurunun Hg konsantrasyonları incelendiğinde, yönetmelikte verilen sınır değerden oldukça düşük değerlerde tespit edildi. Sonuç olarak, çalışmamızda Hg konsantrasyonlarının 0,150 ile 0,306 mg/kg arasında değiştiği tespit edildiğinden MİBAAT arıtma çamurunun Hg konsantrasyonu açısından toprakta kullanılabilenliği belirlendi.

## KAYNAKLAR

- Ahmad I, Ahmad SW, Qadir S, Ahmad T 2018. Synthesis and characterization of molecular imprinted nanomaterials for the removal of heavy metals from water. *Journal of Materials Research and Technology*, 7: 270-282.
- Aşık BB 2011. Farklı kökenli arıtma çamurlarının tarımsal amaçlı kullanım olanaklarının araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Anabilim Dalı, Bursa.
- Fumagalli M, Perego A, Acutis M 2013. Modelling nitrogen leaching from sewage sludge application to arable land in the Lombardy region (northern Italy). *Science of The Total Environment*, 461-462: 509-518.
- Karimpour M, Afyuni M, Sari AE, Ghasempouri SM 2010. Effect of sewage sludge on mercury accumulation in soil and corn. *Journal of Residuals Science & Technology*, 7: 35-42.

- Özdemir Ö 2016. İleri biyolojik atıksu arıtma tesisinde sürdürülebilir işletme için revizyon ve enerji verimliliği: Malatya örneği. Adıyaman Üniversitesi, Mühendislik Bilimleri Dergisi, 5: 9-20.
- Ramachandra TV, Sudarshan PB, Mahesh MK, Vinay S 2018. Spatial patterns of heavy metal accumulation in sediments and macrophytes of Bellandur wetland. Bangalore, Journal of Environmental Management, 206: 1204-1210.
- Vikrant K, Kim K-H 2019. Nanomaterials for the adsorptive treatment of Hg (II) ions from water. Chemical Engineering Journal, 358: 264-282.
- Wu S-P, Dai X-Z, Kan J-R, Shilong F-D, Zhu M-Y 2017. Fabrication of carboxymethyl chitosan-hemicellulose resin for adsorptive removal of heavy metals from wastewater. Chinese Chemical Letters, 28: 625-632.

DRAFT

## Terpenlerin kronik uygulanmasına bağlı olarak ömür uzunluğu toksisitesinin uyarılması

Hatice elik, Handan Uysal\*

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: hauysal@atauni.edu.tr

### zet

Terpenler, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan doğal ürünlerin en yaygın gruplarından birisidir. oğunluğu bitkisel kökenlidir ve gıdalarda aroma bileşeni olarak önemlidirler. Bazı bitkilerde birkaç terpen bulunabilir. İçerdikleri izopren sayısına göre de monoterpenler, diterpenler, triterpenler olarak isimlendirilirler. Nane ve kekikte bulunan timol bir monoterpendir. Abietik asit kozalaklı ağaçlarda bulunan bir diterpen çeşididir. Skualen de buğday ve pirinç gibi bitkilerde bulunur ve triterpendir. Çalışmamızda timol (TM), abietik asit (ABA) ve skualen (SKU) terpenlerinin doz-süre etkileşimine bağlı olarak ömür uzunluğu üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Kronik uygulamalar için *Drosophila melanogaster*'in  ve  bireyleri kullanılmıştır. Deneylemiz için *D.melanogaster*'in dişi ve erkek popülasyonlarıyla kontrol ve uygulama grupları hazırlanmıştır. Bunlar Standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) içeren saf su kontrol ve DMSO kontrol ile SDB+TM/ABA/SKU'nun farklı dozlarını içeren (25,50,100,200ppm) uygulama gruplarıdır. Kontrol ve uygulama gruplarında 100 ergin birey kullanılmıştır. Tüm bireyler haftada iki kez taze besiyerlerine aktarılmış ve her aktarımda ölen bireyler kaydedilmiştir. Uygulamalar  kez tekrar edilmiştir. Elde edilen verilere göre, ortalama ömür uzunluğu DMSO kontrol grubu  popülasyonunda  $49,07 \pm 1,92$ ,  popülasyonunda ise  $51,01 \pm 2,12$  gündür. Ortalama mr uzunluğuna ait bu değerler, uygulama gruplarında her  terpenin doz artışına bağlı olarak gerilemiştir ( $P < 0,05$ ). şöyle ki;  popülasyonu için ortalama ömür uzunluğu en yüksek uygulama grubunda (200ppm) TM için  $23,09 \pm 0,74$ , ABA için  $26,96 \pm 0,94$ , SKU için  $9,24 \pm 0,44$ ;  popülasyonunda ise TM için  $24,89 \pm 1,10$ , ABA için  $23,21 \pm 0,92$  ve SKU için de  $8,98 \pm 0,46$  gn olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Drosophila melanogaster*, terpenler, mr uzunluğu

### Stimulation of longevity toxicity based on chronic application of terpenes

#### Abstract

Terpenes are one of the most common groups of natural products found in plants and animals. Most of them are vegetable origin and are important as a component of aroma in foods. Some plants may contain several terpenes. According to the number of isoprene they are called monoterpenes, diterpenes, triterpenes. The thymol found in mint and thyme is a monoterpene. Abietic acid is the a diterpene variety found in conifer trees. Squalene is found in plants such as wheat and rice and is triterpene. In our study, the effects of thymol(TM), abietic acid(ABA) and squalene(SKU) terpenes on the lifespan due to dose-time interaction were investigated. For chronic applications, Å and Å individuals of *Drosophila melanogaster* were used. For our experiments, control and application groups were prepared with female and male populations of *D.melanogaster*. These are application groups containing Standard *Drosophila Media* (SDM) distilled water, DMSO control and different doses of SDM+TM/ABA/SKU (25,50,100,200ppm). 100 adult individuals were used in the control and application groups. All individuals were transferred to fresh media twice a week and individuals who died at each transfer were recorded. Applications have been repeated three times. According to the data obtained, the average lifespan in the DMSO control group was  $49.07 \pm 1.92$  in the  population and  $51.01 \pm 2.12$  days in the  population. These values were decreased in the application groups due to the dose increase of all three terpenes ( $P < 0.05$ ). Namely; The mean lifespan in the highest applied group for the  population was  $23.09 \pm 0.74$  for TM,  $26.96 \pm 0.94$  for ABA and  $9.24 \pm 0.44$  days for SKU; in the  population was found to be  $24.89 \pm 1.10$  for TM,  $23.21 \pm 0.92$  for ABA and  $8.98 \pm 0.46$  days for SKU.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*, terpenes, longevity

## GİRİŞ

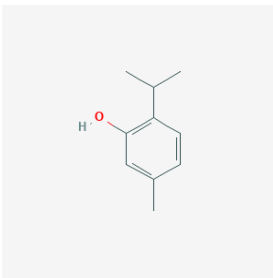
Bitkilerde ve hayvanlarda farklı işlevleri olan terpenler, sekonder metabolit olarak doğal ürünlerin en yaygın gruplarından birisidir. Bunlar esansiyel yağ, reçine, mum ve kauçuk gibi doğal ürünlerin ana bileşenini oluştururlar (Başer ve ark., 2005). Terpenler izopren sayısına göre monoterpenler, diterpenler, triterpenler olarak alt gruplara ayrılırlar. Bir monoterpen olan timol (TM) iki izopren biriminden oluşur ve kekik, nane, kimyon, okaliptüs gibi bitkilerde, dört izopren biriminden oluşan abietik asit (ABA) ise diterpen olarak kozalaklı ağaçlarda bulunmaktadır. Skualen (SKU) altı izopren birimi taşıyan bir triterpendir ve pirinç, buğday, zeytinyağı gibi bitkiler ile özellikle köpek balığı karaciğerinde bulunduğu bilinmektedir. Terpenlerin çoğunluğu bitkisel kökenli olup gıdalarda aroma bileşeni olarak önemlidirler. Özellikle iğne yapraklı bitkiler tarafından üretilirler. Ancak Papilionidae (kılıçkuyruklular) familyasına ait kelebeklerin de terpen salgıladıkları bilinmektedir. Limon, çam, karanfil, nane, gül gibi çeşitli bitkilerin meyve, kök, tohum ve yaprak gibi kısımlarının hoş koku ve tatları terpenlerden kaynaklanmaktadır. Limonda limonen, çam ağaçlarında pinen, karanfilde öjenol ve gülde geraniyol terpenleri bulunmaktadır. Domates, lahana, havuç, ıspanak, biber, kavun ve greyfurt da retinol bakımından zengindir. Yine triterpenlerden olan stigmasterol bir fitosteroldür. Bu terpen karabiber, soya, kakao çekirdeği ve fındık gibi birçok bitki yağında bulunmaktadır.

Terpenler, özellikle son yıllarda kimyasal yapıları ve farklı organizmalar üzerindeki etkileri bakımından yoğun olarak çalışılan kimyasal maddelerin bir grubudur. Ticari olarak da gıda, temizlik, tıp, eczacılık, kozmetik gibi alanlarda fitoterapi ve aromaterapi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Hammer ve ark.,1999; Mouhssen 2004). Ancak bu maddelerin kullanımında doz-süre etkileşimi önemli midir? Farklı bir bakış açısıyla bu maddeler canlılarda ömür uzunluğu üzerinde nasıl bir etkiye sahiptirler?

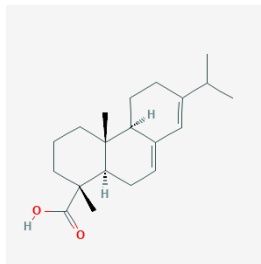
Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'in (Diptera;Drosophilidae) yabancı soyuna ait ergin erkek ve dişilere kronik olarak farklı dozlarda timol, abietik asit ve skualen terpenleri uygulanmış ve bu bireylerin maksimum ömür uzunluğu ile ♀ ve ♂ popülasyonunun ortalama ömür uzunluğu üzerinde terpenlerden kaynaklanan/kaynaklanabilecek olası değişiklikler araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

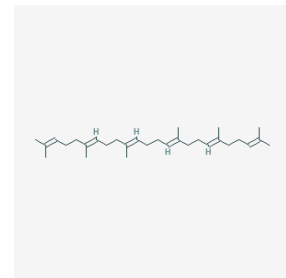
Bu çalışma için halk arasında meyve sineği ya da sirke sineği olarak bilinen ve genetik denemelerinde model organizma olan *D.melanogaster*'in (Diptera; Drosophilidae) herhangi mutant özellik göstermeyen kırmızı gözlü, kahverengi vücutlu ve uzun kanatlı olan Oregon R yabancı soyu (wild type:wt) kullanılmıştır. Bu soya ait aynı yaşlı ve virjin bireyleri elde etmek için, pupadan çıkan ergin erkek ve dişi bireyler beş saatte bir ayrı ayrı toplanmıştır. Hem kontrol hem de uygulama gruplarında üç günlük (72±4 saat) 100♀ ve 100♂ birey ile ayrı ayrı çalışılmıştır. Tüm uygulamalar için iki deney seti oluşturulmuştur. Kontrol grubu distile su ve terpenlerin çözücüsü olan dimetil sülfoksit (DMSO) ile, deney grubu ise TM (Şekil 1), ABA (Şekil 2) ve SKU (Şekil 3)'nun dört farklı dozunu (25, 50, 100, 200 ppm) içeren standart *Drosophila* Besiyeri (SDB) ile hazırlanmıştır. Tüm uygulamalar süresince kontrol grupları yalnızca SDB, deney grupları ise SDB+TM/ABA/SKU'nun farklı dozlarını içeren besiyeri ile beslenmiş ve uygun sıcaklık kabinlerinde (25±1°C), %60 bağıl nem ve karanlık ortamda tutulmuştur. Böylece tüm çevresel faktörlerin stabil kalması, tek değişkenin farklı konsantrasyonlarda uygulanan üç farklı terpen olması sağlanmıştır. Ergin bireyler kronik uygulama için üç günde bir farklı dozlarda terpenleri içeren taze besi yerlerine aktarılmış ve aktarım sırasında ölen bireyler kaydedilerek ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bu işlem en son birey ölünceye kadar sürdürülmüş ve denemeler üç kez tekrarlanmıştır. Hem kontrol hem de deney gruplarına ait sonuçların istatistiksel analizi SPSS 15.0 programı ile yapılmıştır. Bu grupların ortalama ömür uzunluğu değerlerini karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.



Şekil 1. Timolün kimyasal yapısı



Şekil 2. Abietik asitin kimyasal yapısı



Şekil 3. Skualenin kimyasal yapısı



## SONUÇLAR

*D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonunda maksimum ömür uzunluğu saf su kontrol grubu için sırasıyla 77 ve 76 gün iken bu değerler DMSO (terpenlerin çözücüsü) kontrol grubunda her iki popülasyon için 73 gün olarak bulunmuştur. Maksimum ömür uzunluğu bakımından kontrol grupları arasında gözlenen farklılık istatistiki olarak önemli değildir ( $p>0,05$ ). Bu değerler en düşük ve en yüksek terpen uygulama gruplarında (25-200 ppm) ise ♀ popülasyonunda TM için 60-42, ABA için 66-49 ve SKU için 42-21 gün iken ♂ popülasyonunda aynı uygulama gruplarında TM için 54-42, ABA için 56-46 ve SKU için de 28-18 gün olarak bulunmuştur (Tablo1-3). DMSO kontrol ve üç farklı terpen uygulanmış her iki popülasyonun maksimum ömür uzunluğu değerleri birbiriyle karşılaştırıldığı zaman gözlenen gerileme anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 1.** Kronik timol uygulanmış *D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğunun karşılaştırılması

TİMOL								
Deney grupları	♀				♂			
	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)
Kontrol (1)	100	77	49,39 ± 1,96	1-4,5,6* 2-4,5,6* 3-4,5,6* 4-6*	100	76	51,37 ± 2,16	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6* 3-4,5,6* 4-6*
DMSO (2)	100	73	49,07 ± 1,92		100	73	51,01 ± 2,12	
25 ppm (3)	100	60	44,49 ± 1,40		100	54	43,20 ± 1,10	
50 ppm (4)	100	54	37,38 ± 1,45		100	51	32,50 ± 1,16	
100 ppm (5)	100	51	33,04 ± 1,15		100	51	29,08 ± 0,92	
200 ppm (6)	100	42	23,09 ± 0,74		100	42	24,89 ± 1,10	
Regresyon Düzeyi	R=-0,511				R=-0,555			

**Tablo 2.** Kronik abietik asit uygulanmış *D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğunun karşılaştırılması

ABİETİK ASİT								
Deney grupları	♀♀				♂♂			
	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)
Kontrol (1)	100	77	49,39 ± 1,96	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6* 3-5,6*	100	76	51,37 ± 2,16	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*
DMSO (2)	100	73	49,07 ± 1,92		100	73	51,01 ± 2,12	
25 ppm (3)	100	66	33,45 ± 1,34		100	56	29,00 ± 1,76	
50 ppm (4)	100	60	29,24 ± 0,97		100	53	27,82 ± 0,99	
100 ppm (5)	100	56	24,63 ± 1,34		100	49	25,60 ± 0,94	
200 ppm (6)	100	49	26,96 ± 0,94		100	46	23,21 ± 0,92	
Regresyon Düzeyi	R=-0,521				R=-0,563			

**Tablo 3.** Kronik skualen uygulanmış *D.melanogaster*'in ♀ ve ♂ popülasyonlarında maksimum ve ortalama ömür uzunluğunun karşılaştırılması

SKUALEN								
Deney grupları	♀♀				♂♂			
	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)	Birey sayısı	Maksimum ömür uzunluğu	Ortalama ömür uzunluğu±SH	Önem kontrolü* (P<0,05)
Kontrol (1)	100	77	49,39 ± 1,96	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6* 5-6*	100	76	51,37 ± 2,16	1-3,4,5,6* 2-3,4,5,6*
DMSO (2)	100	73	49,07 ± 1,92		100	73	51,01 ± 2,12	
25 ppm (3)	100	42	14,18 ± 1,27		100	28	7,24 ± 0,46	
50 ppm (4)	100	32	11,04 ± 0,79		100	21	8,73 ± 0,38	
100 ppm (5)	100	25	15,45 ± 0,69		100	18	11,44 ± 0,43	
200 ppm (6)	100	21	9,24 ± 0,44		100	18	8,98 ± 0,46	
Regresyon Düzeyi	R=-0,681				R=-0,679			

Elde edilen veriler ile ortalama ömür uzunluğu da distile su ve DMSO kontrol grubunda sırasıyla ♀ popülasyonu için 49,39±1,96, 49,07±1,92, ♂ popülasyonu için de 51,37±2,16 ve 51,01±2,12 gün olarak bulunmuştur (P>0,05). Ortalama ömür uzunluğuna ait bu değerler, uygulama gruplarında kullanılan tüm terpenlerin doz artışına bağlı olarak gerilemiş (P<0,05) ve hem ♀ hem de ♂ popülasyonunda doz-süre

etkileşimi ile ömür uzunluğu azaldığı için negatif korelasyon da gözlenmiştir. Şöyle ki; ♀ popülasyonu için DMSO kontrol grubunda 49,07±1,92 gün olan ortalama ömür uzunluğu en yüksek uygulama grubunda (200 ppm) TM için 23,09±0,74, ABA için 26,96±0,94, SKU için 9,24±0,44 güne; ♂ popülasyonunda ise 51,01±2,12 gün olan ömür uzunluğu TM için 24,89±1,10, ABA için 23,21±0,92 ve SKU için de 8,98±0,46 güne kadar gerilemiştir. Ayrıca artan doza bağlı olarak ömür uzunluğunda gözlenen azalma için her iki popülasyona ait negatif korelasyon değerleri (Regresyon düzeyi) de hesaplanmıştır. Bu değerler ♀♀'de TM için R:-0,511, ABA için R:-0,521 ve SKU için R:-0,681; ♂♂'de ise TM, ABA ve SKU için sırasıyla R:- 0,555, R:- 0,563 ve R:- 0,679 olarak bulunmuştur (Tablo1-3).

## TARTIŞMA

Büyük bir çoğunluğu bitkisel kökenli olan terpenler, dış hekimliği, ağız bakım ürünleri, parfümeri, boya sanayi, madencilik ve gıda ile ilgili sektörlerde geniş ölçüde kullanılmaktadır (Çalikoğlu ve ark., 2006). Bu kullanım alanları günlük yaşantımızda bizleri yakından ilgilendirdiği ve toplum sağlığı her şeyden önce geldiği için terpenler son zamanlarda birçok bilim insanının ilgisini çekmiş ve onların kimyasal yapıları ile biyolojik aktiviteleri incelenmiş ve incelenmeye devam edilmektedir.

Günümüzde tıbbi bitkilerin, bu bitkilere ait uçucu yağ ve onların ana bileşeni olan terpenlerin saf olarak elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden oldukça önemlidir (Başer ve ark., 2005). Terpenler ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda özellikle onların mutajenik ve genotoksik etkili olup olmadıkları belirlenmeye çalışılmaktadır. Örneğin *Mentha spicata* (kivircik nane)'den elde edilen menton ve *Pinus sylvestris* L. (sarı çam)'den elde edilen pine uçucu yağlarının genotoksik ya da mutajenik etkileri, kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmış ve bu maddelerin *D. melanogaster*'de mutant klon oluşumunu uyararak genotoksisiteye sebep olduğu belirlenmiştir (Franzios ve ark., 1997). Aynı araştırmacı tarafından yapılan *in vitro* bir diğer çalışmada, yine hem menton hem de pine'nin insan lenfosit hücrelerinde de genotoksisiteye sebep olduğu saptanmıştır. Rao ve ark., (2016) *D. melanogaster*'de çoğunlukla Papilionaceae (Fabaceae), Mimosaceae, Cesalpiniaceae familyalarına ait türlerden elde edilen rotenon terpenini kullanmışlar ve bu terpenin de oksidatif strese, mitokondriyal disfonksiyona ve nörotoksisiteye yol açtığını gözlemişlerdir. Azirak ve Rencuzogullari (2008)'na göre karvakrol ve timol fare kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliklerini, Buyukleyla ve Rencuzogullari (2009)'na göre de yine timol insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimlerini uyarmaktadır.

Kozmetik alanında cilt iyileştirici olarak kullanılan ve seskiterpenlerin bir çeşidi olan guazulen terpeninin sıçan nöronları üzerindeki biyokimyasal, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da bu terpenin nöronlar üzerinde antiproliferatif etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca nöronlarda total antioksidan kapasiteyi (TAK) düşürdüğü, total oksidan seviyeyi (TOS) artırdığı da belirlenmiştir (Togar ve ark., 2015). Turkez ve ark., (2014)'a göre, bu terpen insan periferik lenfositlerinde sitotoksisiteyi de uyarmaktadır. Hatta eukaryotik canlıların dışında prokaryotik olan *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 suşlarına yüksek dozlarda uygulanan guazulenin mutasyonu artırdığı Wang ve ark., (2003) tarafından ortaya konulmuştur. Ayrıca bu doğal bileşikler farklı organizmalarda embriyotoksik (Clark 2009), immunotoksik (Moon ve ark., 2011) ve hepatotoksik (Bhardwaj ve ark., 2001) etki de meydana getirmektedir. Bu etkiler bizim çalışmamızda olduğu gibi, muhtemelen doz-süre etkileşimine bağlı olarak oksidatif stresin uyarımı ile oluşmaktadır.

Ayrıca tüm yaşam koşulları stabil tutularak tek değişkenin farklı dozlarda uygulanan TM, ABA ve SKU olduğu bu ve benzeri çalışmalarda çevresel ajana/ajanlara bağlı olarak mutasyonların uyarılması ile yağ sentezinin inhibisyonu, hücre siklusunun engellenmesi, P53 birikimi, Ras onkogenlerinin aktivitesine bağlı olarak hücre iletişim yollarının engellenmesi, hücre büyümesinin sınırlandırılması ve hepsine bağlı olarak erken hücre ölümleri sitotoksik etkiyi de uyarmaktadır. Tüm bu mekanizmalar ile uyarılan sitotoksik etki de ömür uzunluğunu sınırlandırabilir. Bizim bulgularımıza göre de muhtemelen kullanılan her üç terpenin sürekli alımı ve doz aşımı *D. melanogaster*'in her iki popülasyonunda "total oksidan seviyesini artırarak ya da yukarıda sayılan farklı mekanizmalar ile sitotoksik etkiyi uyararak ömür uzunluğunu *in vivo* sınırlandırıcı etki ile kısaltmıştır. Bu da popülasyon yaşlanmasına sebep olabilmektedir" diyebiliriz. Farklı alt gruplara dahil olan terpenlerin toksik etkili olabileceğine dair daha önce farklı organizmalar ve farklı *in vivo* test teknikleri kullanılarak yapılmış olan az sayıdaki çalışmaların sonuçları bizim bulgularımızı destekler doğrultudadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (FHD-2019-7000).

## KAYNAKLAR

- Azirak S, Rencuzogullari E 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology*, 23(6): 728-735.
- Başer KHC, Kırimer N, Koşar M, Tunalıer Z 2005. Farmakognozi III Uygulamaları El Kitabı, 13-15.
- Bhardwaj R, Singh A, Sharma OP, Dawra RK, Kurade NP, Mahato SB 2001. Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10,11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. *J. of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(5): 279-286.
- Büyükleyla M, Rencüzoğulları E 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3): 943-947.
- Clark RL 2009. Embryotoxicity of the artemisin in antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. *Reproductive Toxicology*, 28: 285-296.
- Çalıkoglu E, Kırılan M, Bayrak A 2006. Türkiye 9. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı, 24-26 Mayıs 2006, Bolu.
- Franzios G, Mirotsoy M, Hatziaostolou E, Kral J, Zacharias GS, Mavragani-Tsipidou P 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7): 2690-2694.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Moon HI, Cho SB, Lee JH, Paik HD, Kim SK 2011. Immunotoxicity activity of sesquiterpenoids from black galingale (*Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker) against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33: 380-383.
- Mouhssen L 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18: 435-448.
- Rao SV, Muralidhara, Yeniseti SC, Rajini PS 2016. Evidence of neuroprotective effects of saffron and crocin in a drosophila model of parkinsonism. *Neurotoxicology*, 52: 230-42.
- Togar B, Turkez H, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Geyikoglu F 2015. Guaiazulene biochemical activity and cytotoxic and genotoxic effects on rat neuron and N2a neuroblastom cells. *J. Of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(1): 29-33.
- Turkez H, Togar B, Tatar A, Geyikoglu F, Hacimuftuoglu A 2014. Cytotoxic and cytogenetic effects of a-copaene on rat neuron and N2a neuroblastoma cell lines. *Biologia*, 69: 936-42.
- Wang L, Yan J, Fu P, Parekh K, Yu H 2003. Photomutagenicity of cosmetic ingredient chemicals azulene and guaiazulene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 530: 19-26.

## Ready-to-eat foods as a source of *Listeria monocytogenes*

Pınar Şanlıbaba<sup>1</sup>, Nefise Akçelik<sup>2</sup>, Mustafa Akçelik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

<sup>3</sup>Ankara University, Faculty of Sciences, Department of Biology, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: sanlibab@ankara.edu.tr

### Abstract

*Listeria monocytogenes* is widely distributed in the environment and frequently isolated from foods. This bacterium is the causative agent of listeriosis, a foodborne disease with a high fatality rate. The consumption of contaminated food products is the main route of transmission, which can be mainly observed for ready-to-eat (RTE) foods such as cooked meats, desserts, sandwiches, cheese from both raw or pasteurized milk, and fish products. *L. monocytogenes* is ubiquitous nature and many strains are able to survive a broad spectrum of harsh conditions such as acidic environment, low temperature, and high salt concentrations. RTE foods provide a suitable medium for *L. monocytogenes* growth due to their long shelf life (one or more weeks), and low-temperature storage until consumption. Furthermore, since RTE foods are consumed without further cooking, contaminating *L. monocytogenes* remain viable. In addition, cross-contamination may be another reason for the presence of *L. monocytogenes* in RTE foods. All these features make *L. monocytogenes* a foodborne pathogen extremely dangerous for humans. There are several regulations concerning the acceptable microbiological level of *L. monocytogenes* in RTE foods. In the United States, it is 0 CFU/g of *L. monocytogenes* per 25 g of the food sample. However, according to the European Commission Regulations (EC) No. 2073/2005 and No. 1441/2007, the number of *L. monocytogenes* should be less than 100 CFU/g in RTE products at the time of consumption. In Turkey, the Turkish Food Codex has stipulated that *L. monocytogenes* must not be detected at all in the RTE foods. Occurrence of *L. monocytogenes* in RTE foods have been investigated in several countries. Therefore, we aimed to summarize of prevalence of *L. monocytogenes* isolated from RTE foods.

**Keywords:** Prevalence, *Listeria monocytogenes*, ready-to-eat foods

### INTRODUCTION

*L. monocytogenes* is Gram positive, non-spore forming, aerobic to facultative anaerobic psychrotrophic bacteria widespread in both aquatic and terrestrial habitats (Fallah et al. 2013). It has the ability to cause severe diseases in humans and animals. The disease caused by *L. monocytogenes*, known as listeriosis. The major population group at risk for invasive listeriosis is the immunocompromised such as pregnant women, new born babies, elderly people and AIDS patients, with mortality rates ranging between 20 and 40% (Jamali et al. 2013). The main clinical symptoms are meningitis, encephalomyelitis, and new born septicemia an infection may be fatal (Cao et al. 2018). Outbreaks and sporadic cases of listeriosis have been associated with the contamination of various food items, including milk, soft cheese, meat and meat products, vegetables, seafood products, and ready to eat (RTE) foods (Fallah et al. 2013, Byrne et al. 2016). *L. monocytogenes* is ubiquitous in nature and many strains are able to survive a broad spectrum of hard conditions such as acidic environment, low temperatures and high salt concentrations (Noll et al. 2017). This bacterium survives under mild preservation treatment. These features enhance their capacity to colonize food processing environments, contaminate food and make them good indicators of poor hygiene and cross contamination in the food industry (Chemben and Puchooa, 2015).

RTE foods means products that are intended by the producer for direct consumption by humans without the need for thermal treatment such as cooking that will eliminate or reduce to acceptable level, microorganisms of concern. RTE food products can be contaminated with *L. monocytogenes* due to broad exposure to cross contamination during post processing steps such as slicing, peeling and packaging (Chemben and Puchooa, 2015). RTE foods are generally associated with processed foods with a long shelf life that are kept at refrigeration temperatures. They are associated with a high risk or transmission of *L. monocytogenes* (Gurler et al. 2015, Kramarenko et al. 2016). Several studies in the world have shown that different kinds of RTE foods were a vehicle for transmission of *L. monocytogenes* to consumers, as can see in Table 1. In addition, there are several studies on prevalence of *L. monocytogenes* from RTE foods in Turkey, as can see in Table 2.

There are several regulations concerning the microbiological level of *L. monocytogenes* in RTE foods. In the United States, the microbiological criterion is 0 CFU of *L. monocytogenes* per 25 g sample of RTE foods.

However, according to the European Commission Regulations (EC) No. 2073/2005 and No. 1441/2007, the number of *L. monocytogenes* should be less than 100 CFU/g in RTE products at the time of consumption (Awaisheh, 2010, Kurpas et al. 2018). In Turkey, the **Turkish Food Codex has stipulated that *L. monocytogenes* must not be detected at all in the RTE foods.**

**Table 1.** Prevalence of *L. monocytogenes* strains in ready-to-eat foods in different countries

Prevalence of <i>L. monocytogenes</i> (%)	Country	References
8.1	Greece	Angelidis and Koutsoumanis, 2006
2.97	Florida	Shen et al. 2006
18	Latvia	Berzins et al. 2009
6.2	Spain	Garrido et al. 2009
30	Serbia	Dimic et al. 2010
10.0	Italy	Pinto et al. 2010
15.4	Japan	Indrawattana et al. 2011
18.2	Jordan	Osaili et al. 2011
2.6	Algeria	Bouayad and Hamdi, 2012
5	British Columbia	Kovacevic et al. 2012
14	Sweden	Lambertz et al. 2012
3.1	Brazil	Sant'Ana et al. 2012
3.9	Nigeria	Ieren et al. 2013
11.4	Malaysia	Jamali et al. 2013
6.1	Greece	Soultos et al. 2014
23.1	Mauritius	Chemben and Puchooa, 2015
6.25	Ethiopia	Garedew et al. 2015
17.14	Spain	Gomez et al. 2015
6.87	China	Shi et al. 2015
5.3	China	Wang et al. 2015
2.95	Iran	Abdollahzadeh et al. 2016
11.0	Estonia	Kramarenko et al. 2016
7.5	Thailand	Vongkamjan et al. 2016
16.66	Egypt	Yehia et al. 2016

**Table 2.** Prevalence of *L. monocytogenes* strains in ready-to-eat foods in Turkey

Prevalence of <i>L. monocytogenes</i> (%)	City	References
6.16	Ankara	Yücel et al. 2005
3.9	Bursa	Çetinkaya et al. 2014
22.10	Konya	Doğruer et al. 2015
15.8	Ankara	Kocaman and Sarımeçmetoğlu, 2017

#### What can we do for protecting of contamination of RTE food with *L. monocytogenes*?

1. **Storage time and conditions are important aspects in safety of RTE foods.** RTE foods should be stored low-temperature storage until consumption.
2. **During production of this kind of foods, it is important to use a raw food free of *L. monocytogenes***
3. **Raw food materials can be located to other parts of production facility.**
4. A proper hygienic system can prevent the cross-contamination with *L. monocytogenes*.

#### CONCLUSION

Human factor plays an important role, especially employees for contamination of *L. monocytogenes*. They don't comply with proper hygiene rules and may be vectors of *L. monocytogenes* along the food chain. In addition, it is always being important to implement system to be aware of the emergence and spread of foodborne pathogens.

## REFERENCES

- Abdollahzadeh E, Ojagh SM, Hosseini H, Irajian G, Ghaemi EA. 2016. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. *LWT-Food Science and Technology*, 73: 205-211.
- Angelidis, AS, Koutsoumanis K. Prevalence and Concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the helenic retail market. *Journal of Food Protection*, 69: 938-942.
- Awaishah A. Incidence and contamination level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in ready-to-eat meat products in Jordan. *Journal of Food Protection*, 73: 535-540.
- Berzins A, Terentjeva M, Korkeala H. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Meat Products at Retail Markets in Latvia. *Journal of Food Protection*. 72(6): 1283-1287.
- Bouayad L, Hamdi TM. Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23:397-399.
- Bryne VV, Hofer E, Vallim DC, Almeida RCC. 2016. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 438-443.
- Cao X, Wang Y, Wang Y, Ye C. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the black-headed gull feces in Kunming, China. *Journal of Infection and Public Health*, 11:59-63.
- Chemben SS, Puchooa D. Isolation and Characterization of *Listeria* Species from Ready-to-eat raw pork sausages processed in Mauritius. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3: 312-320.
- Çetinkaya F, Mus TE, Yibar A, Güçlü N, Tavşanlı H, Cıbık R. 2014. Prevalence, Serotype Identification by Multiplex polymerase chain reaction and Antimicrobial Resistance Patterns of *Listeria monocytogenes* Isolated from Retail Foods. *Journal of Food Safety*. 34:42-49.
- Dimic GR, Kocic-Tanackov SD, Jovanov OO, Cvetkovic DD, Markov SL, Velicanski AS. 2010. Presence of *Listeria* Species in Fresh Meats from Retail Markets in Serbia. *Apteft*, 41: 12-6
- Doğruer Y, Telli N, Telli AE, Güner A. Presence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in retail meat and meat products. *International Journal of Biological Research*, 3(2): 76-81.
- Fallah AA, Saei-Dehkordi SS, Mahzounieh M. 2013. Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food Control*, 34: 630-635.
- Garedew L, Taddese A, Biru T, Nigatu S, Kebede E, Ejo M, Fikru A, Birhanu T. 2015. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria* species from ready-to-eat foods of animal origin in Gondor Town, Ethiopia. *BMC Microbiology*, 15:100.
- Garrido VG, Vitas AI, Garcia-Jalon I. 2009. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*, 20: 986-991.
- Gomez D, Iguacel LP, Rota MC, Carraminana JJ, Arino A, Yangüela J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods*, 4:271-282.
- Gürler Z, Pamuk S, Yildirim Y, Ertas N. 2015. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 196: 79-83.
- Ieren II, Bello M, Kwaga JKP. 2013. Occurrence and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables and vegetable salads sold in Zaria, Nigeria. *African Journal of Food Science*, 7: 334-338.
- Indrawattana N, Nibaddhasobon T, Sookrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, Makino S, Tungyong W, Chaicumpa W. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and molecular Methods. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 29(1): 26-38.
- Jamali H, Chai LC, Thong KL. 2013. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32: 19-24.
- Kocaman N, Sarımeçmetoğlu B. 2017. Isolation of *Listeria monocytogenes* in lamb meat and determination of the antibiotic resistance. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 64: 273-279.
- Kovacevic J, Mesak LR, Allen KJ. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia, Canada. *Food Microbiology*, 30: 372-378.
- Kramarenko T, Roasto M, Keto-Timonen R, Maesaar, M, Meremae K, Kuningas M, Horman A, Korkeala H. 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level. *Food Control*, 67: 48-52.

- Kurpas M, Wiczorek K, Osek J. 2018. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. Journal of Veterinary Research, 61: 49-55.
- Lambertz ST, Nilsson C, Bradenmark A, Sylven S, Johansson A, Jansson LM, Lindblad M. 2012. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. International Journal of Food Microbiology, 160: 24-31.
- Nol M, Kleta S, Al Dahouk S. 2017. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. Journal of Infection and Public Health. In press.
- Osaili TM, Alaboudi AR, Nesiari EA. Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. Food Control. 22: 586-590.
- Sant'Ana SA, Igarashi MC, Landgraf M, Destro MT, Franco BDGM. 2012. Prevalence, populations and phenol- and genotyping characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to eat vegetables marketed in Sao Paulo, Brazil. International Journal of Food Microbiology. 155: 1-9.
- Shen, Y, Liu Y, Zhang Y, Cripe J, Conway W, Meng J, Hall G, Bhgwat AA. 2006. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. Applied and Environmental Microbiology, 72: 5073-5076.
- Shi W, Qingping W, Jumei Z, Moutong C, Zean Y. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. Food Control, 47: 340-347.
- Soultos N, Iossifidou E, Tzikas Z, Sergelidis D, Lazou T, Drakopoulos G, Konstantelis I. 2014. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood marketed in Thessaloniki (Northern Greece). Veterinary World 7(11): 1004-1009.
- Wang G, Qian W, Zhang X, Wang H, Ye K, Bai Y. 2015. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. Food Control. 50: 202-208.
- Vongkamjan K, Fuangpaiboon J, Turner MP, Vuddhakul V. Various Ready-to-Eat Products from Retail Stores Linked to Occurrence of Diverge *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. Journal of Food Protection, 79(2): 239-245.
- Yehia HM, Ibraheim SM, Hassanein WA. 2016. Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15(5): 1047-1052.
- Yücel N, Çıtak S, Önder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology, 22: 241-245.



## Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from cheeses in Ankara

Ayşe Nur Akpınar\*, Merve Arikan, Sema Er, Tuba Tunç, Pınar Şanlıbaba

Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara/Turkey

\*Corresponding author e-mail: aysenur.akpinar95@gmail.com

### Abstract

Cheese is the most popular type of food by all socioeconomic classes in Turkey due to its nutritional value, convenience and good test. The traditional method for cheese production affords many opportunities for microbial contamination. Therefore, it can be considered as a good medium for the growth of different types of spoilage and pathogenic microorganisms. One of them is *Staphylococcus aureus*. The aim of the present study was to allow qualitative checking of hygienic conditions of the examined cheese samples for the prevalence of *S. aureus* in Ankara. A total of 60 random locally manufactured cheese samples were collected from different markets, bazaars including homemade cheeses and white cheeses under aseptic conditions. The samples were collected in dry, clean and sterile glass containers and sent immediately in an ice box to the laboratory. In brief, 10 grams of samples were diluted in 90 mL in sterile Ringer's solution and homogenized in a laboratory blender. Then, 100 µL of each samples were surface plated on Baird Parker agar. Presumptive *S. aureus* colonies were identified by standard microbiological tests which included Gram -; catalase and oxidation testing. In this study, 9 samples were contaminated with *S. aureus*. In conclusion, lower prevalence of *S. aureus* in cheese samples (15%, 9/60) in Ankara was recorded.

**Keywords:** Prevalence, *Staphylococcus aureus*, Cheese

### INTRODUCTION

*Staphylococcus aureus* is Gram positive, toxic bacterium, causing diarrhea and abdominal pain with a very short incubation period (Jang et al. 2018). *S. aureus* is an osmotolerant bacterium and can survive at low water activities for extended periods. However, it has a weakly competitive ability (Can et al. 2017). This bacterium can multiply in a range of foods, with dairy products being the food type most often implicated in infections (Murphy et al. 2010). The primary habitat of *S. aureus* is in the nasal passages and on the skin and hair of warm blooded animals and hence the sources from which this organism enters foods are mostly human and animal origin. Food handlers can be a source of the spread of *S. aureus* (Miranda et al. 2009; Güven et al. 2010). Staphylococci are isolated from a wide range of foodstuff such as meat, cheese and milk, and from environmental sources such as soil, sand, air and hand (Soares et al. 2011).

Cheese is important milk products with its nutritional value and unique flavor and aroma, which has a very important place both in terms of food sector and consumer in processing of milk (Baran et al. 2017). The pasteurization of raw milk for cheese production at an adequate temperature and time period usually kills *S. aureus* (Mehli et al. 2017). The source of *S. aureus* contamination could be multi factorial, such as raw milk, food handlers, food-contact and non-contact surfaces (Rodrigues et al. 2017). Foodborne disease is associated with enterotoxins production and requires an increase of *S. aureus* counts above 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cfu/g (Spanu et al. 2012). The aim of the present study was to isolate of *S. aureus* from white cheese samples collected from Ankara.

### MATERIALS AND METHODS

#### Cheese sampling

A total of 60 white cheese samples were collected from local bazaars in Ankara. The samples were transported to the laboratory in aseptic conditions by providing a cold chain.

#### Isolation and identification of *Staphylococcus aureus*

Samples were processed for the detection of *S. aureus*. A portion of 10 g cheese was homogenized with 90 mL sterile ¼ Ringer's solution. Decimal serial dilutions were prepared, and each dilution was inoculated on Baird Parker agar (Merk, Germany) supplemented with egg yolk-tellurite emulsion (Merk, Germany). Plates were incubated at 37 °C for 24-48 hours. Then, 5 colonies (black shiny with a narrow zone of opacity surrounded by a zone of clearing) were enumerated and subsequently taken for confirmatory testing (Pereira et al. 2018). These pure cultures were examined for colony and cell morphology, Gram staining, catalase and oxidase activity.

## RESULTS

In this study, 9 out of 60 cheese samples (15%, 9/60) were positive for *S. aureus* (Table 1). Nine suspected *S. aureus* isolates were confirmed by gram staining, catalase test and oxidase test. All of the isolates were gram positive. In addition, all of the isolates were tested for colony and cell morphology, oxidase and catalase activity. All of them were catalase (+) and oxidase (-).

**Table 1.** Occurrence of *S. aureus* in white cheese samples

Sample Number	Sample Date	Sample Type	Origin	<i>S. aureus</i> Presence
1	23.02.2019	Sheep cheese	Gölbaşı Bazaar	Negative
2	23.02.2019	Goat cheese	Gölbaşı Bazaar	Negative
3	23.02.2019	Cow cheese	Gölbaşı Bazaar	Positive
4	24.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Bazaar	Negative
5	24.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Bazaar	Negative
6	24.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Bazaar	Negative
7	24.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Sales Center	Negative
8	24.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Sales Center	Negative
9	24.02.2019	Brine cow cheese	Ulus Bazaar	Negative
10	24.02.2019	Tulum cheese	Ulus Bazaar	Negative
11	28.02.2019	Sivas Tulum cheese	Sihhiye Bazaar	Negative
12	27.02.2019	Cow cheese	Gölbaşı Bazaar	Negative
13	26.02.2019	Konya Tulum cheese	Bahçelievler Bazaar	Negative
14	26.02.2019	Konya Tulum cheese	Bahçelievler Bazaar	Negative
15	26.02.2019	Kayseri Tulum cheese	Bahçelievler Bazaar	Negative
16	26.02.2019	Kayseri Tulum cheese	Bahçelievler Bazaar	Positive
17	28.02.2019	Cruse cheese	Çubuk Bazaar	Negative
18	28.02.2019	Cruse cheese	Çubuk Bazaar	Negative
19	28.02.2019	Cruse cheese	Çubuk Bazaar	Positive
20	28.02.2019	Cruse cheese	Çubuk Bazaar	Negative
21	27.02.2019	Herby cheese	Gölbaşı Bazaar	Negative
22	27.02.2019	Herby cheese	Gölbaşı Bazaar	Negative
23	28.02.2019	Konya Tulum cheese	Sihhiye Bazaar	Negative
24	28.02.2019	Herby cheese	Sihhiye Bazaar	Positive
25	26.02.2019	Tulum cheese	Kalecik Bazaar	Positive
26	28.02.2019	Tulum cheese	Akyurt Sales Center	Positive
27	26.02.2019	Tulum cheese	Kalecik Bazaar	Positive
28	26.02.2019	Tulum cheese	Kalecik Bazaar	Negative
29	28.02.2019	Cow cheese	Çubuk Bazaar	Positive
30	05.03.2019	Kayseri Tulum cheese	Ulus Bazaar	Positive

## DISCUSSION

The results revealed that *S. aureus* were isolated from 15% of the cheese samples analyzed. All the isolates were confirmed as *S. aureus* by phenotypic characterization. The prevalence of *S. aureus* contamination observed in this study is consistent with previous work conducted on white cheeses in Turkey (Can, 2011). In contrast to our results, Güven et al. (2008) reported high levels of contamination for cheese samples (33.4%).

## CONCLUSION

This study showed weak prevalence of cheese contaminated with *S. aureus*. In conclusion, sanitary measures are needed to guarantee the quality of cheese.

## REFERENCES

- Baran A, Erdoğan A, Turgut T, Adıgüzel MC. 2017. A review on the presence of *Staphylococcus aureus* in cheese. Turkish Journal of Nature and Science. 6(2): 100-105.
- Can HY. 2011. Farklı tip peynirlerde *Staphylococcus aureus*'ün enterotoksin oluşturma yeteneği ile antibiyotik direncinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, basılmamış.

- Can HY, Elmalı M, Karagöz A. 2017. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk, cheese, minced meat, and chicken meat samples. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37(2): 175-180.
- Güven K, Mutlu MB, Gülbandılar A, Çakır P. 2008. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. Journal of Food Safety, 30: 196-212.
- Jang K, Lee J, Lee H, Kim S, Ha J, Choi Y, Oh H, Yoon Y, Lee S. 2018. Pathogenic characterization and antibiotic resistance of bacterial isolates from farmstead cheeses. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 38(1): 203-208.
- Mehli L, Hoel S, Thomassen GMB, Jakobsen AN, Karlsen H. 2017. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. International Dairy Journal, 65: 20-27.
- Miranda JM, Mondragon A, Vazquez BI, Fente CA, Cepeda A, Franco CM. 2009. Microbial quality and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from conventional and organic "Arzua-Ulloa" cheese. CyTA-Journal of Food, 7(2): 103-110.
- Murphy BP, O'Mahony E, Buckley JF, O'Brien S, Fanning S. 2010. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy animals in Ireland. Zoonoses and Public Health, 57: 249-257.
- Rodrigues MX, Silva NCC, Trevilin JH, Cruzado MMB, Mui TS, Duarte FRS, Castillo CJC, Canniatti SG, Porto E. 2017. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. Journal of Dairy Science, 100: 5167-5175.
- Soares JC, Marques R, Tavaría FK, Pereira JO, Malcata FX, Pintado MM. 2011. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. International Journal of Food Microbiology, 146: 123-129.
- Spanu V, Spanu C, Viridis S, Cossu F, Scarano C, De Santis EPL. 2012. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 153: 53-57.

## Mathematical modelling of the *Mytilus Edulis* dried by the method of oven

Selim Sungu, Semra Aslanbey, Azmi Seyhun Kipcak\*

Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: skipcak@yildiz.edu.tr

### Abstract

*Mytilus Edulis* (blue mussel) is a healthy food that lives in rocky and earthy areas and can be consumed raw and cooked. In this study, mathematical modelling of the blue mussels, which were dried in the oven was investigated. Drying temperatures were selected as 60, 70 and 80 °C. Several mathematical models were applied to the moisture content data. According to the drying results, the temperature increase leads to decrease in the drying times. The amount of moisture in the samples was 1.986 kg H<sub>2</sub>O/kg dry matter at the beginning of the drying process, and decreased 0.1381; 0.1362; 0.1231 kg H<sub>2</sub>O/kg dry matter, at the temperatures 60, 70 and 80 °C, respectively. According to the mathematical modelling results, Midilli model had the highest correlation coefficient(R<sup>2</sup>) with the drying data. Highest values of R<sup>2</sup> 0.999306, 0.999304 and 0.999584. The lowest values of  $\chi^2$  0.000086, 0.000096 and 0.000067 and minimum values of RMSE 0.008250, 0.008172 and 0.006333 were determined in the Midilli model for 60, 70 and 80 °C respectively. On the other hand, Peleg's R<sup>2</sup> values were found as 0.982214, 0.989373 and 0.990841 for 60, 70, 80 °C, respectively.

**Keywords:** Drying, Midilli, modelling, *Mytilus Edulis*, oven.

### INTRODUCTION

Drying can be defined as removal of water from process materials and other substances, as well as removal of benzene or other organic liquids from solids in general. Water or other liquids to be removed in drying may be found in the solids very little, or more contained than solid material. It is removed by air in the form of a vapor (Geankoplis, 1993).

Most often, the process of drying is used in the commercial practice as a stage of production preceding the ultimate packaging and sales of products. The process of drying is inherently much complex and involves heat agents used for ensuring the desiccation of materials, and the mass transport (Azizov, 2015). It is very important to dry and remove water the biologically based materials, especially those used in the food industry. This process is used for preservation of food and do not to lose its nutritional value (Geankoplis, 1993). Microorganisms that cause food spoilage, cannot grow and multiply by drying. In addition, the enzymes in the solids cannot work due to lack of water and there are no chemical changes and deteriorations. Microorganisms are not active when water content is below 10%. In addition, if we do not want the odour and nutritional values to be lost, we should reduce the humidity to below 5%. Dried foods can be stored longer (Geankoplis,1993). Among non-food products, some of those that require considerable drying are wood (as part of timber processing), paper, flax, and washing powder. The first two, owing to their organic origins, may develop mold if insufficiently dried. Another benefit of drying is a reduction in volume and weight. Drying is also largely used in the chemical and petrochemical industries, where the dehydration of specific organic compounds is required in order to get usable chemical agents. Drying is also a crucial process for the utilities sector, as it is largely used in sewerage systems for achieving anti-pathogenic protection (Azizov, 2015).

Many drying studies have done with different methods on various marine crustaceans such as; modelling of red abalone (*Haliotis rufescens*) slices drying process effect of osmotic dehydration under high pressure they reported that by increasing temperature drying process time reduces and Midilli and Kucuk model is the best model with R<sup>2</sup> ≥0.97 (Pérez, 2016). A comparison study named effects of different drying methods on texture and rheological properties of Abalone was done to investigate the effects of different drying methods. Solar and hot-air drying compared by their drying rates and changes on microstructure of the abalone. It is seen that the hot-air drying takes less time than solar drying. After rehydration the structure of abalone has changed a lot and its collagen content also changed except crude protein (Xin, 2008). Another study about a different marine crustacean is physical and sensory properties of vacuum microwave dried scallop. In this study drying scallop with using vacuum microwave dryer is investigated and comparison is made with sun and air dried scallops. This study denoted that with high power level (3 W/g) and high vacuum level (0.090 MPa) the quality of dried matter is greater. Also in comparison to other two methods it is found that vacuum microwave drying has higher drying and durability hence has a promising potential on drying industry (Guochen Z., 2004). And

the study of effects of drying methods on the quality of dried sea cucumbers states that when the moisture removal takes into consideration freeze drying process is very favorable compared to sun drying, hot air drying and air drying. Even though quality and appearance is good, freeze drying requires great amount of energy and drying time. They said due to its high cost further investigation must be considered (Valerie N., 2015). On the research of mathematical modelling on the drying process of yellow squat lobster (*Cervimunida jhoni*) fishery waste for animal feed, they study the air drying kinetics of yellow squat lobster fishery waste. Sum square errors, root mean square errors, and Chi-square is used to check the fitness quality of the mathematical models. It was shown that the Modified Page equation presented the best fit quality in this study (Vega-Gálvez, 2009). As it is seen from the literature mathematical modelling of the *Mytilus Edulis* dried by the method of oven was not studied. So the aim of this study is to investigate the drying curves of *Mytilus Edulis* dried by the method of oven and to model the obtained experimental data to the mathematical models widely used in the literature.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of samples

Blue mussel (*Mytilus Edulis*) were obtained on January 2019 from a local supermarket in Istanbul, Turkey (Fig. 1). They were kept in deep freeze until the beginning of the experiment. Before the experiment blue mussels were waited at room temperature (22°C) for one hour in order to thaw of ice and to reach an equilibrium. Similar size blue mussels were chosen with an average diameter of approximately 3.7 cm. Sample of mussels are 100 g of *Mytilus edulis* consists of 12.44 g of protein, 3.83 g of carbohydrate and 2.48 g of fat and has a calorific value of 87 kcal energy. The initial moisture content of *Mytilus Edulis* was obtained using the Infrared Radiation dryer at 105 °C. The initial moisture content of the mussels was calculated to be 66.19 % on wet basis correspondingly it was found to be 1.958 kg water/kg dry matter. They were weighted by Radwag AS 220.R2 digital balance, which has an accuracy of 0.001 g (Radwag, Radom, Poland). After that, they were dried with using oven at 60, 70 and 80 °C.



Figure 4. *Mytilus Edulis*

### Drying experiment

The drying experiment performed using an oven (Nuve EV 018, Turkey) (Fig. 2). 5 blue mussels were placed in watch glass and temperature inside the oven is adjusted to 60, 70 and 80 °C. Blue mussels were putted inside the oven and weighted 30 minutes time interval. The weights were noted. Drying was continued until moisture content dropped under 10% compared to its initial amount. Moisture content decreased with the time passes. It is seen that drying time and temperature is inversely proportional. For instance, the time spent to reach intended moisture content which was below 10% for 80 °C sample was the least among the other temperatures. The dried *Mytilus Edulis* samples were cooled and after cooling they were packed in low-density polyethylene bags. Then, they were placed in a desiccator. After the complement of the experiment, moisture (g) (M), drying rate (DR) and moisture ratios (MR) were calculated according to the Eqs. (1), (2) and (3), respectively.

$$M = \frac{m_w}{m_d} \quad (1)$$

where  $M$ ,  $m_w$ ,  $m_d$  are the moisture content (kg water / kg dry matter), water content (g), dry matter content (g), respectively.

$$DR = \frac{M_{t+dt} - M_t}{dt} \quad (2)$$

where  $DR$ ,  $M_{t+dt}$  and  $t$  are the drying rate (kg water / kg dry matter  $\times$  min), moisture content at  $t + dt$  (kg water / kg dry matter) and drying time (min), respectively.

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_i - M_e} \quad (3)$$

where  $MR$  is the moisture ratio (dimensionless),  $M_t$ ,  $M_e$  and  $M_i$  are the moisture content at selected time, at equilibrium and the initial value in kg water / kg dry matter.



Figure 5. Oven Dryer

### Mathematical modelling

Moisture ratios which are obtained by experiments and times were fitted to find the most suitable drying model for oven, on a computer programme: Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Parameters of models were predicted using a non-linear regression procedure based on the Lavenberg–Marquardt algorithm. The models used are given in Table 1.

Results' suitability was compared by using the coefficient of determination ( $R^2$ ), root mean square error (RMSE) and reduced Chi-square ( $\chi^2$ ) (Kipcak, 2016). Highest  $R^2$  values and lowest  $\chi^2$  and root mean square error values are accepted as best results for estimation.  $R^2$ ,  $\chi^2$  and RMSE equations are given in Eqs. (4), (5) and (6), respectively:

Table 5. Model names and equations (Maldonado et al., 2010) (Kipcak, 2017) (Doymaz et al., 2015)

Model Name	Model equation
Logarithmic	$MR = a \cdot \exp(-kt) + c$
Midilli and Kucuk	$MR = a \cdot \exp(-kt^n) + bt$
Page	$MR = \exp(-kt^n)$
Peleg	$MR = a + t/(k_1 + k_2t)$
Weibull	$MR = a - b \cdot \exp(-(kt)^n)$

\*a, b, c, g, coefficients and n, drying exponent specific to each equation; k,  $k_1$ ,  $k_2$ , drying coefficient specific to each equation; t, time.

$$R^2 \equiv 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (MR_{\text{exp},i} - MR_{\text{pre},i})^2}{\sum_{i=1}^N (MR_{\text{exp},i} - \frac{1}{n} MR_{\text{exp},i})^2} \quad (4)$$

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (MR_{\text{exp},i} - MR_{\text{pre},i})^2}{N-z} \quad (5)$$

$$\text{RMSE} = \left( \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (MR_{\text{pre},i} - MR_{\text{exp},i})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

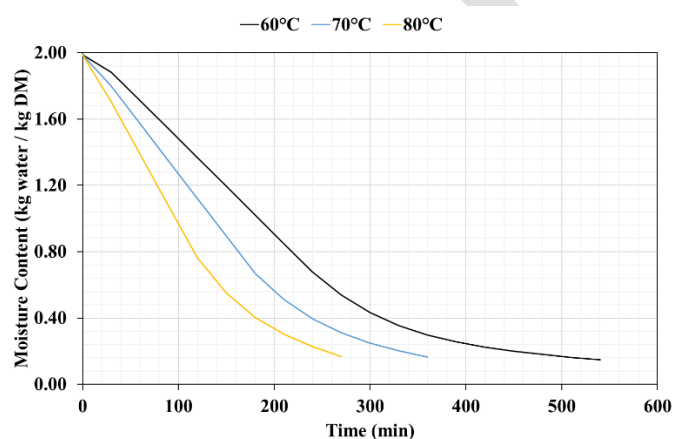
where  $MR_{\text{exp}}$  and  $MR_{\text{pre}}$  show experimental and predicted values of moisture ratios, respectively.  $N$  is the total number of experiments, and  $z$  is the number of constants in the model (Kipcak, 2017).

## RESULTS AND DISCUSSION

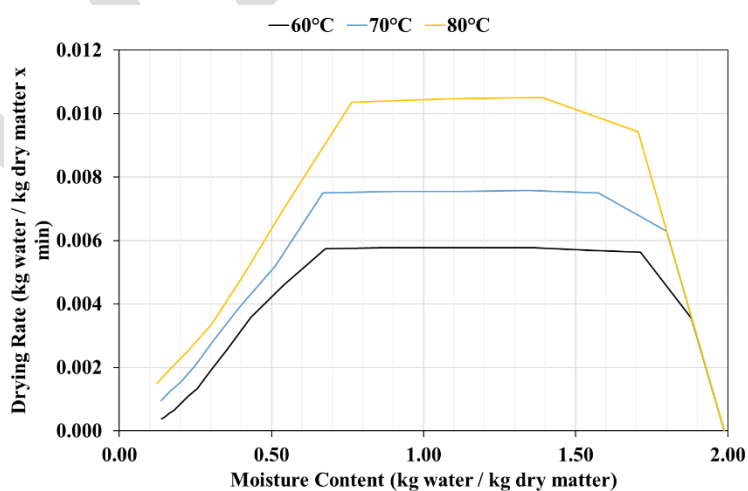
### Drying curves for Blue Mussels dried via oven

The moisture content change with drying time is presented in Fig. 3. Based on the results obtained, the drying for 60, 70 and 80°C lasts 540, 360 and 270 minutes and moisture contents were decreased to 0,1381; 0,1362; 0,1231 kg H<sub>2</sub>O/kg, respectively. When all three curves were examined, the drying time decreased with the increase in temperature.

The drying rate curves of the mussels dried in the oven at different temperatures are shown in Fig. 4. It is seen from the results, the rising-rate period was obtained to the moisture content of 1,7125; 1,5738; 1,3891 kg H<sub>2</sub>O/kg dry matter, the constant-rate period was obtained to the moisture content of 0,6764; 0,6687; 0,7645 kg H<sub>2</sub>O/kg dry matter and falling-rate period was obtained to the moisture content of 0,1381; 0,1362; 0,11231 kg H<sub>2</sub>O/kg dry matter, for the temperatures 60, 70, 80 °C, respectively.



**Figure 3.** Change in the moisture content of blue mussel with time at different temperature.



**Figure 4.** Drying rate of blue mussel with time at different temperatures

## Mathematical modelling for oven

The statistical results are obtained for the oven are given in the Table 2. Among the all mathematical models mentioned before, Midilli and Kucuk model has been found the most suitable model to predict the drying at 60, 70 and 80°C. The highest values of R<sup>2</sup> 0.999306, 0.999304 and 0.999584. The lowest values of  $\chi^2$  0.000086, 0.000096 and 0.000067 and minimum values of RMSE 0.008250, 0.008172 and 0.006333 are determined in the Midilli model for 60, 70 and 80 °C respectively.

**Table 6.** Mathematical model constants and statistical parameters at different temperature in oven

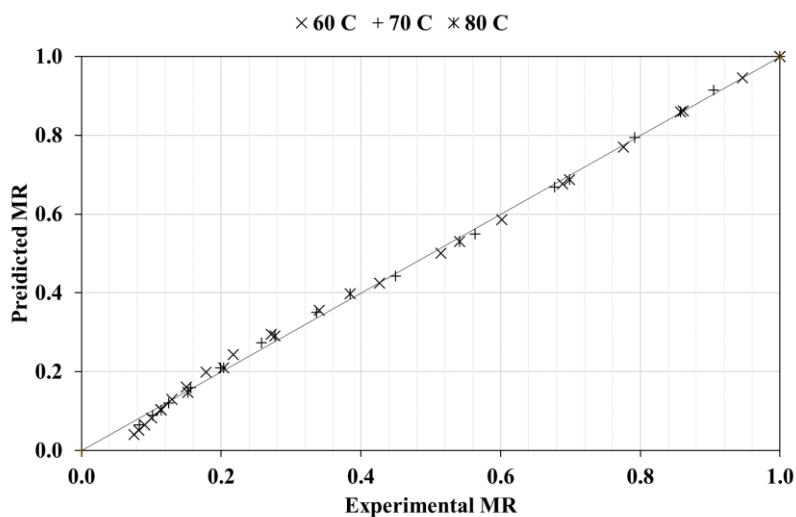
Model	Parameters	60°C	70°C	80°C
Logarithmic	a	1.210626	1.283517	1.205441
	k	0.003633	0.004163	0.006122
	c	-0.141321	-0.240828	-0.172681
	R <sup>2</sup>	0.986828	0.991672	0.993361
	$\chi^2$	0.001534	0.001040	0.000916
	RMSE	0.035942	0.028284	0.025317
Midilli & Kucuk	a	0.986749	0.989118	0.996066
	k	0.000189	0.000504	0.001256
	n	1.588165	1.482393	1.390963
	b	0.000114	0.000102	0.000144
	R <sup>2</sup>	0.999306	0.999304	0.999584
	$\chi^2$	0.000086	0.000096	0.000067
	RMSE	0.008250	0.008172	0.006333
Page	k	0.000478	0.000813	0.001806
	n	1.400868	1.379299	1.302326
	R <sup>2</sup>	0.996821	0.998778	0.998970
	$\chi^2$	0.000348	0.000139	0.000100
	RMSE	0.017655	0.010831	0.008947
Peleg	a	1.0690	1.0420	1.0320
	k <sub>1</sub>	-212.40	-179.40	-128.40
	k <sub>2</sub>	-0.5530	-0.4950	-0.5400
	R <sup>2</sup>	0.982214	0.989373	0.990841
	$\chi^2$	0.002071	0.001327	0.001263
	RMSE	0.041766	0.031950	0.029735
Weibull	b	234.45	173.93	127.77
	a	1.4009	1.3793	1.3023
	R <sup>2</sup>	0.996821	0.998778	0.998970
	$\chi^2$	0.000348	0.000139	0.000124
	RMSE	0.017655	0.010831	0.009968

To validate the selected models, plots of and predicted drying rate and experimental drying rate are illustrated for all drying temperatures (60, 70 and 80°C) by using the most fitting models shown in Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7. These models have 0.995 and higher R<sup>2</sup>.

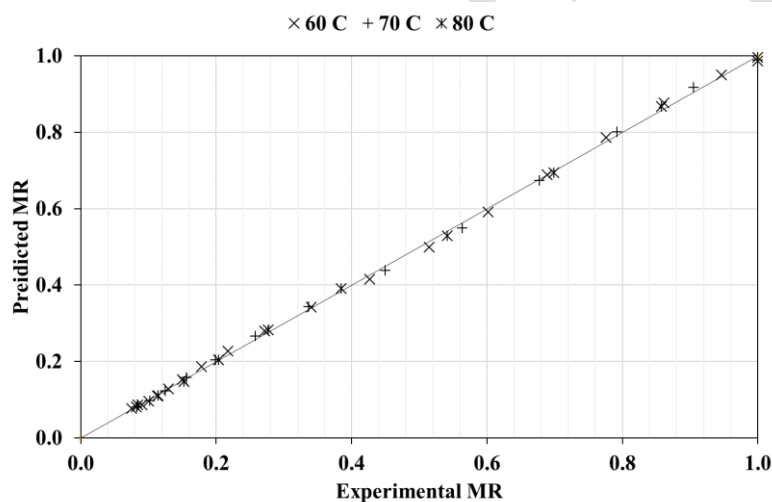
## CONCLUSION

As a conclusion, Midilli and Kucuk model for oven drier had the highest R<sup>2</sup> and lowest  $\chi^2$  and RMSE values. The values were 0.999306, 0.999304, 0.999584 for R<sup>2</sup>, 0.000086, 0.000096, 0.000067 for  $\chi^2$  and 0.008250, 0.008172, 0.006333 for RMSE at the temperatures of 60, 70, 80 °C, respectively. Weibull and Page models also have high R<sup>2</sup>. Weibull have R<sup>2</sup> 0.996821, 0.998778, 0.998970 and Page have R<sup>2</sup> 0.996821, 0.998778, 0.998970 for 60, 70, 80 °C, respectively. Logarithmic and Peleg models have the lowest R<sup>2</sup>. Logarithmic have R<sup>2</sup> 0.986828, 0.991672, 0.993361 and Peleg have R<sup>2</sup> 0.982214, 0.989373, 0.990841 for 60, 70, 80 °C respectively.

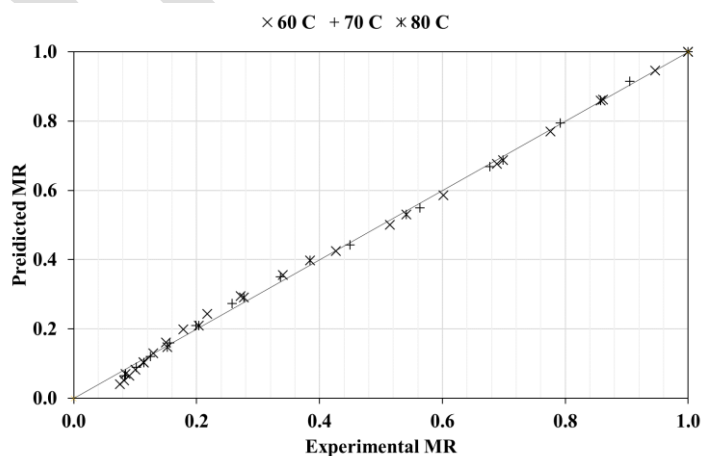




**Figure 5.** Comparison of predicted and experimental drying rate for blue mussels drying using the Page model



**Figure 6.** Comparison of predicted and experimental drying rate for blue mussels drying using the Midilli model



**Figure 7.** Comparison of predicted and experimental drying rate for blue mussels drying using the Weibull model

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Research Fund of the Yildiz Technical University. Project number: “FBA-2018-3423”

## REFERENCES

- Azizov J., (2015). Design of a Chamber Dryer for Sugar Cubes Drying. Prague.
- Doymaz I., Kipcak A. S., & Piskin S. (2015). Characteristics of Thin-layer Infrared Drying of Green Bean. *Czech Journal Food Science*, 33: 83-90.
- Geankoplis C. J. (1993). *Transport Processes & Separation Process Principles*. New Jersey: Pearson.
- Kipcak, A. S. (2017). Microwave drying kinetics of mussels (*Mytilus edulis*). *Research on Chemical Intermediates*, 43(3): 1429-1445.
- Maldonado S., Arnau E., & Bertuzzi M. (2010). Effect of temperature and pretreatment on water diffusion during rehydration of dehydrated mangoes. *Journal of Food Engineering*, 96: 333-341.
- Pérez M., Lemus W. R., Tabilo M. G., Pizarroa M. S., Nomad S., Igurab N, & Shimodab M. (2016 ) *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34: 127-134.
- Xin G., Yaqi Z, Jiachao X, Yaoguang C, & Changhu X. (2008). Effects of different drying methods on texture and rheological properties of Abalone. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 3: 108-115
- Guochen Z., Zhihuai M., Chenxiao M, & Lanlan P. (2004). Physical and sensory properties of vacuum microwave dried scallop. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Engineering*, 20: 141-144
- Valerie N., Chong W., Pindi W., Chye F. Y., & Shaarani S.(2015). *Sabah International Journal of Novel Research in Life Sciences*, 2: 49-64.
- Vega-Gálveza A., Andrésb A., Gonzaleza E., Notte-Cuelloc E., Chacanaa M., & Lemus-Mondacaa R. (2009). *Animal Feed Science and Technology*, 151: 268–279

## Effective moisture diffusivity and activation energy of *Loligo vulgaris* dried by temperature controlled infrared drier

Elay Gur, Zehra Ozden Ozyalcin, Azmi Seyhun Kipcak\*

Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: skipcak@yildiz.edu.tr

### Abstract

In this study, effective moisture diffusivity and activation energy of *Loligo vulgaris* which was dried using infrared (IR) method was investigated. IR drying method was applied with the temperatures of 60, 70 and 80 °C. According to the drying results, the increase in the temperature resulted in the decrease in the drying time. The moisture content in the samples was 3.8752 kg H<sub>2</sub>O/ kg dry matter at the beginning of the drying process, and decreased to 0.1999, 0.1487 and 0.1256 kg H<sub>2</sub>O / kg dry matter, and the drying times observed 277, 240 and 150 minutes at the temperatures of 60, 70 and 80 °C, respectively. The effective moisture diffusivity values for *Loligo vulgaris* were calculated with the use of Fick's second law and found to be  $6.57 \times 10^{-10}$ ,  $7.95 \times 10^{-10}$  and  $1.35 \times 10^{-9}$  at 60, 70 and 80 °C, respectively. Using Arrhenius equation, the activation energy was found as 35.2 kJ/mol.

**Keywords:** *Loligo vulgaris*, effective diffusivity, drying, activation energy, IR.

### INTRODUCTION

Drying is a conventional process commonly used in food preservation for the centuries. A lot of dried materials are consumed or further used in different types of industrial applications. Microorganisms that cause food degradation cannot grow and live in the anhydrous environment. In addition, many enzymes that cause chemical transformation in food products and other biological materials cannot work in the absence of water. For this reason, water content in foods is reduced to less than 5% by weight to maintain flavor and nutrition [1]. In order to reduce the food water activity, dehydration or drying is carried out to improve food stability, thus reducing microbiological activity and minimizing chemical-physical changes during storage. Apart from the preservation of nutrients, the method helps to reduce the ultimate volume and product mass of transportation and storage costs [2, 3].

In recent years, infrared radiation has gained popularity among the drying methods due to its rapid drying rate/response time [4, 5] and superior thermal efficiency. Infrared radiation drying is widely used in different heat treatment systems such as, drying, frying and pasteurization in the food industry [6,7,8]. In infrared drying method, there is no need for a heating medium between the energy source and the material to be dried [9]. The dehydrated material is heated by the direct infrared radiation energy the absorption instead of air heat transfer which the air heated by an energy source first. The radiation impinges on the exposed material and penetrates it and then is transformed to sensible heat [9].

During dehydration of the product, the absorbency decreases, and the transmissivity and the reflectivity increases as the water content decreases in the product [10]. The transmissivity, skin depth and the absorptivity are dependent on the density, the wavelength of infrared radiation heating and on the properties of the irradiated products [2]. Infrared spectrum is absorbed, reflected and allowed to pass through in a fraction in all materials. It is important to select the infrared emitters with the suitable spectra to the product to have an optimized absorption of the radiation to be converted to heat.

The drying process takes place simultaneously with different mechanisms depending on the complexity of the food [11]. Because of its ability to predict the performance of the infrared drying system, modeling of infrared heating of food products is an important approach in the drying industry [9].

Infrared radiation drying advantages include easy control of material temperature, short dehydration time and high heat transfer coefficients [2]. Infrared drying has lower energy consumption than other drying techniques [12, 13].

*Loligo vulgaris*, in other name the European squid, is a large squid belonging to the family Loliginidae. The squid has a long, moderately slender and cylindrical body with a slightly concave posterior border. The head is relatively small with big eyes that are covered with a transparent membrane. There are ten arms around the mouth which eight of them are relatively short, and two are long (tentacles) and are used to catch prey. The natural habitat of *Loligo vulgaris* extends across the Mediterranean and the East Atlantic Ocean from the North

Sea to the Gulf of Guinea. *Loligo vulgaris*, which is shown in the Figure 1, is one of the most economically important myopia squid species in terms of its commercial value in South Europe coasts, and the Mediterranean. It has also been a research target for many years and is therefore one of the best known European cephalopod species [14, 15].



**Figure 1.** *Loligo vulgaris*

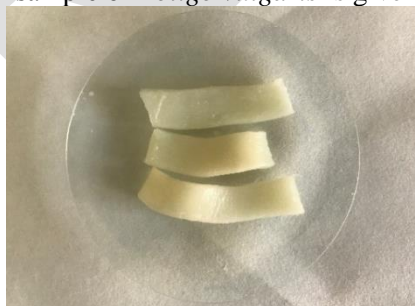
Various agricultural and animal products have been dried by the infrared applications such as; the effects of drying characteristics on the carrots that were evaluated by Toğrul (2006) [16]. He reported that drying time increased with increased infrared power, air temperature and velocity. Infrared drying kinetics of whole mussels and the physical properties investigated by Kipcak et al. (2019) [17]. They reported that both cook loss and area shrinkage increased with increasing drying time and infrared power level. Also, the slight effect of the infrared power changes on color values were expressed. In a study by Ismail and Kocabay (2018) [18] the effect of infrared drying methods on the drying rate, time and color are investigated to compute effective diffusivity and activation energy of rainbow trout. The results of their study showed that diffusion is the dominant physical mechanism governing moisture movements in the fish samples.

However, the effect of temperature on drying rate by infrared radiation and the parameters related to moisture transfer for seafoods have rarely been reported. In the literature, despite the studies about the infrared drying of several products, *Loligo vulgaris* drying kinetics was not studied. Hence, to investigate the effect of temperature on drying rate and to contribute to the published literature, the infrared drying kinetics of *Loligo vulgaris* was studied in this study. Dehydration via infrared radiation parameters were chosen as 60, 70 and 80°C. Moreover, the effective moisture diffusivity and the activation energy calculations were made by the data obtained from the experiments.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of samples

*Loligo vulgaris* was bought from the local market in Turkey and was stored in a deep freeze. The samples were cut as a thin layer (6 mm x 6 mm) before the drying procedure. The samples which average weights 10.0 g, were selected for each drying process. They were measured using a Radwag AS 220.R2 digital balance, which has an accuracy of 0.001 g (Radwag, Radom, Poland). The initial moisture content was determined by using IR at 120°C for 160 min. Fresh sample of *Loligo vulgaris* is given in Figure 2.



**Figure 2.** Prepared sample of *Loligo Vulgaris*

### Drying experiments

Infrared radiation dryer (Radwag, Radom, Poland) is used for drying processes. The temperature value was selected as 60, 70 and 80 °C. The samples of *Loligo vulgaris* were placed in aluminum pan and the samples weight was noted at intervals of 15 minutes from the screen of infrared radiation dryer as seen in the Figure 3.



**Figure 3.** Dried thin layer samples in IR dryer

When the drying process was ended, the samples were cooled at room temperature and then they packed by using polyethylene bags as it is seen in Figure 4. Finally, they were put in a desiccator to keep in safe from moisture. All the experiments were repeated three times. After that, moisture ( $M$ ), drying rate ( $DR$ ), moisture ratio ( $MR$ ), effective diffusivity ( $D_{eff}$ ) and activation energy ( $E_a$ ) were calculated with the equations which are given in Eq. 1, through Eq. 3.



**Figure 4.** Dried thin layer sample of *Loligo vulgaris*

$$M = \frac{m_w}{m_d} \quad (1)$$

where  $M$ ,  $m_w$ ,  $m_d$  are the moisture content (kg water / kg dry matter), water content (g), dry matter content (g), respectively.

$$DR = \frac{M_{t+dt} - M_t}{dt} \quad (2)$$

where  $DR$ ,  $M_{t+dt}$  and  $t$  are the drying rate (kg water / kg dry matter × min), moisture content at  $t + dt$  (kg water / kg dry matter) and drying time (min), respectively.

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_i - M_e} \quad (3)$$

where  $MR$  is the moisture ratio (dimensionless),  $M_t$ ,  $M_e$  and  $M_i$  are the moisture content at selected time, at equilibrium and the initial value in kg water / kg dry matter.

#### Effective Moisture Diffusivity Calculations

For constant values of  $D_{eff}$  and  $\alpha$ , the moisture content is calculated with Eq. 4.

$$\frac{\partial M}{\partial t} = D_{eff} \left[ \frac{\partial^2 M}{\partial x^2} + \frac{a_1}{x} \frac{\partial M}{\partial x} \right] \quad (4)$$

Then analytical solutions of Eq. 6 are given below for infinite slab in Eq. 5.

$$MR = \frac{8}{\pi^2} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{(2i-1)^2} \exp \left[ -\frac{(2i-1)^2 \pi^2 D_{eff} t}{4L^2} \right] \quad (5)$$

where  $D_{eff}$  is the effective moisture diffusivity ( $m^2/s$ ),  $t$  is time(s),  $MR$  is the fractional moisture ratio. For sufficiently long drying times, only the first term ( $i = 1$ ) of the general series solution of Eq. 4 can be used with small error. According to this assumption, Eq. 4 can be written as [19]:

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_i - M_e} = \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_{eff} t}{4L^2}\right) \quad (6)$$

### Activation Energy Calculations

As a consequence, many researchers studied the effect of temperature on  $D_{eff}$ , and this effect can generally be described by an Arrhenius equation given in in Eq. 7:

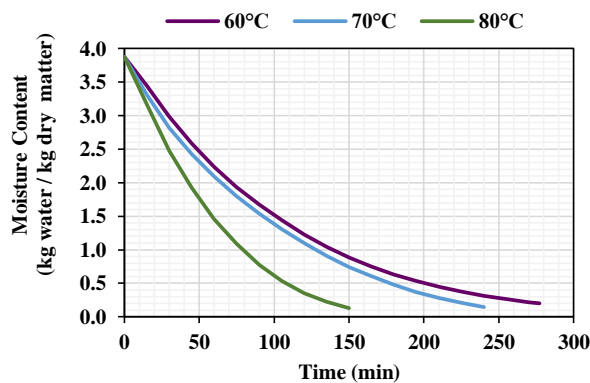
$$D_{eff} = D_0 \exp\left(-10^3 \frac{E_a}{R(T+273.15)}\right) \quad (7)$$

where,  $D_0$  is the Arrhenius factor that is generally defined as the reference diffusion coefficient at infinitely high temperature ( $m^2/s$ ),  $E_a$  is the activation energy for diffusion (kJ/mol),  $R$  is the universal gas constant (kJ/kmol.K). The value of  $E_a$  shows the sensibility of the diffusivity against temperature. Namely, the greater value of  $E_a$  means more sensibility of  $D_{eff}$  to temperature [19].

## RESULTS AND DISCUSSION

### Drying curves

In Figure 5, drying curves of *Loligo vulgaris* at different temperature values are given.

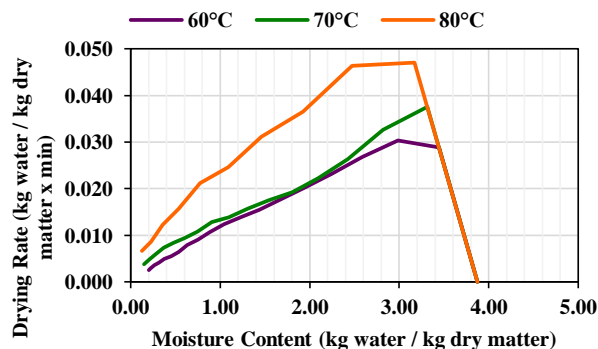


**Figure 5.** Drying curves of *Loligo vulgaris* at different temperature values

The initial average moisture content was determined as 3.8753 kg water/kg dry matter and the value is decreased to 0.1999, 0.1487 and 0.1256 kg water/kg dry matter for 60, 70 and 80 °C, respectively. The samples were reached to these moisture contents 277, 240 and 150 minutes, respectively. At higher radiation intensity, a higher moisture removal rate is observed. Because of absorbed the higher temperature by *Loligo vulgaris*, the drying rate increased with rise in intensity level.

### Drying rate curves

The drying rate curves of the *Loligo vulgaris* samples at the temperatures of 60, 70 and 80 °C are shown in Figure 6. When examined the results, the drying rates are increased as the temperate increase. It can be said the loss of water increases at high temperatures based on the heat and mass transfer. For 60 °C, the rising rate period is seen at between 3.1696 and 2.9874 kg water/kg dry matter. For 80 °C, the rising rate period is seen at between 3.8753 and 3.1696 kg water/kg dry matter. For 70 °C, only the falling rate is observed. The constant rate period is observed at between 2.9874 and 0.2057 kg water/kg dry matter; 2.4737 and 3.1696 kg water/kg dry matter, for 60 and 80°C, respectively.



**Figure 6.** Drying rate curves of *Loligo vulgaris* at different temperature values

### Effective moisture diffusivity values

In Figure 7 is shown the variation of  $\ln(MR)$  versus drying time ( $t$ , sec) for *Loligo vulgaris* which dried at 60, 70 and 80°C. Effective moisture diffusivity values are calculated with the slope method. The values are found as  $6.57 \times 10^{-10}$ ,  $7.95 \times 10^{-10}$  and  $1.35 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s at 60, 70 and 80°C, respectively. According to the results,  $D_{eff}$  values increased with the increase in the temperature.

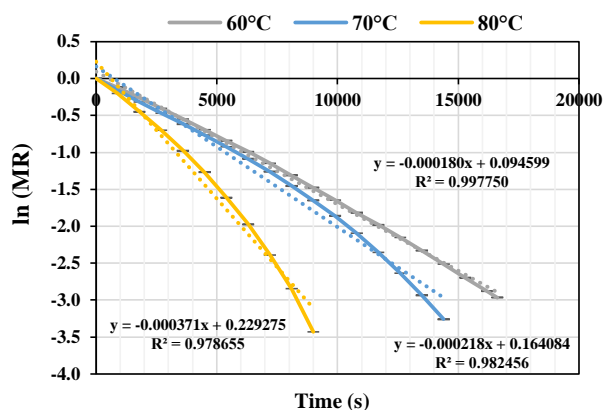


Figure 7. The drying time (s) versus logarithmic moisture ratio for *Loligo Vulgaris*

### Activation energy values

Arrhenius equation is defined the effect of temperature on the diffusivity. The logarithms of effective diffusivities were drawn against the absolute temperature, for determining of the activation energy and it is shown in Figure 8. Activation energy of *Loligo vulgaris* sample was calculated as the slope of the  $\ln(D_{eff})$  vs.  $1/T$  plot. The slope was found as  $4233.9 \times 10^{-3}$  K. When was multiplied with R (8.314 J/mol.K),  $E_a$  was calculated as 35.2 kJ/mol.

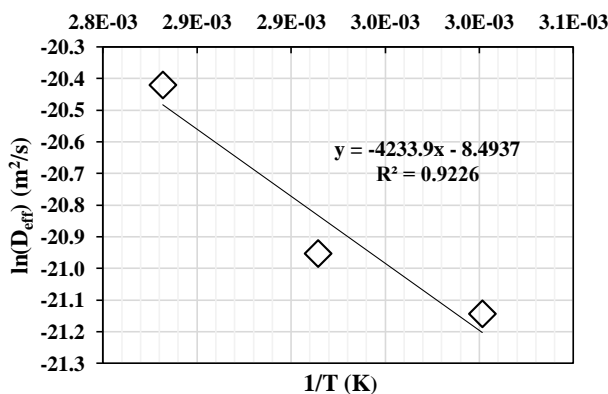


Figure 8. Absolute temperature ( $1/T$ ) versus natural logarithm of effective moisture diffusivity

### CONCLUSION

With varied drying methods, the shelf life and storage of food products may be extended. According to preferred parameters, can be selected different drying technologies. The drying process which using with infrared radiation dryer is one of these methods. In this study, drying characteristics of *Loligo vulgaris* dried via IR dryer are investigated at three different temperatures. The drying process occurred with the rising-rate, constant-rate and falling-rate periods with the changing of temperature values and drying times. The drying time decreased with the increasing of temperature. The  $D_{eff}$  values are calculated to be between  $6.57 \times 10^{-10}$  and  $1.35 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s.  $E_a$  was determined to be 35.2 kJ/mol.

### REFERENCES

- [1] Geankoplis, C. J. 1993. Transport Processes & Separation Process Principles. New Jersey: Pearson, ISBN 0-13-045253-X.
- [2] Grdzlishvili, G., Hoffman, P. 2012. Infrared Drying of Food Products, Prague.
- [3] Azizov, J. (2015). Design of a Chamber Dryer for Sugar Cubes Drying, Prague.

- [4] Nowak, D., Lewicki, P. P. 2004. Infrared drying of apple slices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 353–360.
- [5] Hidaka, Y., Kubota, K., Ichikawa, T. 2004. Development of a far-infrared radiation dryer for grain. In: *Proceedings of the World Rice Research Conference*, Tsukuba, Japan, 4-7 November 2004.
- [6] Nasiroglu, S., Kocabiyik, H. 2007. Thin-layer infrared radiation drying of red pepper slices. *Journal of Food Process Engineering*, 33: 1-16.
- [7] Nuthong, P., Achariyaviriya, A., Namsanguan, K., Achariyaviriya, S., 2011. Kinetics and modeling of whole longan with combined infrared and hot air. *Journal of Food Engineering*, 102 (3): 233-239.
- [8] Deng, L.Z., Yang, X.H., Mujumdar, A.S., Zhao, J.H., Qian, D.W., Zhang, J.W., Gao, Z.J. Xiao, H.W., 2018. Red pepper (*Capsicum annuum* L.) drying: Effects of different drying methods on drying kinetics, physicochemical properties, antioxidant capacity, and microstructure. *Drying Technology*, 36(8): 893-907.
- [9] Riadh, M. H., et al. 2014. Infrared Heating in Food Drying: An Overview, *Drying Technology: An International Journal*.
- [10] Abe, T. and Afzal, T.M. 1998. Diffusion in Potato During Far Infrared Radiation Drying. *Journal of Food Engineering*.
- [11] Nguyen, M., Price, W. E., 2007. Air-drying of banana: Influence of experimental parameters, slab thickness, banana maturity and harvesting season. *Journal of Food Engineering*, 79: 200-207.
- [12] Hashimoto, A., Kameoka, T., 1999. Effect of infrared irradiation on drying characteristics of wet porous materials. *Drying Technology*, 17(7-8): 1613-1626.
- [13] Swasdisevi, T., Devahastin, S., Sa-Adchom, P., Soponronnarit, S., 2009. Mathematical modeling of combined far-infrared and vacuum drying banana slice. *Journal of Food Engineering*, 92(1): 100-106.
- [14] Jardas, I. (1996) *Jadranskaihtiofauna. Školskknjiga*, Zagreb, 536 pp.
- [15] Relini, G., Bertrand, J., Zamboni, A. (eds.) 1999. *Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean*.
- [16] Toğrul, H. 2006. Suitable drying model for infrared drying of carrot. *Journal of Food Engineering*, 77: 610-619.
- [17] Kipcak, A. S., Doymaz, I., Derun, E. M. 2019. Infrared Drying Kinetics of Blue Mussels and Physical Properties. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 25 (1) 1–10.
- [18] Ismail, O. and Kocabay, O. G. 2018. Infrared and Microwave Drying of Rainbow Trout: Drying Kinetics and Modelling *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 259-266.
- [19] Erbay, Z., Icier, F., 2010. A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling, and Experimental Results, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50:5, 441-464.



## The impact of Zeatin doses on *in vitro* micropropagation of *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson

Muhammet Dogan

\*Karamanoglu Mehmetbey University, Kamil Ozdag Faculty of Science Faculty, Department of Biology, Karaman, Turkey

\*Corresponding author e-mail: mtdogan1@gmail.com

### Abstract

Plant tissue culture is an important technique that allows the propagation of many important plant species regardless of the season and external conditions. In this study, *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson was incubated for *in vitro* multiple shoot regeneration in Murashige and Skoog (1962) (MS) nutrient media containing Zeatin (ZEA) at different concentrations (0, 0.15, 0.30, 0.60, 0.90 and 1.20 mg/L) for six weeks. Shoot tip was used as explants in the experiments. Shoot regeneration frequencies ranged between 38.88-77.77%. The highest shoot regeneration frequency (77.77%) was obtained in MS nutrient medium supplemented with 0.30 mg/L ZEA. The maximum shoot per explant was determined in culture medium containing 0.30 mg/L ZEA with 12.52 shoots/explant. Use of ZEA higher than 0.30 mg/L reduced the number of shoots. The lowest number of shoots was recorded in culture medium supplemented with 1.20 mg/L ZEA, except for the control group. When the shoot lengths were compared, the longest shoots were obtained in MS nutrient medium with 0.15 mg/L ZEA added (1.27 cm). Increased ZEA concentrations had a negative effect on shoot lengths. The elongated and growing shoots were transferred to culture medium with 0.25 mg/L Indole-3-Acetic Acid (IAA) added for *in vitro* rooting. Rooted shoots at the end of four weeks were transferred to aquariums with water to adjust to external conditions. At the end of two weeks, a rapid growth was observed in the height and leaves of the plants. After four weeks, the plants were successfully acclimated to *ex vitro* conditions.

**Keywords:** *In vitro* propagation, shoot regeneration, shoot tip explant, tissue culture

### INTRODUCTION

In recent years, interest in tissue culture studies has increased. Advances in this technique help solve problems related to plant physiology, biochemistry, cytology, genetics and molecular biology. In addition to these basic issues, successful results have been obtained in application areas such as rapid plant production, plant breeding, secondary metabolite production and long term protection (Kocaçalışkan, 2002).

The plant tissue culture method is basically a production method. Unlike other conventional production methods, a small piece of tissue (explant) from various parts of the plant is sterilized and cultured in sterile medium containing various nutrients under suitable environmental conditions such as light, moisture and temperature (Srivastava and Steinbaver, 1981; Vidalie, 1986; Gönülşen, 1987; Ahloowalia, et al., 2002). Tissue culture reproduction is also called "micropropagation". With this technique, many parts of the plants that can create new plants in reproduction via meristems, shoot tips, hypocotyl, leaf, stem parts, cotyledons, roots, bud explants (Er and Canpolat, 1992).

Plant tissue culture is collected under different methods. They are usually named according to the explant received. It is named by different methods according to the plant part that will form the new plant (cultures of meristem, organ, anther, ovule, callus, cell, protoplast, somatic embryogenesis, etc.) (Kocaçalışkan, 2002).

In this study, *in vitro* shoot regeneration of *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson from shoot tip explants in culture medium containing different concentrations of Zeatin (ZEA) was investigated.

## MATERIALS AND METHODS

*H. polysperma* were obtained from aquarium markets in Konya, Turkey. Surface sterilization of *H. polysperma* was obtained by treatment with 15% commercial bleach (NaOCl) for 10 min. After 5 × 3 min rinsing, the shoot tip explants were isolated. The explants were then transferred to the Murashige and Skoog (MS) hormone-free basic nutrient medium (Murashige and Skoog, 1962). The shoot tip explants isolated from sterile plants were used in all trials.

MS medium, vitamins, 3% sucrose and 0.65% agar were used in all culture media. Different ratios of ZEA were used as plant growth regulators. Distilled water was used for the preparation of the nutrient medium. The pH of the nutrient medium was adjusted to 5.7±1 using 1N NaOH and 1N HCl, followed by sterilization at 1.2 atmospheres pressure and at 120°C for 20 minutes. In the experiments, the explants were incubated under a white LED (Light-Emitting Diode) light (1500 lux) at a temperature of 24°C and a 16 hour light photoperiod.

Regenerated shoots were transferred in culture medium containing 0.25 mg/L indole-3- acetic acid (IAA) for *in vitro* root formation, and then transferred to the aquarium environment to acclimate to external conditions. The aquarium conditions are set at 24°C temperature and 16 hours lighting. Also liquid fertilizer was added to the aquarium water.

The data obtained from the study were analyzed using the SPSS 21 for Windows program. Duncan tests were applied for Post Hoc tests. Percent values were subjected to arcsin transformation prior to statistical analysis (Snedecor and Cochran, 1967).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, shoot tip explants of *H. polysperma* were assayed in MS culture media containing different ZEA for *in vitro* micropropagation studies. In tissue culture studies, shoot tip explant is very important because it contains the meristematic region. Shoot tip explants have been preferred for *in vitro* production of many plants such as *Jatropha curcas* L. (Rajore and Batra, 2005), *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze (Dogan et al., 2016), *Ficus carica* (Ling et al., 2018), *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Acedo et al., 2018) and *Ceratophyllum demersum* L. (Dogan, 2019). The first shoot outlets were observed on the 14th day. At the end of six weeks, the experiment was terminated and multiple shoot formations from the shoot tip explants in culture media were recorded. Variance analysis was applied for shoot regeneration data (Table 1).

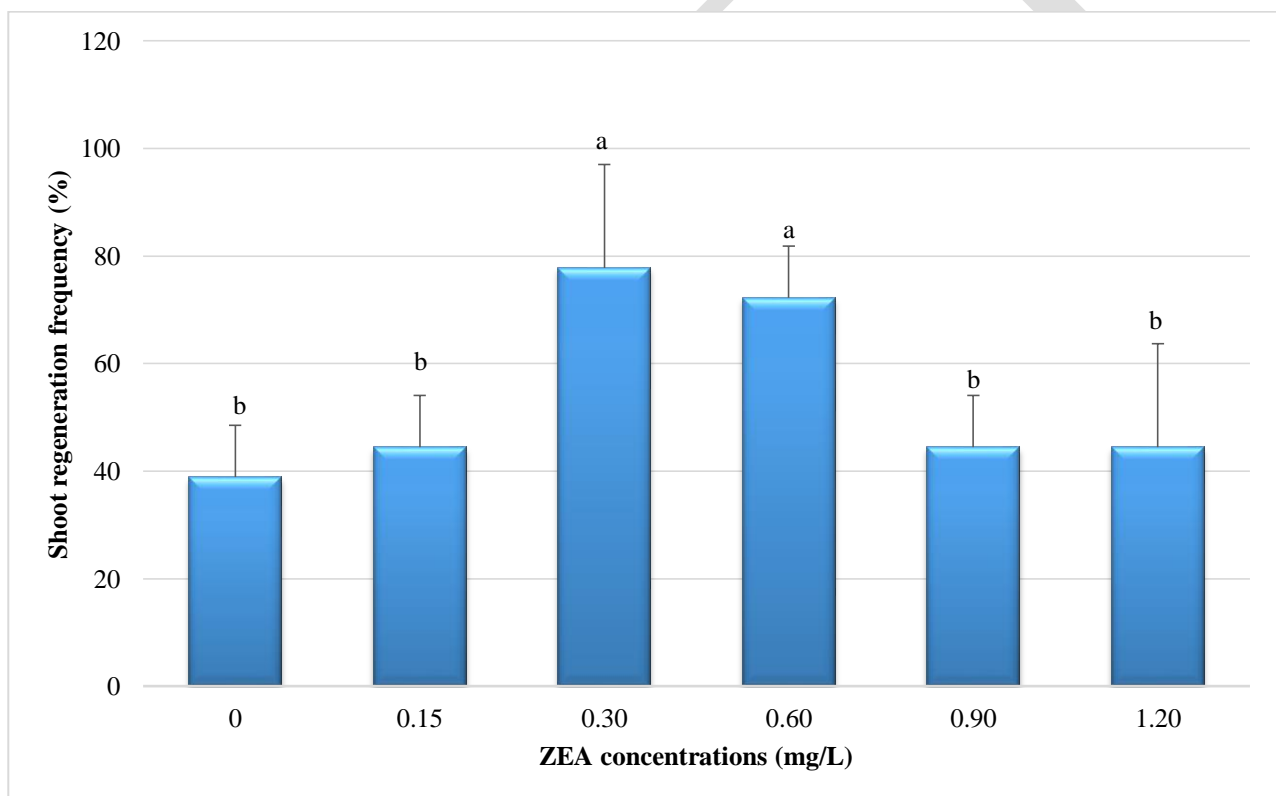
When Table 1 was examined, there was a statistically significant difference in terms of shoot regeneration frequency between  $p < 0.05$  level, whereas a significant difference was found in terms of Mean number of shoots per explants and Mean shoot length  $p < 0.01$ . Duncan test was applied for the significance level of this difference (Figure 1,2,4).

Shoot regeneration rate was ranked between 38.88-77.77% (Figure 1). The highest shoot regeneration rate (77.77%) was obtained in MS medium with 0.30 mg/L ZEA. The lowest shoot regeneration frequency was determined in culture medium with 1.20 mg / L ZEA except for control group. Use of ZEA higher or lower than 0.30 mg/L showed a reduction in shoot regeneration frequency. The shoot regeneration values obtained in the media containing 0.60 and 0.30 mg/L ZEA were statistically insignificant ( $p > 0.05$ ). Similarly, *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.'s nodal and internodal explants were cultured in MS nutrient medium containing a combination of 0.10 mg/L GA<sub>3</sub> and 0.05-1.60 mg/L Tidiazuron, and the percentage of shoot regeneration decreased in high and low hormone combinations (Dogan, 2018).

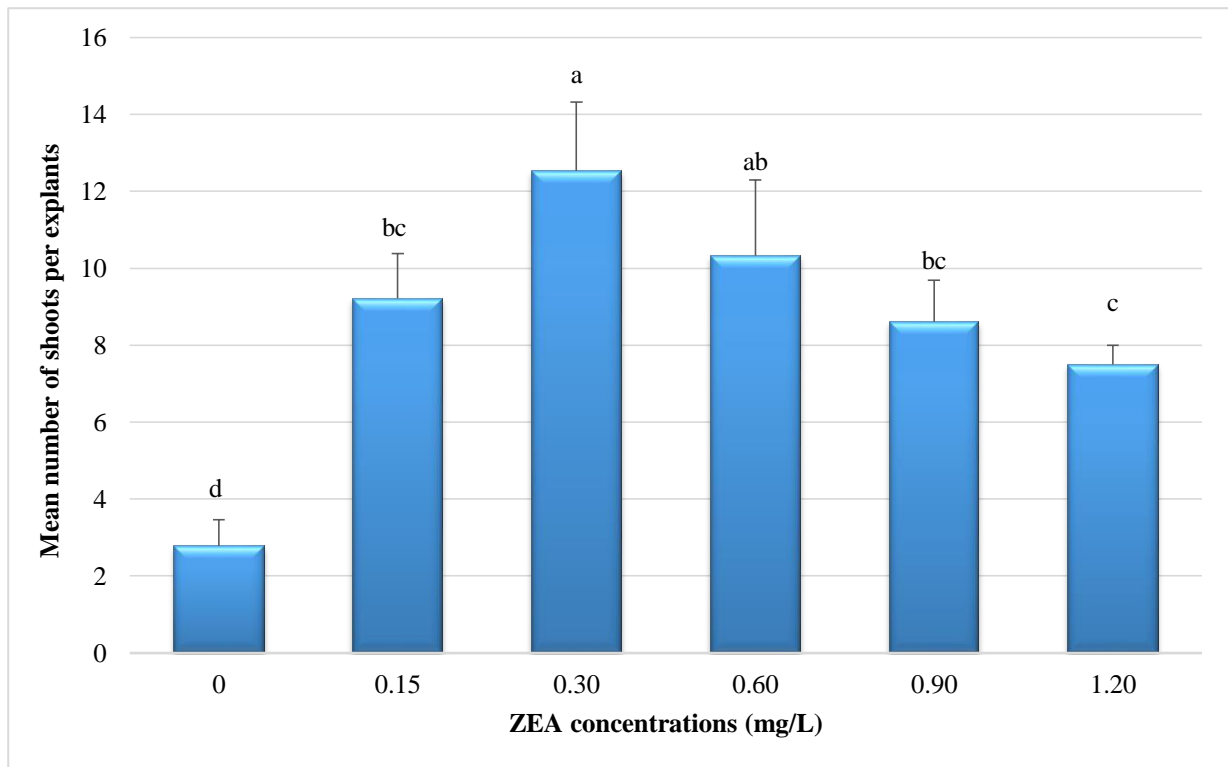
**Table1.** Analysis of variance of shoot tip of *H. polysperma* in MS medium containing different ZEA doses

Source of variance	Degree of freedom	Shoot regeneration frequency (%)		Mean number of shoots per explants		Mean shoot length (cm)	
		Mean square	F value	Mean square	F value	Mean square	F value
Medium	5	839.37	4.53*	32.30	18.75**	0.081	10.12**
Error	12	185.22	-	1.72	-	0.008	-
General Total	17	-	-	-	-	-	-

\*\* Significant at  $p < 0.01$  level ; \*Significant at  $p < 0.05$  level



**Figure 1.** Effect of different combinations of ZEA on shoot regeneration frequency from shoot tip explants of *H. polysperma*. All values are the means of triplicates  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Vertical bars indicate standard error of three separate experiments. Different letters indicate significantly different values (DMRT,  $p < 0.05$ )

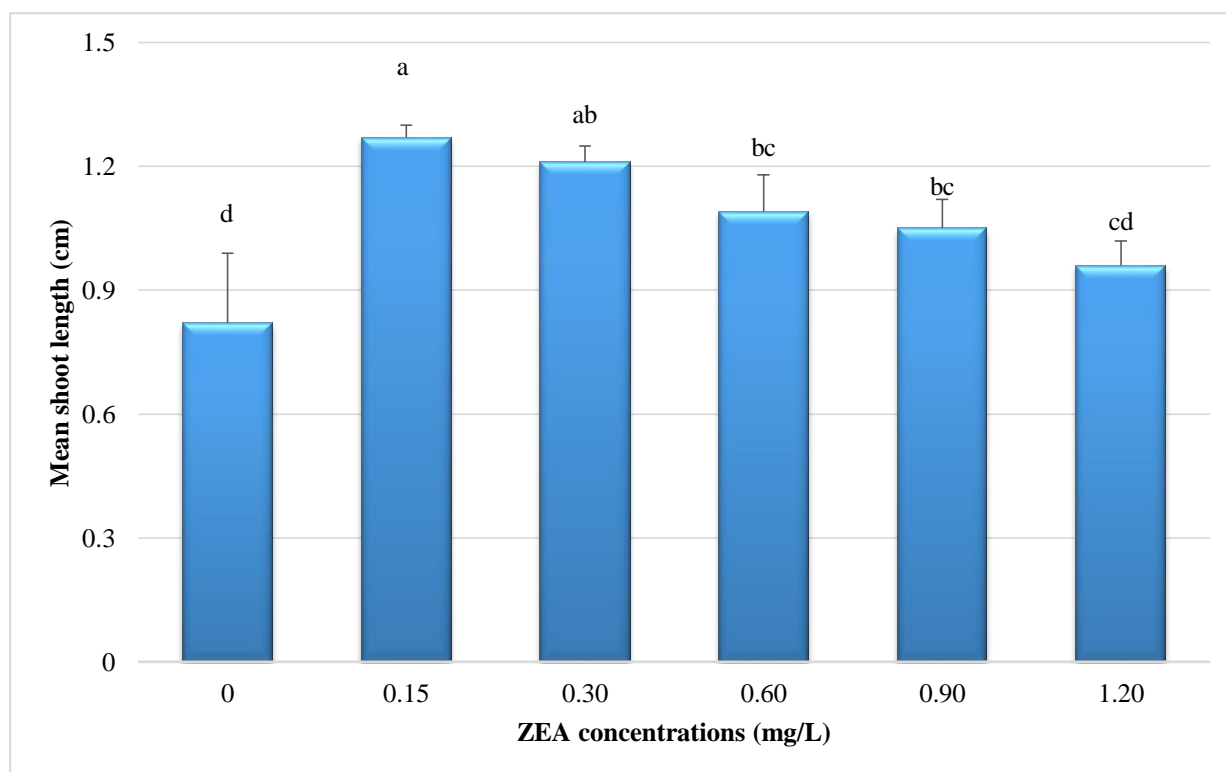


**Figure 2.** Effect of different combinations of ZEA on mean number of shoots per explants from shoot tip explants of *H. polysperma*. All values are the means of triplicates  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Vertical bars indicate standard error of three separate experiments. Different letters indicate significantly different values (DMRT,  $p < 0.05$ )

The number of shoots per explant ranged from 2.78 to 12.53 (Figure 2). The maximum number of shoots (12.53) was determined in 0.30 mg/L ZEA added cultures (Figure 3) followed by 10.33 in 0.60 mg/L ZEA added culture medium. A small number of shoots were detected in the control group as 2.78. Hormone concentrations were found to be statistically significant on the number of shoots ( $p < 0.05$ ). These results showed that hormone ratio is important for *in vitro* production. Similarly, many researchers have reported different results in hormone concentrations (Haddad et al., 2018; Alfonso et al., 2018; Seon et al., 2018; Park et al., 2018; Sharma et al., 2019).



**Figure 3.** Regenerated shoots from shoot tip explants of *H. polysperma* in culture media containing ZEA doses of 0.30 mg/L.



**Figure 4.** Effect of different combinations of ZEA on mean shoot length per explants from shoot tip explants of *H. polysperma*. All values are the means of triplicates  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Vertical bars indicate standard error of three separate experiments. Different letters indicate significantly different values (DMRT,  $p < 0.05$ )

Shoot lengths varied between 0.82-1.27 cm. The longest shoots (1.27 cm) were obtained with 0.15 mg/L ZEA-added cultures and the shortest shoots with ZEA-free culture medium. Use of plant growth regulators more than 0.15 mg/L negatively affected shoot length. Shoot lengths in culture media containing 0.15 and 0.30 mg/L ZEA were statistically insignificant ( $p > 0.05$ ).

The regenerated shoots were rooted in culture medium containing 0.25 mg/L IAA and then transferred to the aquarium. After four weeks, acclimatization of the plants to external conditions was achieved successfully.

## CONCLUSIONS

In this study, *in vitro* rapid and multiple production of *H. polysperma* in culture medium containing different combinations of ZEA was achieved successfully. The maximum shoots per explant were obtained in 0.30 mg/L ZEA supplemented culture medium and the longest shoots were obtained in 0.15 mg/L ZEA supplemented culture medium. The results of this study may aid in the large-scale production of *H. polysperma*.

## REFERENCES

- Acedo VZ, Damasco OP, Laurena AC, Sta Cruz PC, Namuco, LO, Lalusin AG (2018). Shoot tip splitting for rapid micropropagation of Philippine taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. International Journal of Advance Agricultural Research. 6: 38-46.
- Ahloowalia BS, Prakash J, Savangikar VA, Savangikar C 2002. Plant tissue culture. low cost options for tissue culture technology in developing countries, FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture Proceedings of a Technical Meetin, Vienna, 26-30 August 2002, 3-10.
- Alfonso D, Cicatelli A, Guarino F, Rodríguez D, Castiglione S 2018. *In vitro* propagation of *Leucocroton havanensis* Borhidi (Euphorbiaceae): A rare serpentine-endemic species of Cuba. Plant Biosystems-An International Journal Dealing With all Aspects of Plant Biology, 152(4): 649-656.
- Dogan M, 2018. *In Vitro* Shoot Regeneration of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. from Nodal and Internodal Explants. Iğdir University Journal of the Institute of Science and Technology, 8(3): 77-84.

- Dogan M 2019. Multiple Shoot Regeneration Via Indirect Organogenesis from Shoot Tip and Nodal Meristem Explants of *Ceratophyllum demersum* L. Journal of Animal and Plant Sciences, 29(2): 568-577.
- Dogan M, Karatas M, Aasim M, 2016. *In Vitro* Shoot Regeneration From Shoot Tip And Nodal Segment Explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze, A Multipurpose Ornamental Aquatic Plant. Fresenius Environmental Bulletin, 25(11): 4777-4782.
- Er C, Canpolat N 1992, Bitki ıslahında doku kültürleri, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı Matbaası, Ankara.
- Gönülşen N 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:78, Menemen-İzmir.
- Haddad B, Carra A, Saadi A, Haddad N, Mercati F, Gristina AS, ... Carimi F 2018. *In vitro* propagation of the relict laperinne's olive (*Olea europaea* L. subsp. *Laperrinei*). Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 152(4): 621-630.
- Kocaçalışkan Ş 2002. Bitki doku kültürleri (Organ, Doku ve Hücre), DPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, (ISBN:978-975-8201-47-6).
- Ling WT, Liew FC, LimWY, Subramaniam S, Chew BL 2018. Shoot Induction from Axillary Shoot Tip Explants of Fig (*Ficus carica*) cv. Japanese BTM 6. Tropical life sciences research, 29(2): 165.
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15: 473-479.
- Park HY, Kang KW, Kim DH, Sivanesan I 2018. *In vitro* propagation of *Cymbidium goeringii* Reichenbach fil. through direct adventitious shoot regeneration. Physiology and Molecular Biology of Plants, 24(2): 307-313.
- Rajore S, Batra A 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 14(1): 73-75.
- Seon KM., Kim DH, Kang KW, Sivanesan I. 2018. Highly competent *in vitro* propagation of *Thrixspermum japonicum* (Miq.) Rehb. f., a rare epiphytic orchid. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 54(3), 302-308.
- Sharma S, Sharma R, Sharma P, Thakur K, Dutt B 2019. Direct shoot organogenesis from seedling derived shoot tip explants of endangered medicinal plant *Saussurea costus* (Falc.) Lipsch. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 89(2): 755-764.
- Snedecor GW, Cochran WG 1997. Statistical methods. Iowa, The Iowa State University Press. USA.
- Srivastava PS, Steinbaver A 1981. Regeneration Of Birch Plants Catkin Tissue Cultures, Plant Science Letters, 22.
- Vidalie H 1986. *In Vitro* Culture and Its Applications In Horticulture, Economic Botany, 51: 92-93.

## Activity of Kinetin on whole plant regeneration from nodal explants of *Lysimachia nummularia* L. in liquid culture media

Muhammet Dogan

\*Karamanoglu Mehmetbey University, Kamil Ozdag Faculty of Science Faculty, Department of Biology, Karaman, Turkey

\*Corresponding author e-mail: mtdogan1@gmail.com

### Abstract

*Lysimachia nummularia* L. is an important medicinal plant thanks to its valuable biochemicals. The aim of this study was to investigate the efficacy of Kinetin (KIN) on the production of *L. nummularia* by tissue culture techniques in liquid culture media. Nodal explants of *L. nummularia* were cultured in liquid Murashige and Skoog (MS) medium containing 0.10-1.60 mg/L KIN for eight weeks. The rate of shoot regeneration ranged between 83.33-100.00%. 100% shoots were obtained in MS medium with 0.20, 0.40 and 0.80 mg/L KIN. The number of shoots per explant in culture media ranged from 2.67 to 8.17 and shoot lengths ranged from 0.85 to 3.16 cm. The maximum number of shoots (8.17) and the longest shoots (3.16 cm) were detected in MS medium containing 1.60 mg/L KIN. The minimum number of shoots (2.67) and the shortest shoots (0.85 cm) were obtained in MS medium containing 0.05 mg/L KIN. When the media were compared, it was found that high use of KIN was more effective for the number and length of shoots. Since the regenerated shoots form dense root in the propagation media, no rooting study was performed. The rooted plants were successfully accustomed to external conditions.

**Keywords:** Kinetin, nodal explant, shoot regeneration, tissue culture

### Sıvı kültür ortamında *Lysimachia nummularia* L.'nin nodal eksplantlarından tam bitki rejenerasyonu üzerine Kinetin'in etkisi

### Özet

*Lysimachia nummularia* L. değerli biyokimyasalları sayesinde önemli bir şifalı bitkidir. Bu çalışmanın amacı, sıvı kültür ortamlarında *L. nummularia*'nın doku kültürü teknikleri ile üretimi üzerine Kinetin (KIN)'in etkinliğini araştırmaktır. *L. nummularia*'nın nodal eksplantları, sekiz hafta boyunca 0.10-1.60 mg/L KIN içeren sıvı Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyon oranı %83.33-100.00 arasında değişmiştir. MS ortamında %100 sürgünler, 0.20, 0.40 ve 0.80 mg/L KIN ile elde edilmiştir. Kültür ortamında eksplant başına sürgün sayısı 2.67 ile 8.17 arasında değişmiş ve sürgün uzunluğu 0.85 ile 3.16 cm arasında değişmiştir. Maksimum sürgün sayısı (8.17) ve en uzun sürgünler (3.16 cm), 1.60 mg/L KIN içeren MS ortamında tespit edilmiştir. Minimum sürgün sayısı (2.67) ve en kısa sürgünler (0.85 cm) 0.05 mg/L KIN içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ortamlar karşılaştırıldığında, yüksek KIN kullanımının sürgünlerin sayısı ve uzunluğu için daha etkili olduğu bulunmuştur. Yenilenen sürgünler, çoğaltma ortamlarında yoğun bir kök oluşturduğundan köklendirme çalışması yapılmamıştır. Köklenmiş bitkiler başarıyla dış koşullara alıştırmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Kinetin, nodal eksplant, sürgün rejenerasyonu, doku kültürü

## GİRİŞ

Bitki dokusu ve organ kültürü, morfogenez gibi bazı temel biyolojik mekanizmaların incelenmesi ve anlaşılması için XX yüzyılın başından beri yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, bitkilerden elde edilen yeni ürünler için pazarın artan talebi ile *in vitro* kültürler, bitki materyallerinin seri üretimi için güvenilir bir teknik haline gelmiştir. Ayrıca, bu tekniğin fenolik bileşikler gibi bazı biyoaktif bileşiklerin üretimi için kullanılma potansiyeli, belirli bileşiklerin üretimini ve birikimini arttırmada manipüle edilebilmesi önemini daha da artırmıştır (Dias ve ark., 2016).

Aynı zamanda bitki hormonları olarak da bilinen bitki büyüme düzenleyicilerinin keşfedilmesi, bitkilerin çimlenmeden daha fazla oluşumuna kadar olan fizyolojik sürecin belirli bir şekilde kontrol edilmesine izin verilerek, *in vitro* bitki kültürünün gelişmesinde devrim yaratan önemli bir noktadır (Roberts, 2012).

Doku kültürü teknikleri;

- Arz-talebi karşılayacak üretim olanağı
- Genotiplerin hızlı üretimi
- *In vitro* seleksiyon
- Daha az alandan daha yüksek verim eldesi
- Hastalısız bitki eldesi (Bakteri, virüs ve mantardan ari bitki eldesi)
- Haploid ve poliploid bitkilerin üretilmesi
- Mutantların üretimi ve seçimi
- Genetik çeşitliliğin saklanması
- Somatik embriyo oluşumu, sentetik tohum üretimi
- Protoplast kültürü ile somatik hibridizasyon
- DNA teknolojisi ile gen transferleri
- Çelikle üretimi zor olan türlerin kolay üretilmesi gibi avantajları bitkisel üretime sağlamaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1983; Cüce, 2016).

Bu çalışmada, sıvı kültür ortamlarında *Lysimachia nummularia* L.'nin doku kültürü teknikleri ile üretimi üzerine Kinetin (KIN)'in etkinliğini araştırmaktır.

## MATERYAL ve METOD

Bitki materyali olarak kullanılan *Lysimachia nummularia* L., Konya'da bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu işlemi uygulanmadan önce 30 dk akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Bitkilerin yüzey sterilizasyonu ticari çamaşır suyu ile 10 dk muamele ile edilmiştir. 5 dk süreyle 3 kez durulama işlemi uygulandıktan sonra boğum eksplantları izole edilerek, hormonsuz Murashige ve Skoog (1962) (MS) ortamına aktarılmıştır.

Denemelerde kültür ortamında boğum eksplantları izole edilerek 0,10-1,60 mg/L KIN içeren MS ortamına aktarılmıştır. 1N NaOH ve 1N HCl ile kültür ortamının pH'sı 5.7±0.1'e yapılmış ve otoklavda steril edilmiştir (1.2 basınç - 120 °C'de 20 dk). Denemelerde eksplantlar, beyaz ışık yayan diyotlar (LED) 24±1 °C'de ve 16 saat ışık fotoperiyodunda kültüre alınmıştır.

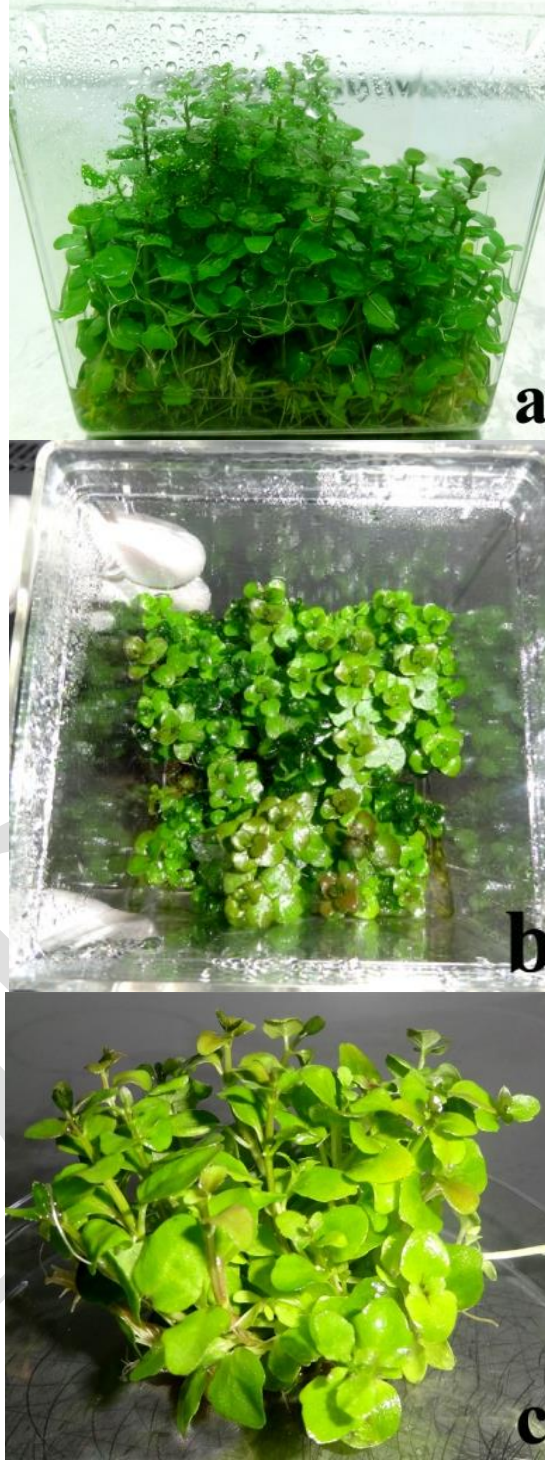
Rejenerasyon çalışmalarında eksplantlar bir kez kültür ortamında alınmış olup, sekiz hafta sonunda deneme sonlandırılmıştır. Kültür ortamlarında üretilen rejenere bitkiler yoğun oranda kök oluşturdıkları için ayrıca köklendirme çalışması yürütülmemiştir. Rejenere sürgünlerin üzerindeki besin ortamı akan çeşme suyu altında tutularak arındırıldıktan sonra bitkiler, dış koşullara alıştırmak için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Akvaryum tabanına 4-5 cm yüksekliğinde dere kumu (10 kg) yerleştirilmiş olup, 24°C sıcaklık ayarlı termostat ve 16 saat fotoperiyodunda aydınlatma kullanılmıştır. Ayrıca akvaryum suyuna sıvı gübre ilave edilmiştir.

Tüm denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Doku kültürü çalışmaları 6 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Elde edilen veriler SPSS 21 for Windows programı ile analiz edilmiş ve Post Hoc testleri için de Duncan testleri uygulanmıştır.



### BULGULAR VE TARTIŞMA

*L. nummularia* bitkisinin boğum eksplantları 0,10-1,60 mg/L KIN içeren sıvı MS ortamında sekiz hafta boyunca kültüre alınmıştır. Sekiz hafta sonra boğum eksplantlarından (Şekil 1a,b,c) sürgün rejenerasyon oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu sonuçları için veriler alınmış ve varyans analizi uygulanmıştır (Çizelge 21).



**Şekil 1.** Farklı Kinetin dozlarını içeren sıvı MS ortamında *L. nummularia* 'nın boğum eksplantlarından sürgün rejenerasyonu; Sekiz hafta sonra (a,b,c) 1,60 mg/L Kin içeren MS ortamında boğum eksplantından çoklu sürgün oluşumu

**Tablo 1.** Farklı KIN dozlarının *L. nummularia*'nın boğum eksplantlarında sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek amacıyla yapılan Duncan testi sonuçları

(Kinetin mg/L)	Sürgün Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Uzunluğu (cm)
0,05	83,33b*	2,67c**	0,85d**
0,10	94,44a	3,29bc	0,96cd
0,20	100,00a	3,77bc	1,32cd
0,40	100,00a	5,66ab	1,58c
0,80	100,00a	7,05a	2,40b
1,60	94,44a	8,17a	3,16a

\*\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0.01$  düzeyinde önemlidir.

\* Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

Denemede kullanılan 0,10-0,60 mg/L KIN içeren MS ortamlarında sürgün rejenerasyon oranı %83,33-100,00 arasında değişmiştir. %100 sürgün oluşumları 0,20, 0,40 ve 0,80 mg/L KIN içeren MS ortamında elde edilmiştir (Tablo 1). Kültür ortamlarında eksplant başına sürgün sayısı 2,67-8,17 adet arasında ve sürgün uzunlukları 0,85-3,16 cm arasında değişmiştir. En fazla sürgün sayısı (8,17 adet) ve en uzun sürgünler (3,16 cm) 1,60 mg/L KIN içeren MS ortamında elde edilmiştir. En az sürgün sayısı (2,67 adet) ve en kısa sürgünler ise (0,85 cm) 0,05 mg/L KIN içeren MS ortamında elde edilmiştir. Ortamlar kıyaslandığında, KIN'nin yüksek oranda kullanılması sürgün sayısı ve uzunluğu için daha etkili olduğu anlaşılmıştır. KIN içeren kültür ortamında çoklu sürgün rejenerasyonları diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Pratibha ve ark., 2010; Rashid ve Bal, 2010; Dalila ve ark., 2013; Borjjan ve Arak, 2013; Tolera ve ark., 2014; Sayadi et al., 2014).

Kültür ortamlarında üretilen rejenere bitkiler yoğun oranda kök oluşturdukları için ayrıca köklendirme çalışması yürütülmemiştir. Bitkiler üzerinde besin ortamı, dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra dış koşullara alıştırmaları için akvaryum ortamına aktarılmıştır. Dört hafta sonunda bitkilerin boylarında ve köklerinde uzamalar gözlenmiş ve bitkilerin dış koşullara alıştırmaları başarıyla sağlanmıştır.

## SONUÇ

Bu çalışmada, *L. nummularia*'nın doku kültürü teknikleri ile sıvı kültür ortamında çoklu ve hızlı üretimi başarıyla sağlanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2130190).

## KAYNAKLAR

- Bhojwani S, Razdan MK, 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, 502, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam.
- Borjjan L, Arak H, 2013. A Study on the Effect of Different Concentration of plant hormones (BAP, NAA, 2, 4-D, and Kinetin) on callus induction in *Brassica napus*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 5(4): 519-521.
- Cüce M, 2016. *Vaccinium myrtillus* L. ve *Vaccinium uliginosum* L. (Ericaceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Dalila ZD, Jaafar H, Manaf, AA, 2013. Effects of 2, 4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. Asian Journal of Plant Sciences, 12(1): 21-27.
- Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira IC, 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. Industrial Crops and Products, 82: 9-22.

- Murashige T, Skoog F 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiological Plantarum*, 15: 473-497.
- Pratibha G, Satyawati S, Sanjay S, 2010. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* (natural sweetener) using kinetin for steviol glycoside production. *Res. J. Biotech*, 5: 63-67.
- Rashid R, Bal SS, 2010. Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 2(1): 70-73.
- Roberts JA, 2012. *Plant Growth Regulators*. Springer Science & Business Media
- Sayadi V, Mehrabi AA, Saidi M, Nourollahi, K. 2014. *In vitro* culture and callus induction of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) explants under different concentrations of plant growth regulators. *Int J Biosci*, 4: 206-211.
- Tolera B, Diro M, Belew D. 2014. Effects of 6-benzyl aminopurine and kinetin on *in vitro* shoot multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties. *Advances in Crop Science and Technology*.

## Use of principle component analysis to evaluate the sediment quality of significant dam lakes located in thrace region of Turkey

Cem Tokatlı

Department of Laboratory Technology, İpsala Vocational School, Trakya University, İpsala / Edirne, 22400, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: tokatlicem@gmail.com

### Abstract

Altinyazı, Karaidemir, Kayalıköy, Kırklareli, Sultanköy and Süloğlu Dam Lakes are located in the Thrace part of Marmara Region of Turkey. They were constructed by DSİ (State Water Works) in order to provide irrigation and drinking water and flood protection in general. The aim of the present study was to evaluate the sediment quality of these significant reservoirs from a statistical approach by using Pearson Correlation Index (PCI) and Principle Component Analysis (PCA). For this purpose, total of 18 macro and micro element concentrations (lithium, boron, sodium, magnesium, aluminum, calcium, vanadium, manganese, iron, cobalt, nickel, copper, zinc, strontium, molybdenum, cadmium, antimony and lead) were measured in sediments of selected total of 15 stations in spring season of 2018. According to the results of PCI, significant relations were recorded between the investigated parameters at the 0.01 and 0.05 significance levels. According to the results of PCA, 3 factors explained 88% of the total variance.

**Keywords:** Dam Lakes, Thrace Region, Sediment Quality, Macro – micro Elements, Principle Component Analysis.

### INTRODUCTION

Multi – statistical techniques may help the interpretation of complex data matrices to better understand the ecological status of the investigated ecosystems. They are being widely used in many countries in especially ecosystem quality assessment studies. Principle Component Analysis that is being used commonly all over the world is one of the most convenient multivariate statistical techniques (Shrestha and Kazama, 2007; Akın et al., 2010; Tokatlı et al., 2013).

Trakya Region is one of the most important regions of our country especially in terms of agriculture. In addition, the region is also important in terms of industry, especially located around the vicinities of Çorlu – Çerkezköy (Tokatlı, 2015; 2017; Tokatlı and Başatlı, 2016). Altinyazı, Karaidemir, Kayalıköy, Kırklareli, Sultanköy and Süloğlu Dam Lakes, which are located on the Thrace Region, are the most important reservoirs for the region. They were constructed by DSİ, on the Basamaklar, Poğaçça, Teke, Şeytandere, Manastır and Süloğlu Streams respectively (<http://www2.dsi.gov.tr/>). But as many freshwater ecosystems, these reservoirs are being effected from agricultural and domestic pressure.

In this study, Pearson Correlation Index (PCI) and Principle Component Analysis (PCA) were applied to elemental data detected from the sediments of reservoirs located in the Thrace Region in order to evaluate the sediment quality.

### MATERIALS AND METHODS

#### *Study area and collection of samples*

Altinyazı, Karaidemir, Kayalıköy, Kırklareli, Sultanköy and Süloğlu Dam Lakes and selected stations on the reservoirs are given in Figure 1. Sediment samples were collected in spring season of 2018 from 15 stations selected on the dam lakes.

#### *Chemical Analysis*

Sediment samples were dried for 3 h at 105 oC for element analyses. Then, all sediment samples were placed (0.25 g of each sample) in Pyrex reactors of a CEM Mars Xpress 5 microwave digestion unit. HClO<sub>4</sub>:HNO<sub>3</sub> acids of 1:3 proportions were inserted in the reactors respectively. Samples were mineralized at 200 oC for thirty minutes. Afterwards, the samples were filtered in such a way as to make their volumes to 100 ml with ultra – pure distilled water. The element levels in water samples were determined by using the "Agilent 7700 xx" branded Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer (ICP-MS) device in Trakya University Technology Research and Development Application and Research Center (TÜTAGEM). The center has an

international accreditation certificate within the scope of TS EN / ISO IEC 17025 issued by TÜRKAK (representative of the World Accreditation Authority in Turkey). The element analyses were recorded as means triplicate measurements (EPA, 1998; 2001).

### Statistical Analysis

Pearson Correlation Index (PCI) was applied to the results in order to determine the relations between the macro and micro elements by using the SPSS 17 package program. Principle Component Analysis (PCA) was applied to the results in order to determine the effective varifactors on reservoirs of Thrace Region according to correlated variables by using the SPSS 17 package program.

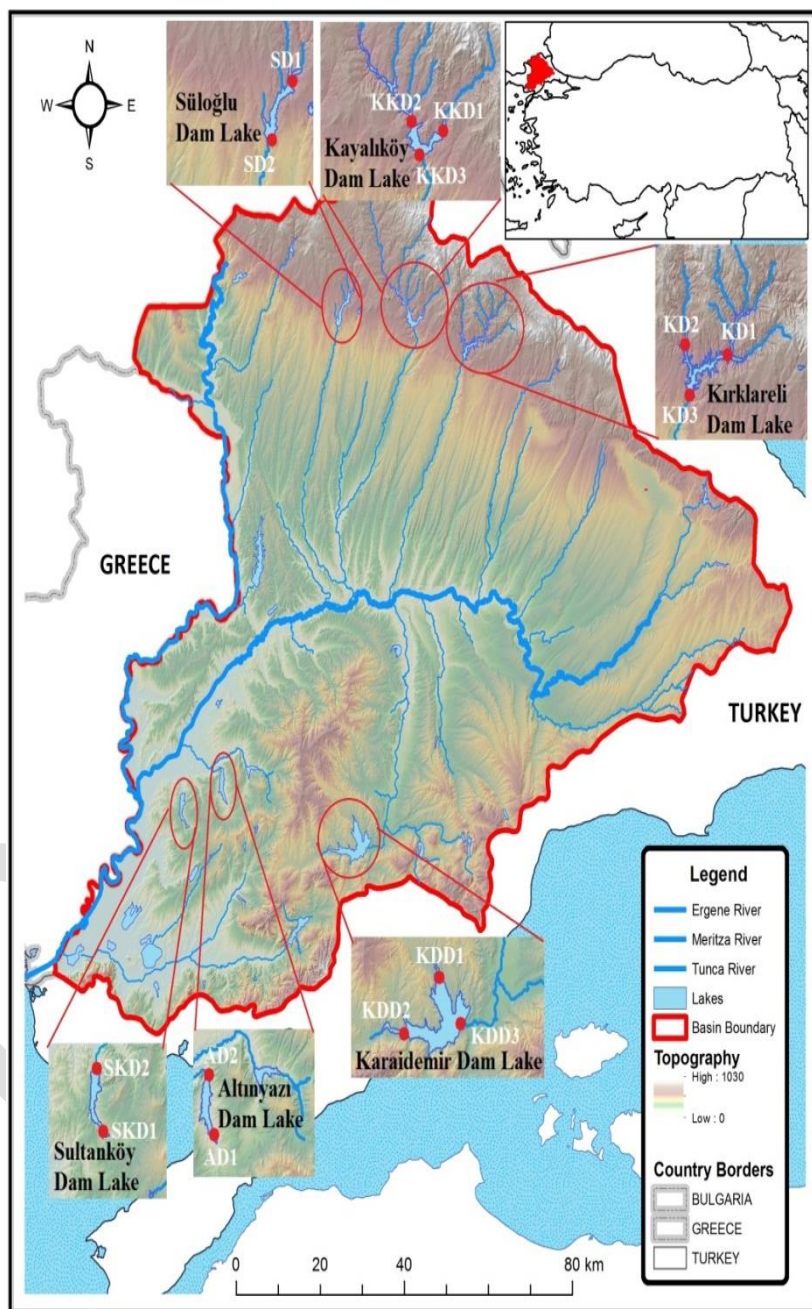


Figure 1. Study area and selected stations

**Table 1.** Pearson Correlation Index coefficients

	Li	B	Na	Mg	Al	Ca	V	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Sr	Mo	Cd	Sb	Pb
Li	1																	
B	.761***	1																
Na	.294	.036	1															
Mg	.546*	.210	.954***	1														
Al	.585*	.161	.793**	.869**	1													
Ca	.816***	.584*	.652**	.815***	.738**	1												
V	.638*	.349	.428	.555*	.848**	.648**	1											
Mn	.443	.065	.544*	.623*	.852**	.566*	.884***	1										
Fe	.572*	.092	.591*	.711**	.833**	.530*	.674**	.724**	1									
Co	.384	-.090	.737**	.785**	.885**	.643**	.769**	.887**	.733**	1								
Ni	.556*	.067	.813**	.906**	.868**	.808**	.646**	.728**	.707**	.912**	1							
Cu	.419	.096	.452	.538*	.739**	.380	.735**	.693**	.862**	.679**	.572*	1						
Zn	.263	-.041	.321	.397	.468	.151	.308	.327	.802**	.371	.352	.830**	1					
Sr	.752**	.546*	.816**	.921**	.811**	.942**	.643**	.597*	.607*	.669**	.820**	.461	.232	1				
Mo	.742**	.970**	-.015	.154	.157	.546*	.387	.134	.083	-.083	.035	.066	-.127	.513	1			
Cd	.362	.362	.133	.216	.343	.256	.433	.260	.556*	.207	.159	.748**	.688**	.291	.348	1		
Sb	.754**	.975**	-.019	.155	.160	.558*	.396	.129	.078	-.075	.046	.068	-.132	.516*	.999**	.345	1	
Pb	.000	-.053	-.045	-.034	.207	-.089	.336	.227	.447	.193	.009	.707**	.650**	-.064	-.038	.882**	-.040	1

\*: Correlation is significant at the 0.05 level ( $p < 0.05$ ); \*\*: Correlation is significant at the 0.01 level ( $p < 0.01$ )

**Table 2.** Extracted values of various PCA parameters

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	9.462	52.567	52.567	9.462	52.567	52.567	7.674	42.634	42.634
2	3.776	20.980	73.547	3.776	20.980	73.547	4.431	24.617	67.251
3	2.744	15.242	88.789	2.744	15.242	88.789	3.877	21.538	88.789

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Pearson Correlation Index (PCI)*

The relations between the macro and micro element accumulations in sediments of the reservoirs located in Thrace Region were determined by using Pearson Correlation Index (PCI) ( $n = 15$  for all parameters) and all the detected relations are given in Table 1.

### *Principle Component Analysis (PCA)*

PCA was used to determine the effective varifactors on the sediment quality of the reservoirs located in Thrace Region by using correlated variables ( $n = 15$  for all parameters). Eigenvalues higher than one were taken as criterion for evaluate the principal components that required to explain the sources of variance in the data. The scree plot of PCA is given in Figure 2. According to rotated cumulative percentage variance, 3 factors explained 88% of the total variance (Table 2).

Liu et al. (2003) classified the factor loadings according to loading values as “strong ( $>0.75$ )”, “moderate ( $0.75 - 0.50$ )” and “weak ( $0.50 - 0.30$ )”. The parameter loadings higher than 0.5 calculated after rotation for 3 components are given in Figure 3. Also component plot in rotated space, which shows the related variables of 3 factors, is given in Figure 4.

First factor (F1) explained 42% of total variance and it was related to the variables of Ni, Mg, Co, Al, Na, Sr, Mn, Ca, Fe, V, Cu parameters (Figure 3, 4). Second factor (F2) explained 24% of total variance and it was related to the variables of Sb, Mo, B, Li, Sr, Ca parameters (Figure 3, 4). Third factor (F3) explained 21% of total variance and it was related to the variables of Pb, Cd, Cu, Zn, Fe parameters (Figure 3, 4).

In a study performed in Seydisuyu Stream Basin, PCA was used to assess the sediment quality. According to data observed, as similar to the present study, 3 factors explained 90% of the total variance (F1 explained 47%, F2 explained 28% and F3 explained 15% of the total variance) (Çiçek et al., 2019). In another study performed in Xiangjiang watershed in China, PCA was used to evaluate the quality of some aquatic habitats. According to data observed, PCA reduced the data sets in 4 latent factors for 3 different sites accounting for 71.62%, 71.77% and 72.01% of the total variance (Zhang et al., 2009).

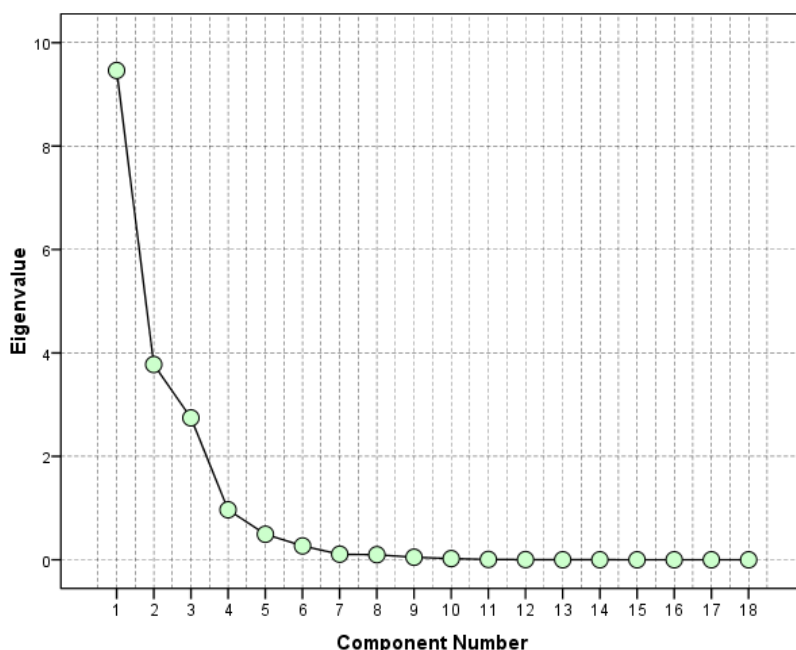


Figure 2. Scree plot of PCA

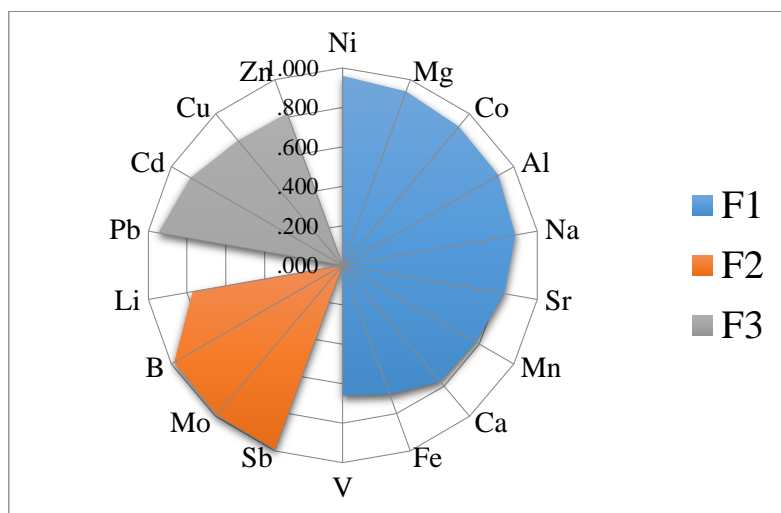


Figure 3. Rotated component matrix

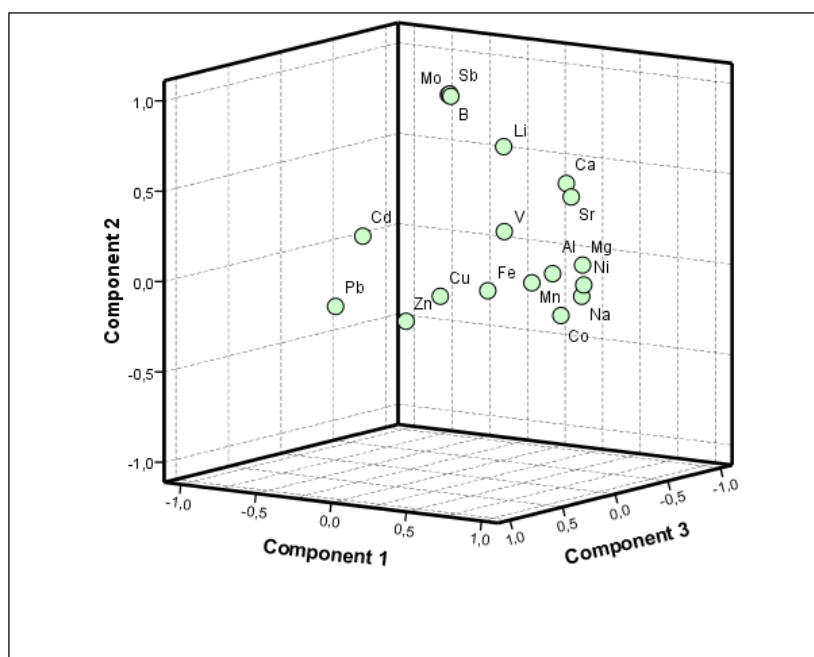


Figure 4. Component plot in rotated space

## CONCLUSION

In the present study, Principle Component Analysis (PCA) was used to evaluate the sediment quality of the dam lakes located in the Thrace Region of Turkey by using a large number of macro and micro elemental data. PCA helped to identify the effective factors on the sediment quality and 3 effective factors were determined that were explained 88% of the total variance. In conclusion, multi – statistical evaluation is necessary for a sophisticated environmental evaluation especially in environmental assessment studies, because of obtained large numbers of different parameters and difficulty of the interpretations of these parameters.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank for the financial and technical supports supplied by Trakya University, Turkey. This investigation has been supported by the project numbered as 2017/211 accepted by Trakya University, Commission of Scientific Research Projects.



## REFERENCES

- Akin, B. S., Atıcı, T., Katircioglu, H., Keskin, F. 2010. Investigation of water quality on Gökçekaya dam lake using multivariate statistical analysis, in Eskişehir, Turkey. *Environ Earth Sci*, DOI 10.1007/s12665-010-0798-6.
- Çiçek, A., Köse, E., Tokatlı, C. 2019. Use Of Factor Analysis To Evaluate The Sediment Quality Of A Significant Mining Area: Seydisuyu Stream Basin (Turkey). *Polish Journal of Environmental Studies*, 28 (3): 2021-2025.
- EPA (Environmental Protection Agency) METHOD 3051. 1998. Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils.
- EPA (Environmental Protection Agency) METHOD 200.7. 2001. Determination Of Metals And Trace Elements In Water And Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. <http://www2.dsi.gov.tr/>
- Liu, CW., Lin, KH., Kuo, YM. 2003. Application of factor analysis in the assessment of groundwater quality in a Blackfoot disease area in Taiwan. *Science of the Total Environment*, 313, 77–89.
- Shrestha, S., Kazama, F. 2007. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques: A case study of the Fuji river basin; Japan. *Environmental Modelling & Software*, 22, 464–475.
- Tokatlı, C. 2015. Assessment of the Water Quality in The Meriç River: As an Element of the Ecosystem in the Thrace Region of Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*. 24 (5): 2205-2211.
- Tokatlı, C. 2017. Bio – Ecological and Statistical Risk Assessment of Toxic Metals in Sediments of a Worldwide Important Wetland: Gala Lake National Park (Turkey). *Archives of Environmental Protection*, 43 (1): 34-47.
- Tokatlı, C., Baştaşı, Y. 2016. Trace and Toxic Element Levels in River Sediments. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25 (4): 1715-1720.
- Tokatlı, C., Çiçek, A., Köse, E. 2013. Groundwater Quality of Türkmen Mountain (Turkey). *Polish Journal of Environmental Studies*, 22 (4), 1197-1208.
- Zhang, Q., Li, Z., Zeng, G., Li, J., Fang, Y., Yuan, Q., Wang, Y., Ye, F. 2009. Assessment of surface water quality using multivariate statistical techniques in red soil hilly region: a case study of Xiangjiang watershed, China. *Environ Monit Assess*, 152:123–131.

## Water quality comparison of drinking fountains in different localities of Meriç River Basin

Cem Tokatlı

Department of Laboratory Technology, İpsala Vocational School, Trakya University, İpsala / Edirne, 22400, Turkey.

Corresponding author e-mail: tokatlicem@gmail.com

### Abstract

This study was carried out to determine and comparison of the quality of drinking fountains located in upstream (Edirne Province), middlestream (Adasarhanlı Village) and downstream (İpsala District) of Meriç River Basin (Thrace Part of Marmara Region of Turkey). Water samples were taken from the fountains used commonly by local people for especially drinking in autumn season of 2018. Some physical and chemical water quality parameters including pH, dissolved oxygen, oxygen saturation, electrical conductivity (EC), total dissolved solids (TDS), salinity, turbidity, nitrate, nitrite, phosphate, sulphate and chlorine were determined. Detected data were assessed according to national and international quality criteria. According to data observed, the drinking fountains have I. – II. Class (Turkish Regulations) water quality in terms of pH, dissolved oxygen, oxygen saturation, EC, TDS, salinity, turbidity, sulphate and chlorine parameters; II. – III. Class water quality in terms of nitrite and nitrate parameters; and III. – IV. Class water quality in terms of phosphate parameter in general. It was also determined that the investigated parameter levels in water of drinking fountains were not exceeded the limit values for drinking.

**Keywords:** Meriç River Basin, Drinking Fountains, Water Quality.

### INTRODUCTION

Contamination caused by human activities reduces the quality of limited freshwater resources of the world (Tokatlı, 2015). It was calculated that only about 3% of water is fresh and suitable for consumption, and also large part of this freshwater is found in the glaciers and underground (Gupta, 1997). Groundwater is one of the most significant sources of drinking water supply for numbers of villages, districts and provinces. But it is known that many chemicals have been identified as strong contaminants found in this groundwater (Hudak, 1999; Tokatlı, 2014). Therefore determining groundwater quality has an importance for human health.

Meriç River Basin is located in the Thrace Region of Turkey and there are very large agricultural lands in the basin because of contained rich soil and many freshwater resources (Tokatlı and Başatlı, 2016; 2017). For this reason agricultural pressure is a significant pollution factor for the region. The aim of this study was to determine and compare the water quality of drinking fountains located in upstream, middlestream and downstream of Meriç River Basin and evaluate the data according to Turkish Regulations Water Quality Classes and drinking water limits specified by Turkish Standards.

### MATERIALS AND METHODS

Water samples were collected in autumn season of 2018 from 3 stations from the drinking fountains (DF) used commonly by local people for especially drinking located in Edirne Province (DF1), Adasarhanlı Village (DF2) and İpsala District (DF3). Water samples were collected at the outflow of drinking fountains in polyethylene bottles. Coordinate information and locations of selected stations are given in Table 1 and the map of investigated area is given in Figure 1.

Dissolved oxygen, oxygen saturation, pH, EC, TDS and salinity parameters were determined by using “Hach Lange HQ40D Multiparameter” device during the field studies; turbidity parameter was determined by using “Hach Lange 2100Q Portable Turbiditymeter” device during the field studies; nitrate, nitrite, phosphate, sulphate and chlorine parameters were determined by using “Hach Lange DR3900 Spectrophotometer” device during the laboratory studies.

**Table 1.** Location properties of villages

Station Number	Locality In the Settlement	Locality in the Basin	Coordinates	
			North	South
DF1	Edirne Province	Upstream	41.646	26.624
DF2	Adasarhanlı Village	Middlestream	41.068	26.361
DF3	İpsala District	Downstream	40.917	26.395



**Figure 1.** Meriç River Basin and selected stations

## RESULTS AND DISCUSSION

Results of the physical and chemical data detected in the water of drinking fountains in Meriç River Basin and some national and international water quality standards are given in Table 2.

According to the Water Pollution Control Regulation criteria in Turkey (2004; 2012), water of drinking fountains located in the basin have I. – II. Class quality in terms of pH, dissolved oxygen, oxygen saturation, EC, TDS, salinity, turbidity, sulphate and chlorine parameters; II. – III. Class water quality in terms of nitrite and nitrate parameters; and III. – IV. Class water quality in terms of phosphate parameter in general. It was also determined according to the drinking water quality standards specified by Turkish Standards (TS266, 2005), European Community Standards (EC, 2007) and World Health Organization Standards (WHO, 2011), the investigated parameter levels in water of drinking fountains were not exceeded the limit values for drinking. Fertilizers are significantly contaminating the freshwater ecosystems and they are known as the most important factors on increasing the amount of nitrate, nitrite and phosphate concentrations both in surface and groundwater (Wetzel, 2001; Manahan, 2011). Meriç River Basin contains rich soil and freshwater resources. Therefore the detected quite high nitrate, nitrite and phosphate concentrations in water of drinking fountains located in the basin might be sourced from agricultural applications conducting intensively around the basin (Wetzel, 2001; Manahan, 2011).

**Table 2.** Results of detected parameters and some limit values

Limit Values and the Results of Present Study		Parameters											
		pH	EC (mS/cm)	<sup>3</sup> TDS (mg/L)	Salinity (‰)	Tur (NTU)	NO <sub>3</sub> (mg/L)	NO <sub>2</sub> (mg/L)	SO <sub>4</sub> (mg/L)	<sup>b</sup> PO <sub>4</sub> (mg/L)	DO (mg/L)	O <sub>2</sub> sat (mg/L)	<sup>a</sup> Cl (mg/L)
<b>*Turkish Regulations Water Quality Classes (2015)</b>	<b>I. Class</b> (Very Clean)	6.5-8.5	400	500	-	-	5	0.002	200	0.02	8<	90<	25
	<b>II. Class</b> (Less Contaminated)	6.5-8.5	1000	1500	-	-	10	0.01	200	0.16	6	70	200
	<b>III. Class</b> (Much Contaminated)	6.0-9.0	3000	5000	-	-	20	0.05	400	0.65	3	40	400
	<b>IV. Class</b> (Extremely Contaminated)	Out of 6.0-9.0	>3000	>5000	-	-	>20	>0.05	>400	>0.65	<3	<40	>400
<b>Drinking Water Standards</b>	<b>TS266</b> (2005)	6.5-9.5	2500	-	-	5	50	0.5	250	-	-	-	250
	<b>EC</b> (2007)	6.5-9.5	2500	-	-	-	50	0.5	250	-	-	-	-
	<b>WHO</b> (2011)	-	-	-	-	-	50	0.2	-	-	-	-	-
<b>Drinking Fountains in Meriç River Basin</b>	<b>DF1</b> (Edirne Province)	<b>7.69</b> <b>I. Class</b>	<b>367</b> <b>I. Class</b>	<b>234</b> <b>I. Class</b>	<b>0.23</b>	<b>0.25</b>	<b>9.97</b> <b>II. Class</b>	<b>0.012</b> <b>III. Class</b>	<b>65</b> <b>I. Class</b>	<b>2.05</b> <b>IV. Class</b>	<b>8.38</b> <b>I. Class</b>	<b>82.1</b> <b>II. Class</b>	<b>63.2</b> <b>II. Class</b>
	<b>DF2</b> (A dasarhanlı Village)	<b>7.55</b> <b>I. Class</b>	<b>269</b> <b>I. Class</b>	<b>199.2</b> <b>I. Class</b>	<b>0.21</b>	<b>0.73</b>	<b>6.92</b> <b>II. Class</b>	<b>0.007</b> <b>II. Class</b>	<b>33</b> <b>I. Class</b>	<b>0.517</b> <b>III. Class</b>	<b>11.18</b> <b>I. Class</b>	<b>98.1</b> <b>I. Class</b>	<b>28.7</b> <b>II. Class</b>
	<b>DF3</b> (İpsala District)	<b>7.68</b> <b>I. Class</b>	<b>331</b> <b>I. Class</b>	<b>208.7</b> <b>I. Class</b>	<b>0.21</b>	<b>0.43</b>	<b>14.8</b> <b>III. Class</b>	<b>0.013</b> <b>III. Class</b>	<b>23.5</b> <b>I. Class</b>	<b>0.098</b> <b>II. Class</b>	<b>9.11</b> <b>I. Class</b>	<b>77.9</b> <b>II. Class</b>	<b>58.9</b> <b>II. Class</b>

<sup>a</sup>Turkish Regulations, 2004; <sup>b</sup>Uslu and Türkman, 1987; \*III. – IV. Class water qualities are given in bold  
TS266 – Turkish Standards Institute; EC – European Communities; WHO – World Health Organization

## CONCLUSION

In this study, water quality of drinking fountains located in different localities of Meriç River Basin (upstream, middlestream and downstream) were investigated. As a result of the present study, it was determined that drinking fountains have I. – II. Class water quality in terms of almost all the investigated parameters in general. But, according to detected data, nitrate, nitrite and phosphate levels in water of drinking fountains were recorded in quite high levels and the water of fountains have III. – IV. Class water quality in terms of these parameters in general. It was also determined that any investigated parameter has not exceeded the drinking water limits specified by national and international institutes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank for the financial and technical supports supplied by Trakya University, Turkey. This investigation has been supported by the project numbered as 2018/154 accepted by Trakya University, Commission of Scientific Research Projects.

## REFERENCES

- EC (European Communities) 2007. European Communities (drinking water) (no. 2), Regulations 2007, S.I. No. 278 of 2007.
- Gupta, A. D. 1997. Importance of groundwater as water resource. Proceedings of Seminar and Training on Groundwater Contaminated by Hazardous Substances, Bangkok, January 20–21.
- Hudak, P. F. 1999. Chloride and Nitrate Distributions in the Hickory Aquifer, Central Texas, USA. *Environment International* 25 (4), 393–401.
- Manahan, S. E. 2011. *Water Chemistry: Green Science and Technology of Nature's Most Renewable Resource*. Taylor & Francis Group, CRC Press, 398 pages.
- Tokatlı, C. 2014. Drinking Water Quality of a Rice Land in Turkey by a Statistical and GIS Perspective: Ipsala District. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23 (6): 2247-2258.
- Tokatlı, C. 2015. Assessment of the Water Quality in the Meriç River: As an Element of the Ecosystem in The Thrace Region of Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*. 24 (5): 2205-2211.
- Tokatlı, C., Başatlı, Y. 2016. Trace And Toxic Element Levels in River Sediments. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25 (4): 1715-1720.
- Tokatlı, C., Başatlı, Y. 2017. Water Quality of Havsa Stream Basin Creeks (Thrace Region, Turkey). *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, Vol. 33, No. 2: 12-20.
- Turkish Regulations 2004. *Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği*, 31 Aralık Cuma tarihli Resmi Gazete, Sayı: 25687, <http://suyonetimiormansu.gov.tr>.
- Turkish Regulations 2015. *Yüzeysel Su Kalitesi Yönetimi Yönetmeliği*, 15 Nisan 2015 tarihli Resmi Gazete, Sayı: 29327, <http://suyonetimiormansu.gov.tr>.
- TS 266 2005. *Sular-İnsani tüketim amaçlı sular. Türk Standartları Enstitüsü*, ICS 13.060.20.
- Wetzel, R. G. 2001. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Elsevier Academic Press, 1006 pages.
- WHO (World Health Organization) 2011. *Guidelines for Drinking-water Quality*. World Health Organization Library Cataloguing-in-Publication Data, NLM classification: WA 675.

## Polidimetil siloksan ve doğal kauçuktan üretilen membranın benzen gideriminde kullanımı

Filiz Ugur Nigiz<sup>1\*</sup>, Nilüfer Hilmioğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup>Sorumlu yazar e-mail: filiz.ugur@gmail.com; filiz.ugur@kocaeli.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, atık sularındaki organik bileşenlerin seçici bir şekilde ayrılması için gözeneksiz, organik seven doğal kauçuk ve poli(dimetil siloksan) (silikon) harman membranlar hazırlanmış ve bu membranlar sudaki düşük konsantrasyondaki benzeni ayırmak için kullanılmıştır. Gözeneksiz membranlarda ayırım, çözünme-difüzyon temeline bağlıdır. Dolayısıyla membranın yüzey hidrofilitesi, polimerin camı geçiş sıcaklığı, polimer içerisindeki bağ yapıları, çözelti içerisindeki bileşenlere membranın ilgisi ayırmanın performansını doğrudan etkilemektedir. Membranlar üretildikten sonra, bağ yapıları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi ile belirlenmiştir. Üretilen membranların benzen ve suya karşı gösterdikleri ilgi şişme testleri ile belirlenmiştir. Yapılan testler sonucunda, üretilen membran %3 benzen içeren suda %50 şişme değerleri gösterirken, saf benzende şişme değeri %150'den fazladır. Benzen-su karışımındaki benzenin tamamının membran tarafından emildiği görülmüştür. Şişme testleri ardından, değişen benzen konsantrasyonlarında (%0.5-%3), değişen sıcaklıklarda (30 °C-50 °C) membran ayırma deneyleri yapılmış ve membranın yüksek oranda benzen seçici olduğu 1681 ayırma faktörü eldesi ile görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** benzen giderimi, harman membran, doğal kauçuk, PDMS

### Benzene removal by poly(dimethyl siloxane) -natural rubber membrane

#### Abstract

In this study, dense and organophilic natural rubber/poly (dimethyl siloxane) (silicone) blend membranes were prepared for selective separation of the organic components in the waste water and these membranes were used to separate the low concentration of benzene in the water. The separation in non-porous membranes depends on the solution-diffusion phenomenon. Thus, the surface hydrophilicity of the membrane, the glass transition temperature of the polymer, the bonds in the polymer directly affect the performance of the separation of the membrane. After the membranes were prepared, the bond structures were determined by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. The affinity of the produced membranes towards to benzene and water was determined by swelling measurements. As a result of the study, the produced membrane showed 50% sorption values in 3 vol% benzene containing dilute benzene-water solution, while the swelling degree was greater than 150% in the pure benzene. After the sorption tests, membrane separation experiments were carried out at varying temperatures (30-50 °C) at varying concentrations of benzene (0.5% -3%) and it was found that the membrane was highly selective for benzene with a separation factor of 1681.

**Keywords:** benzene removal, blend membrane, natural rubber, PDMS

### GİRİŞ

Endüstriyel tesislerin atık sularında bulunan birçok kirletici, başta su ekosistemi olmak üzere, birçok canlı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Özellikle artan endüstriyelleşme ile birlikte, doğal su kaynaklarındaki ağır metallerin, ilaç kalıntılarının, uçucu organik bileşenlerin, esterlerin, yağların ve daha birçok kimyasalların konsantrasyonu da artmaktadır. Bu nedenle, doğal kaynağa verilmeden önce tüm bu zararlı bileşenlerin sularından giderilmesi gerekmektedir. Endüstriyel atık suların içerdiği kimyasallar, konsantrasyonları ve verdikleri zarar, tesisin üretim tipine göre farklılık göstermektedir. Özellikle boya, plastik, tekstil gibi üretim sistemlerinin deşarj ünitesinde birçok organik madde bulunmaktadır (Ohshima vd. 2005; Kujavski 2000). Bu organik maddeleri ayırmak için kullanılan kimyasal ayırma, adsorpsiyon gibi geleneksel yöntemler, belirli bir konsantrasyona kadar etkin olarak kullanılabilir (Weschayanwivat vd. 2008; Simko vd. 2006). Ancak, bu gibi kimyasalların ppm seviyesindeki konsantrasyonları suda çözünmüş halde bulunur ve geleneksel yöntemler ile ayırmak da zorlaşır. Bu aşamada, membran temelli ayırma sistemlerinin kullanılması çevresel ve ekonomik açıdan daha avantajlıdır. Atık suda bulunan düşük konsantrasyonlu organik bileşenlerin ayrılması için, boyutsal ayırmanın yanı sıra, seçici bir ayırma yapılması gerekmektedir. Bu nedenle Pervaporasyon tekniği adı verilen, gözeneksiz membranların kullanıldığı seçici ayırım yapan bu tekniğin kullanılması, uçucu organik bileşenlerin sudan daha etkin bir biçimde ayrılması için önemlidir (Li vd. 2002; Peng vd. 2006; Uragami vd. 2001; Peng vd. 2003).

Bu çalışmada gözeneksiz bir membran hazırlanarak düşük konsantrasyonlu organik kirleticilerin sudan ayrılma performansı incelenmiştir. Organik kirletici olarak benzen aromatik hidrokarbonu seçilmiş ve düşük konsantrasyonda benzen-su çözeltisinden benzenin seçici olarak ayrılması hedeflenmiştir. Benzen aşırı kansorejen etkisinden dolayı, Avrupa ve Amerika sağlık kuruluşları tarafından birincil zararlı kimyasal olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle hem atık sudan hem de yüksek konsantrasyon içerdiği durumda buharlaştığı atmosfer ortamından giderilmesi zorunludur (Uragami vd. 2011; Peng vd. 2006).

Bu çalışmada benzen ayırımı için doğal kauçuk polimeri seçilmiştir. Her iki yapının da aromatik olmasından dolayı ve Hensen çözünürlük parametreleri göz önüne alındığında benzenin sudan yüksek seçicilikle ayrılacağı öngörülmüştür. Ancak doğal kauçuk tek başına membran film haline getirilemediği için polidimetil silokzan (PDMS) polimeri ile 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. PDMS polimeri literatürde benzen ayırımı için kullanılan bir polimerdir (Shao ve Huang, 2007; Peng vd. 2005; Uragami vd. 2011). PDMS tek başına kullanıldığında yüksek seçicilik değeri ile birlikte düşük akı değerleri elde edilmektedir. Bu çalışmada ilk kez doğal kauçuk ile harman haline getirilerek gözeneksiz membran üretilmiştir. Bu sayede seçiciliğin ve akının daha yüksek olacağı öngörülmektedir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Malzeme

% 99.9 saflıkta benzen Merck Chemicals, Türkiye firmasından temin edilmiştir. Poli(dimetil silokzan) polimeri Dow Chemical Türkiye temsilciliğinden temin edilmiştir. Deionize su laboratuvarında hazırlanmıştır. Dikünil peroksit (DCP) çapraz bağlayıcısı Aldrich, Chemical firmasından satın alınmıştır.

### 2.2. Membran hazırlanması

Gözeneksiz PDMS-doğal kauçuk membranı çözeltiden dökme ve buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Polimer oranları 1/1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kütlece %10 polimer içeren kloroform-polimer çözeltisi 50-60 °C sıcaklık arasında çözünene kadar karıştırılmıştır. Homojen olarak elde edilen çözelti içine toplam polimer kütlesinin %4'ü kadar DCP eklenmiş ve oda sıcaklığında yaklaşık üç saat karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti, içerisindeki gaz bileşenlerinden ayrılması için bir gece bekletilmiş ve teflon yüzeye dökülmüştür. Bir gece boyunca içerisindeki kloroformun uçması beklenmiş ardından 180 °C sıcaklıkta iki saat çapraz bağlama işlemi yapılmıştır. İnce bir film şeklinde elde edilen membranlar hem şişme testi hem de benzeni sudan ayırmak için kullanılmıştır.

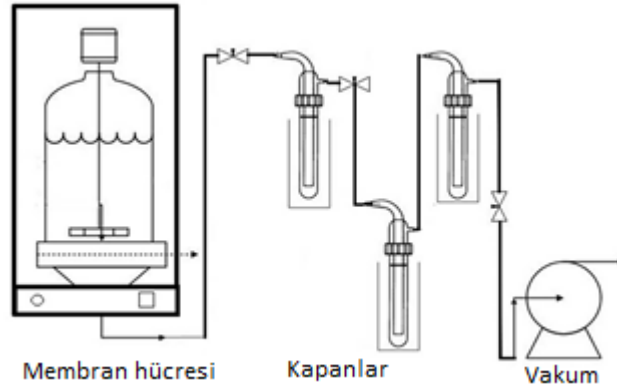
### 2.3. Şişme testleri

Şişme testleri membranın hangi bileşene ilgisi olduğunu belirlemek için yapılmıştır. Bunun için belirli miktarlarda kesilen membranlar iki saat süre ile hem saf benzen hem de %3 benzen içeren su-benzen çözeltisi içinde bekletilmiş ve on dakika aralıklarla membran ağırlıkları tekrar ölçülmüştür. Şişme dereceleri (Ş) Eşitlik 1'deki gibi membranın şişmeden önceki (Wi) ve şiştikten sonraki (Ws) ağırlıklarından hesaplanmıştır.

$$\text{Ş} = \frac{W_s - W_i}{W_i} * 100 \quad (1)$$

### 2.4. Ayırma testleri

Membran ayırma test ünitesi Şekil 1'de görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da kullanılan bu sistem bir membran hücresi, vakum ve besleme pompalarından oluşmaktadır. Ayrılacak olan çözelti membranın üst akımına beslenmektedir. Membranın çözelti ile temas eden üst bölgesindeki benzen membran yüzeyinde çözünür, membran alt akımından oluşturulan vakum sayesinde konsantrasyon farkı oluşturularak membrandan ayrılır. Uygulanan vakum sebebi ile alt akıma buhar fazda geçen bileşenler sıvı azot ile soğutulan kapanlarda toplanarak analiz edilmektedir.



Şekil 1. Deneysel membran ayırma sistemi

Saat başı kapanlardan toplanan akımlar toplanarak membranda akı (F) (g/m<sup>2</sup>.h) Eşitlik 2'deki gibi hesaplanmaktadır. Membranın ayırma performansını belirleyen diğer önemli faktör ise benzen ayırma faktörüdür. Saat başı kapanlardan alınan numuneler analiz edilerek içerisindeki benzen konsantrasyonu hesaplanmış ve ayırma faktörü (β) Eşitlik 3'deki gibi hesaplanmıştır. Burada M; saat başı kapanlardan alınan numune kütleleri, A; membranın aktif ayırma alanı, t; numune alındığı süre, y ve x sırasıyla geçen akım ve besleme akımındaki benzen (i) ve su (z) fraksiyonlarıdır.

$$F = \frac{M}{A \cdot t} \quad (2)$$

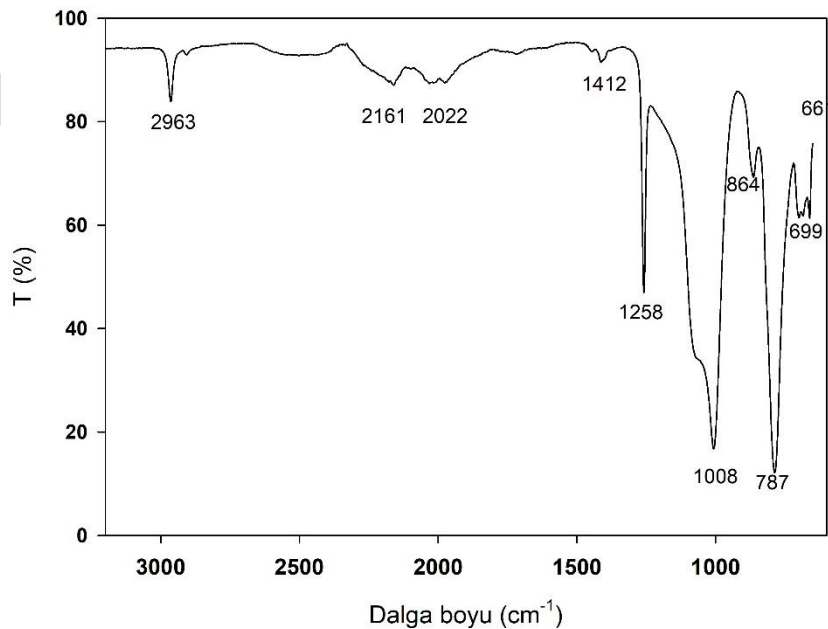
$$\beta = \frac{y_i/y_z}{x_i/x_z} \quad (3)$$

#### 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. Karakterizasyon Test Sonuçları

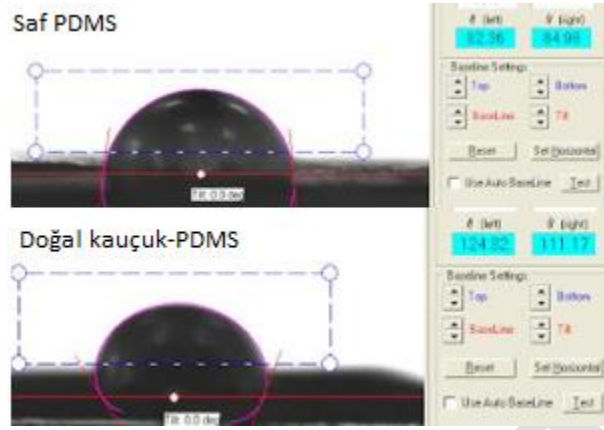
Şekil 2'de hazırlanan film halindeki polimerik membranın FTIR analizi görülmektedir. Bu analiz hem bağ yapılarını hem de çapraz bağlanma durumunu analiz edebilmek için önemlidir. 2963 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki pik PDMS ve doğal kauçuk içindeki CH<sub>3</sub> bağlarına aittir. 2161 cm<sup>-1</sup> ve 2022 cm<sup>-1</sup> bölgelerindeki pikler ise doğal kauçuktaki C=C çift bağına aittir. Peroksit çapraz bağlayıcısının içindeki C=O bandı ise 1712 cm<sup>-1</sup> piki ile görülmektedir. Bu da çapraz bağlanmayı işaret eder. Polimer içerisinde hala biraz DCP aromatik halka kalıntılarının olduğu 1008 cm<sup>-1</sup> bölgesindeki pik ile anlaşılmaktadır.

Şekil 3'de saf PDMS membran ve doğal kauçuk ile harman haline getirilen PDMS harman membran yüzeylerinin su ile yaptığı açı görülmektedir. Kullanılan PDMS membran yüzey temas açısı değeri ortalaması 83 derece iken, doğal kauçuk ile harman yapılan membran yüzey açısı 122 derecedir. Bu sonuca göre doğal kauçuk membran yüzey hidrofobitesinin daha yüksek olduğudur ve bu benzene daha seçici olacağını göstermektedir.





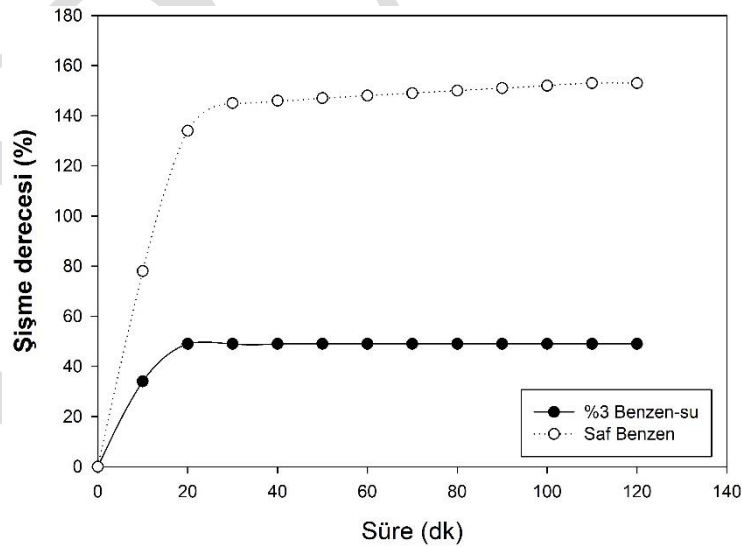
Şekil 2. Doğal kauçuk-PDMS membranının FTIR analizi



Şekil 3. Saf PDMS ve doğal kauçuk-PDMS harman membranının temas açısı testi

#### 4.2. Şişme Test Sonuçları

Şekil 4’de hazırlanan membranların, %3 benzen içeren sulu çözeltide ve saf benzende zamana bağlı şişme sonuçları görülmüştür. Saf benzende membranın ilk 30 dakikada %150 şişme derecesi görülmüştür. Bu da membranın benzene yüksek seçicilik gösterdiği görülmektedir. Sulu benzen çözeltisinde ise şişme derecesi daha düşüktür. Aslında membran ortama konulan benzenin tamamına yakını çekmiştir ama çözeltideki benzen oranı daha düşük olduğu için şişme derecesi düşüktür. Bu sonuca göre membran ayırma testlerinde membranın yüksek seçicilik ve ayırma faktörü ile benzeni ayıracağı görülmektedir. Saf su ile yapılan deneylerde ise membranın hiç su tutmadığı görülmüştür. Bunun nedeni suyun polaritesinin yüksek olmasıdır. Ayrıca Hensen çözünürlük parametrelerine göre de PDMS polimeri (16.5) benzen (18.6) ile yakın değerler verirken su (47.9) bu değerden çok uzaktır (Uragami vd. 2011).

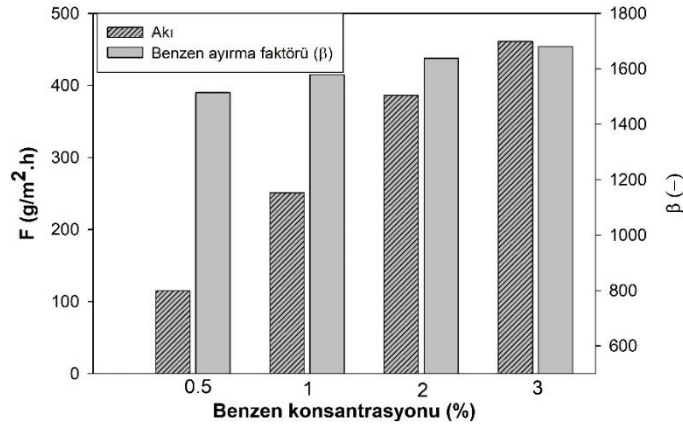


Şekil 4. Şişme test sonuçları

#### 4.3. Ayırma Test Sonuçları

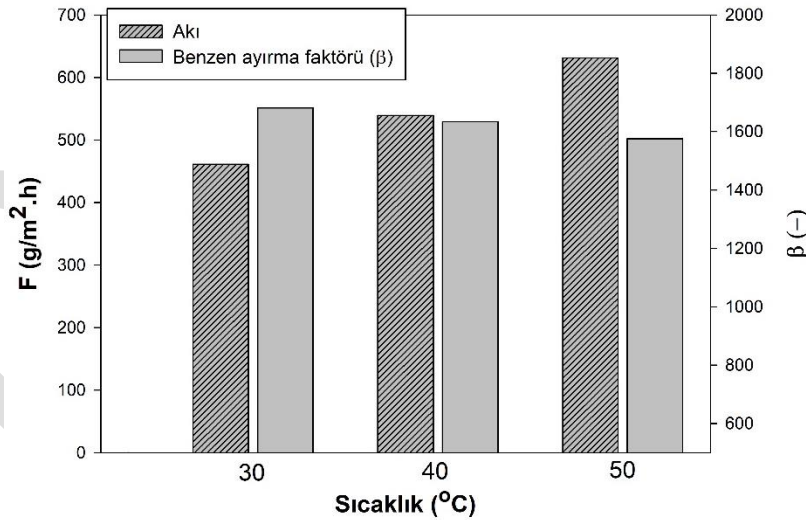
Şekil 5’de membran üst akımında değişen benzen konsantrasyonunun toplam akı değerine ve benzen ayırma faktörüne etkisi görülmektedir. Buna göre, besleme çözeltisinde benzen konsantrasyonu arttıkça hem akı değerleri hem de ayırma faktörü artmıştır. Membranın tarafları arasındaki itici gücün, benzen konsantrasyonundan dolayı artması beklenen bir sonuçtur. Genellikle akı ve ayırma faktörü arasında artan-azalan bir değişim söz konusu olurken bu çalışmada ayırma faktörü de artan benzen konsantrasyonundan dolayı artmıştır. Bunun nedeni kullanılan membranın suya ilgisinin hiç olmaması ve temas açısı testlerinden de görüldüğü gibi süper hidrofobik etkisi göstermesidir. Polimerler sadece benzene seçici olduğu için herhangi bir seçimsiz madde geçişi gözlenmemiştir. Bu nedenle matematiksel olarak da ayırma faktör değerleri akı

değerleri kadar belirgin olmasa da artmıştır. Benzen konsantrasyonu %0.5 den %3 e çıktığında, sabit 30 °C deney sıcaklığında akı değeri 116 g/m<sup>2</sup>.h'den 461 g/m<sup>2</sup>.h değerine çıkmıştır. Ayırma faktörü ise 1514'den 1681 değerine artış göstermiştir.



Şekil 5. Benzen konsantrasyonunun akı ve ayırma faktörüne etkisi (30 °C)

Şekil 6'da artan ayırma işlemi sıcaklığının akı ve ayırma faktörü üzerine etkisi görülmektedir. Buna göre sıcaklık arttıkça akı değerleri artmış ayırma faktörü ise azalmıştır. Akı değerindeki bu artış literatürdeki bütün çalışmalarda da görülmüştür. Sıcaklık arttıkça bileşenlerin buhar basınçları artmış böylece membranın tarafları arasındaki kimyasal potansiyel de artmıştır. Buna bağlı olarak akı değerleri artmaktadır. Bunun dışında gözeneksiz membrandan geçiş çözünme-difüzyon modeline bağlı olduğu için sıcaklık artışı ile hem benzenin membran yüzeyindeki çözünürlüğü hem de membran boyunca difüzyon hızı artmıştır. Aynı artış su için de geçerlidir ancak membran benzene seçici olduğu için ve suyla hiç etkileşime girmediği için sıcaklık artışı benzeni daha çok etkilemiştir. Ancak, sıcaklıkla birlikte membranın yapısal boşluklarının sayısının ve genişliğinin değişmesi ile seçici ayırma az da olsa etkilenmiş ve ayırma boyutsal ilkelere bağlı olarak da gerçekleşmiştir. Su molekülünün kinetik çapı benzen molekülünden düşük olduğu için de az da olsa sürüklenme olduğu için ayırma faktöründe düşüş görülmüştür.



Şekil 6. Sıcaklığın akı ve ayırma faktörüne etkisi (%3 benzen-su çözeltisi)

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada Doğal kauçuk ve PDMS polimerlerinden harman olarak hazırlanan gözeneksiz membranın benzen ayırmadaki performansı benzen konsantrasyonu ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Buna göre çözeltideki benzen konsantrasyonu arttıkça hem akı hem de benzen ayırma faktörü artmıştır. Sıcaklık artışı ise akı değerini arttırmıştır. Bu çalışmada elde edilen 461 g/m<sup>2</sup>.h akı değeri ve 1681 benzen ayırma faktörü değeri literatüre göre uygundur ve üretilen bu membranın organik bileşenlerin ve hidrokarbonların seçici olarak ayrılmasında kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Kujawski W. 2000. Application of Pervaporation and Vapor Permeation in Environmental Protection, Polish Journal of Environmental Studies, 9(1):13–26.
- Li J, Chen C, Han B, Peng Y, Zou J, Jiang W 2002. Laboratory and pilot-scale study on dehydration of benzene by pervaporation. Journal of Membrane Science, 203: 127–136.
- Ohshima T, Matsumoto M, Miyata T, Uragami T. 2005. Organic-Inorganic Hybrid Membranes for Removal of Benzene from an Aqueous Solution by Pervaporation. Macromolecular Chemistry and Physics 473–483.
- Peng F, Jiang Z, Hu C, Wang Y, Xu H, Liu J. 2006. Removing benzene from aqueous solution using CMS-filled PDMS pervaporation membranes. Separation and Purification Technology, 48: 229–234.
- Peng F, Pan F, Li D, & Jiang Z. 2005. Pervaporation properties of PDMS membranes for removal of benzene from aqueous solution : Experimental and modeling. Chemical Engineering Journal. 114: 123–129.
- Peng M, Vane, LM, Liu SX 2003. Recent advances in VOCs removal from water by pervaporation, Journal of Hazardous Materials, 98, 69–90.
- Shao P, & Huang, RYM. 2007. Polymeric membrane pervaporation. Journal of Membrane Science, 287: 162–179.
- Simko P, Kolek E, Skláršová B, Šimon P. 2006. Removal of benzene from water by adsorption on polymer materials, Journal of food and nutrition research. 45(4), 179–182.
- Uragami T, Sumida I, Miyata T, Shiraiwa T, Tamura H. 2011. Pervaporation Characteristics in Removal of Benzene from Water through Polystyrene-Poly (Dimethylsiloxane) IPN Membranes, (January). Materials Sciences and Applications, <https://doi.org/10.4236/msa.2011.23021>
- Uragami T, Yamada H, Miyata T. 2001. Removal of dilute volatile organic compounds in water through graft copolymer membranes consisting of poly ( alkylmethacrylate ) and poly ( dimethylsiloxane ) by pervaporation and their membrane morphology. Journal of Membrane Science, 187: 255–269.
- Weschayanwiwat P, Kunanupap O, Scamehorn JF. 2008. Chemosphere Benzene removal from waste water using aqueous surfactant two-phase extraction with cationic and anionic surfactant mixtures, Chemosphere, 72, 1043–1048.

## Application of response surface methodology for optimization of copper removal using a novel adsorbent

Filiz Ugur Nigiz<sup>1,\*</sup>, Seda Karayunlu Bozbas<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Kocaeli University, Department of Chemical Engineering, Kocaeli, Turkey  
Kocaeli University, Department of Chemistry, Kocaeli, Turkey

\*Corresponding author e-mail: filiz.ugur@kocaeli.edu.tr

### Abstract

In this study, a novel graphene-alginate adsorbent has been synthesized and used for copper removal from synthetic wastewater. In order to optimize the reaction parameters and to investigate the removal behavior, the central design of the RSM method has been adapted to the experimental data. The varying copper concentration, pH and adsorbent dosage have been selected as experimental factors and the effects of factors on removal have been investigated. The optimum operating time and separation temperature were obtained from previous experiments and were kept constant during the separation. As a result of the study, the synthesized adsorbent gave the copper removal performance over 90%. When the designing results were validated with the experimental results, less than 2% of error was found. The highest removal of 92.9% was obtained when the pH value was 4.5 and the adsorbent amount was 0.5 g.

**Keywords:** bio-based adsorbent, Cu (II) removal, response surface method

### INTRODUCTION

Heavy metals are chemical structures that can be found in both industrial wastewater and natural water resources and have destructive damages for the environment and human health (Barakat, 2011; Maralmaa et al. 2018; Fang et al. 2018). In recent years, the type and concentrations of heavy metals in wastewater increased resulted in developments in technology and industry. Concentrations of these chemicals in water are restricted by laws of Governments. In the chemical processes in-situ and ex-situ separation techniques are used in order to remove heavy metals from the wastewater. Chemical precipitation, membrane process, coagulation and flocculation, and adsorption methods are used to limit the concentration of metals in water (Famina et al. 2017; Fenglian et al. 2011). The important issue is to apply an effective separation with relatively low-cost technique. Adsorption is the most preferred and inexpensive method. The effectiveness of this method depends on both the process conditions of the separation and the activity of the adsorbent (Marton et al. 2018). The performance of the method has been increased by the use of reusable, regenerable, cheap and bio-based adsorbents. In recent years, the use of polymeric and natural sources such as zeolite or clay adsorbents for heavy metal removal has been studied (Ekramul Mahmud et al. 2017; Yunfang and Zihong, 2018; Babak et al. 2014). Bio-based adsorbents have many advantages such as sustainability (Ince and Ince, 2017).

Other factors affecting the efficiency of adsorption are the pH of wastewater, adsorbent dosage, metal concentration, temperature and other operating conditions. Especially in the planning of experimental studies, it is necessary to determine how these factors interact with each other to minimize the number of preliminary experiments. The most challenging stage of chemical processes is the determination of process parameters. At this stage, many experiments should be performed to determine the effect of independent variables on dependent variables. However, determining the statically modeling of the process depending on the unlimited experimental data is a costly route and takes a long time. Statistical experimental design methods help to minimize the number of experiments, optimize the process parameter and therefore, limit the cost of the overall chemical process. Design methods provide to identify the process variables by estimating the process parameters. In addition, it helps to understand interactions among the experimental parameters. Response Surface methodology (RSM) is an optimization method which is commonly used for the analysis of experimental data (Mourabet et al. 2014; Munavar et al. 2016) RSM integrates the independent process variables from the obtained experimental data and creates a statically model for the process. RSM can be used in different design processes such as adsorption, fermentation, distillation, extraction, chemical reaction or other processes of engineering.

In this study, a bio-based adsorbent composed of graphene, natural zeolite and alginate was used to remove Cu (II) from a synthetic remove Cu (II)-water solution. Sodium alginate has carboxyl groups which is being selective for cationic compounds. The natural zeolite – clinoptilolite- was used to selectively remove metal ions and to increase the surface area of the adsorbent. In addition, natural zeolite was used to reduce the cost of the adsorbent and to prevent excessive swelling of the polymer.

## MATERIALS AND METHODS

### Adsorbent synthesizing

In this study, graphene-clinoptilolite -natural zeolite- and graphene nanoplate doped adsorbent was prepared. An equal amount of alginate-zeolite was firstly dissolved in water under the constant rate mixing speed at the room temperature. The solid amount in water was approximately 5wt.%. After a homogeneous solution was obtained, 2 wt.% of GNP (respect to the total solid amount) was added to the solution, and was mixed for 3 hours. The solution was dropped into 3 wt% CaCl solution. The adsorbents were kept in the solution overnight and were washed and dried in the oven prior to use.

### Adsorption studies

The experiments were carried out in 100 mL Erlenmeyer with a total solution of 50 mL. Adsorption studies were conducted for 90 minutes at the room temperature by using a vertical rotating mixer. The influences of Cu (II) concentration (from 20 ppm to 100 ppm), pH (from 2 to 7) and adsorbent dosage (from 0.1 g to 0.5 g) on removal were investigated. The experimental limit conditions were determined according to the preliminary studies. For example, copper particles precipitated when the experiment was conducted at 7.5 pH. Hence, the maximum pH limit was determined as 7. The Cu (II) removal was calculated from the Equation 1 as follow;

$$R(\%) = \frac{C_f - C_i}{C_i} * 100$$

The order of the experiment was determined according to the Central Composite Design of RSM. Table 1 shows the experimental order, experimental factors and responses.

**Table 7.** Experimental design factor and responses

order	Run	Factor 1 A:Cu concentration (ppm)	Factor 2 B:pH	Factor 3 C:Amount of Adsorbent (g)	Response 1 Removal (%)
7	1	20	7	0.5	65.1
18	2	60	4.5	0.3	84.2
17	3	60	4.5	0.3	84.6
9	4	20	4.5	0.3	92.9
2	5	100	2	0.1	22.0
15	6	60	4.5	0.3	83.9
20	7	60	4.5	0.3	85.7
10	8	100	4.5	0.3	73.6
14	9	60	4.5	0.5	89.9
1	10	20	2	0.1	28.2
19	11	60	4.5	0.3	84.5
6	12	100	2	0.5	62.0
13	13	60	4.5	0.1	62.4
8	14	100	7	0.5	44.2
5	15	20	2	0.5	82.1
12	16	60	7	0.3	57.4
16	17	60	4.5	0.3	85.7
3	18	20	7	0.1	48.8
4	19	100	7	0.1	37.1
11	20	60	2	0.3	57.5

## RESULTS

In this study, a bio-based adsorbent was prepared to separate copper ions from water. Within the scope of the study, a new adsorbent synthesized and the effect of experimental variables on removal were determined by experimental design method. Variables were selected as pH, copper concentration, and adsorbent amount and the separation results were analyzed.

Fit summery of the results are shown in Table 2. Quadratic model is suggested with the R<sup>2</sup> of 0.99.

Table 2. Fit summary

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>	
Linear	0.1130	< 0.0001	0.1736	-0.2637	
2FI	0.6578	< 0.0001	0.0971	-3.2321	
<b>Quadratic</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0658</b>	<b>0.9967</b>	<b>0.9841</b>	<b>Suggested</b>
Cubic	0.0418	0.3141	0.9987	0.8986	Aliased

Table 3 indicated the Anova analysis for the suggested Quadratic model. There are three different factors to determine the convenience of the regression analysis. The F value indicated in the Table is 629.56 and shows the model is significant. P values also show the validity of the model and should be less than 0.05. However, the F values and the P values for AB, A<sup>2</sup> showed that these factors should be eliminated in the model equation. Lack of fit is the difference between the residual error and pure error. This value is important to obtain the adequacy of the regression model. It should be insignificant for the design model if the model fit with the experimental data. In Table 3, Lack of fit is seen as 12.73, and not significant.

Table 3. ANOVA for Quadratic model

Source	Sum of Squares	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	<b>8864.62</b>	<b>984.96</b>	<b>629.56</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>significant</b>
A-Cu concentration	614.99	614.99	393.09	< 0.0001	
B-pH	345.5	345.5	254.41	< 0.0001	
C-Amount of Adsorbent	2085.02	2085.02	1332.70	< 0.0001	
AB	5.27	5.27	3.37	0.0964	
AC	65.93	65.93	42.14	< 0.0001	
BC	623.34	623.34	398.42	< 0.0001	
A <sup>2</sup>	2.95	2.95	1.89	0.1994	
B <sup>2</sup>	1984.19	1984.19	1268.25	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	181.53	181.53	116.03	< 0.0001	
<b>Residual</b>	15.65	1.56			
<b>Lack of Fit</b>	<b>12.73</b>	<b>2.55</b>	<b>4.37</b>	<b>0.0658</b>	<b>not significant</b>
Pure Error	2.92	0.5832			
<b>Cor Total</b>	8880.27				

Table 4. Fit static

<b>Std. Dev.</b>	1.25	<b>R<sup>2</sup></b>	0.9982
<b>Mean</b>	66.59	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.9967
<b>C.V. %</b>	1.88	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0.9841
		<b>Adeq Precision</b>	79.4768

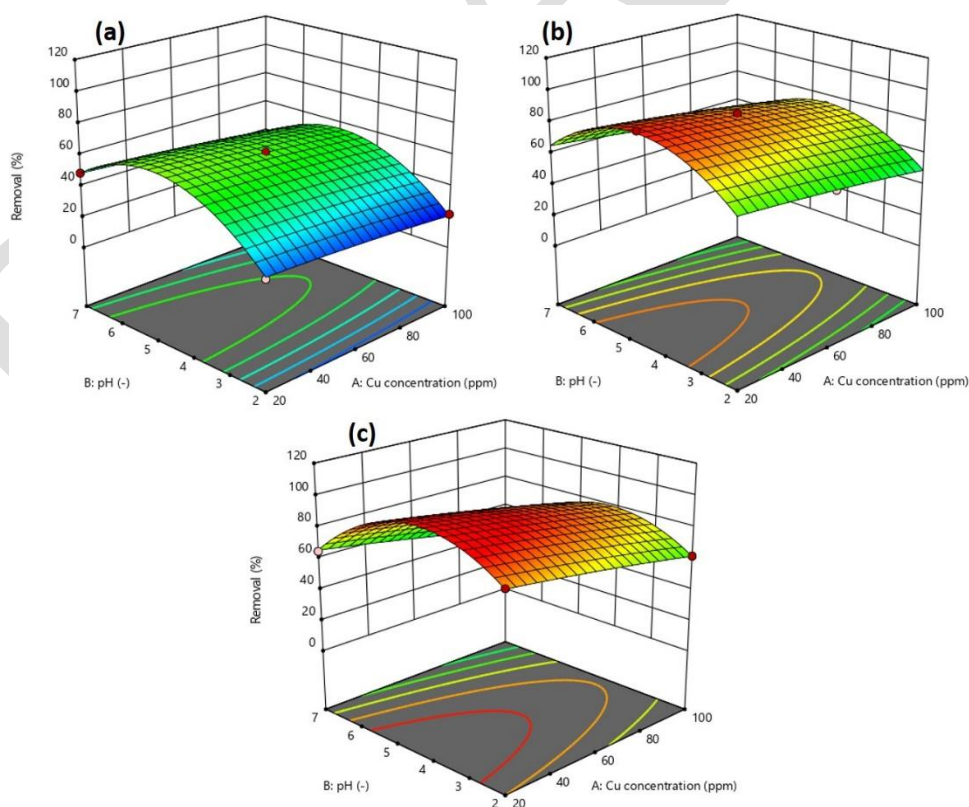
Table 4 shows the fit statics of the model. The difference between the predicted and adjusted R<sup>2</sup> indicated the fitting of the model. As seen in the Table, **Predicted R<sup>2</sup>** is 0.9841 and **Adjusted R<sup>2</sup>** is 0.9967. The difference is less than 0.2 implies that the model is adequate. Another factor to check the fitting of the model is **Adeq Precision**. This ratio should be greater than 4. As seen in Table 4, Adeq Precision of 79.477 indicates an adequate signal.

The equation (Eq.2) of the model is shown as follow:

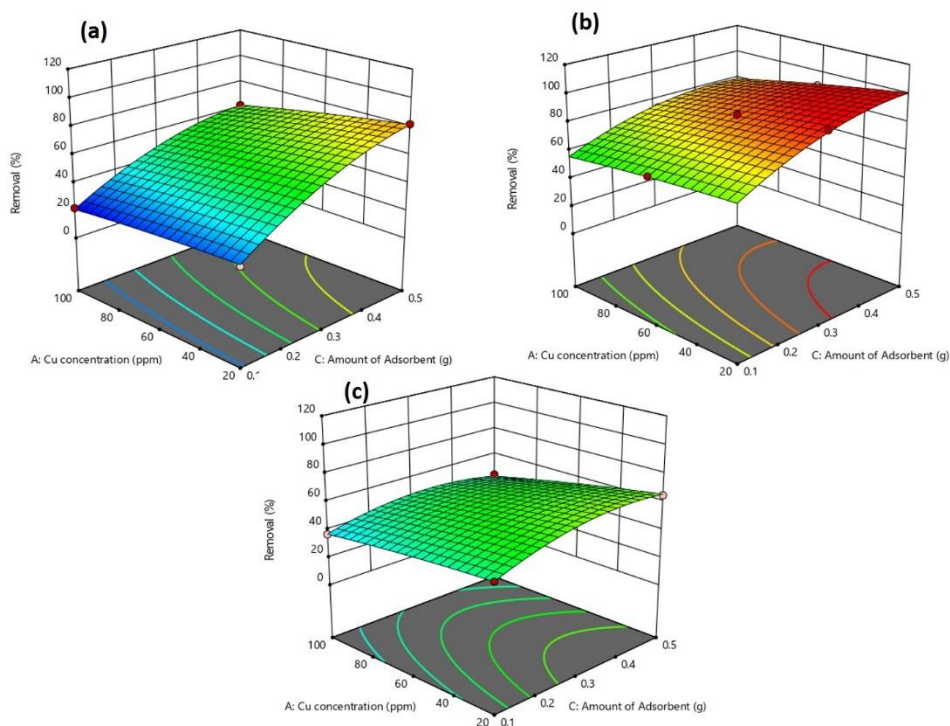
$$\text{Removal} = 84.5967 + (-7.84212) * A + (-4.45) * B + (14.4396) * C + (-2.87081) AC + (-8.82706) BC + (-26.8612) B^2 + (-8.12481) C^2 \quad (2)$$

In Figure 1, the effects of pH and Cu (II) concentration on removal results are given depending on the varying adsorbent amount. When the amount of adsorbent increases from 0.1 g to 0.5 g, Cu (II) removal increases regardless of the pH and copper concentration. This is an expected result. As the amount of adsorbent increases, the number of active sites on the adsorbent increase. Since there is no adsorbent-Cu (II) saturation, the removal enhances. As shown in all figures, the effect of copper concentration on separation is less than other factors. It shows a more linear change compared to pH. The pH change shows an increasing-decreasing effect on the removal. The highest removal results are seen when the pH value was between 4-5. At the higher copper concentrations, the removal decreases with increasing pH value. When the concentration of Cu (II) was 100 ppm, (the adsorbent amount is 0.5g), removal values of 62% and 44.2 % were obtained at pH=2 and pH=7, respectively. When the Cu (II) concentration was 20 ppm, 28.2 % and 48.8% of Cu (II) removal results were obtained at pH=2 and pH=7, respectively. The highest removal value was found as 92.9% when the Cu (II) concentration was 20 ppm and the pH value was 4.5. 91.4% of removal is obtained according to the designed model. The regression model shows less than 2% error even the response is high.

Figure 2 shows the effect of Cu(II) concentration and amount of adsorbent on Cu (II) removal at different pH values. As indicated in the Figure, the effect of copper concentration on removal is relatively low at constant pH value and adsorbent amount. The effect of the adsorbent amount on the response was more significant at lower pH values (Figure 2a and Figure 2b). At low pH value, the lowest separation values were obtained when the adsorbent amount was 0.1 g. Experimentally, the lowest removal value was obtained when the solution pH was 2 and the amount of adsorbent was 0.1. 22% of removal was seen at the copper concentration of 100 ppm. According to the design model, 21.1% of removal was observed. The prediction stage of the model shows that 100% Cu (II) removal is possible at the condition of 4.5 pH, 20 ppm Cu (II) concentration when the adsorbent amount is used as 0.45 g.

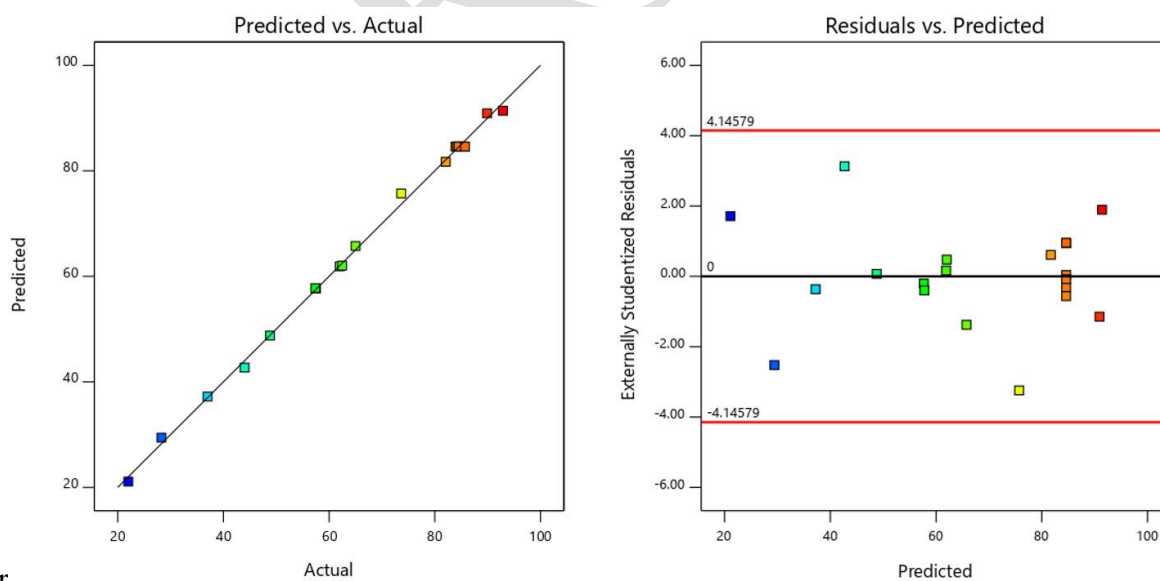


**Figure 1.** Effects of pH and Copper concentration on the removal when the adsorbent amount is 0.1 g(a), 0.3 g(b) and 0.5 g (c)



**Figure 2.** Effects of adsorbent amount and Cu(II) concentration on the removal when pH is 2 (a), 4.5 g(b) and 7(c)

Figure 3 represents the confirmation graphs of the model and experiment data. In Figure 3a, data predicted by the model and actual are compared. Almost a strength line is seen in Figure 3a. The estimated and actual values are very close to each other. This result shows the acceptability of the model under the limit of given factors (pH: from 2 to 7, Cu (II) concentration from 20 ppm to 100 ppm and adsorbent amount: from 0.1 g to 0.5 g). Figure 3b indicates the relationship between the studentized residual and predicted values. Although some of the results are far from each other, all data remain within the red line limit. Thus, this result refers to the applicability of the model.



**Figure 3.** Relationship between predicted and actual removal results (a) and studentized residual and predicted value (b)



## CONCLUSION

In this study, a novel adsorbent with the combination of graphene, natural zeolite and alginate was synthesized. The effectiveness of the adsorbent was investigated to remove Cu (II) from synthetic wastewater. In addition, the experimental behavior of the process was simulated by regression analysis and the suitability of this model was investigated. According to the results, greater than 90% of Cu (II) separation was achieved in a short period of 90 minutes. It was observed that the optimum pH condition to remove Cu(II) from the water was 4.5. According to the experimental data, when the system was analyzed, it was observed that the most effective factor was solution pH. Nevertheless, as the amount of adsorbent increased, the removal efficiency increased. When the experimental data and designed model were compared, it was seen that the model was suitable within the given limit values and the residual between experimental-designed model was less than 2%. The highest separation value was found to be 92.9% at 20 ppm copper concentration when pH was 4.5 and adsorbent amount was 0.5 g. The lowest removal result was found as 22% when the Cu(II) concentration was 100 ppm, the adsorbent amount was 0.1 g and pH was 2. In addition, the confirmation results showed that the experimental responses were predictable within the given limit values of pH, adsorbent amount and Cu (II) concentration. According to the point prediction stage of experimental design, 100% Cu (II) removal could be possible at the condition of 4.5 pH, 20 ppm Cu (II) concentration when the adsorbent amount was greater than 0.45 g.

## REFERENCES

- Barakat MA, 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4:361-377.
- Maralmaa B, Erdenechimeg D, Koichiro S, Koichiro S, Yoshihiro S. 2018. Removal and Recovery of Heavy Metals from Industrial Wastewater by Precipitation and Foam Separation Using Lime and Casein. *Journal of Environmental Science and Technology* 11:1-9.
- Fang L, Li L, Qu Z, Xu H, Xu J, Yan N. 2018. A novel method for the sequential removal and separation of multiple heavy metals from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 342:617–624.
- Femina Carolina C, Senthil Kumara P, Saravanana A, Janet Joshiba G, Naushad M 2017. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5:2782–2799.
- Fenglian F, Qi W. 2011. Removal of Heavy Metal Ions from Wastewaters: A Review, *Journal of Environmental Management* 92(3):407-18.
- Ince M, Ince OK. 2017. An Overview of Adsorption Technique for Heavy Metal Removal from Water/Wastewater: A Critical Review, *Int. J. Pure Appl. Sci.* 3(2): 10-19.
- Marton C, Eva N, Ilona F, Prespa Y, and Csaba F. 2018. Review of Heavy Metal Adsorption Processes by Several Organic Matters from Wastewaters. *Water*, 10:1377-1392.
- Ekramul Mahmud HNM, Obidul Huq AK, Rosiyah Y. 2017. Polymer-based adsorbent for heavy metals removal from aqueous solution. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Volume 206.
- Yunfang L, Zihong Z. 2018. Preparation of Polymeric Adsorbent and Study of Its Adsorption of Heavy Metal Ions in Water. *Journal of Coastal Research*, Special Issue No. 83.
- Babak S, Chil-Hung C, Jiangning W. 2014. Organic-Inorganic Hybrid Polymers as Adsorbents for Removal of Heavy Metal Ions from Solutions: A Review, *Materials*, 7: 673-726.
- Mourabet M, El Rhilassi A, Hicham EL B, Taitai A. et al. 2014. Use of response surface methodology for optimization of fluoride adsorption in an aqueous solution by Brushite. *Arabian Journal of Chemistry* 217(S2).
- Munawar I, Nida I, Ijaz Ahmad B, Naseer A, Muhammad Z. 2016. Response surface methodology application in optimization of cadmium adsorption by shoe waste: A good option of waste mitigation by waste. *Ecological Engineering*; 88:265-275.

## Synthesis of new pyrazolium based tunable aryl alkyl ionic liquids and their use in removal of methylene blue from aqueous solution

Melek Özdemir

Middle East Technical University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering,  
Ankara, Turkey.

Corresponding author e-mail: ozmelek@metu.edu.tr

### Abstract

In this study, two new pyrazolium based tunable aryl alkyl ionic liquids, 2-ethyl-1-(4-methylphenyl)-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate (3a) and 1-(4-methylphenyl)-2-pentyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate (3b), were synthesized via three-step reaction and characterized. The removal of methylene blue (MB) from aqueous solution has been investigated using the synthesized salts as an extractant and methylene chloride as a solvent. The obtained results show that MB was extracted from aqueous solution with high extraction efficiency up to 87 % at room temperature at the natural pH of MB solution. The influence of the alkyl chain length on the properties of the salts and their extraction efficiency of MB was investigated.

**Keywords:** TAAILs, Methylene blue, Pyrazolium cations,  $\text{BF}_4^-$ , Alkyl chain length

### INTRODUCTION

Methylene blue, a cationic dye, is one of the most commonly used dyestuffs in the textile industry for dyeing cotton, wool, and silk. MB has a relatively stable structure and poor biodegradability in the natural environment compared with other dyes. An excessive amount of MB causes some side effects such as cardiovascular disorder, allergic reactions, vomiting, headache, red blood cell breakdown [Patil et al., 2017, Sharma and Kaur, 2018, Chen et al., 2014]. Hence the removal of MB from the wastewater before being discharged into the environment is an important research area. The widely investigated methods include adsorption with a variety of adsorbents, biological treatment, and liquid-liquid extraction (LLE) processes. The LLE methods with high extraction efficiency have been applied for the removal MB from the aqueous solution using various extractants such as salicylic acid, sodium dodecylbenzene sulfonate, and benzoic acid [Tang et al., 2017, Liu et al., 2013, Guo, 2019, Sonia and Muthuraman, 2015, Muthuraman et al., 2009, El-Astoukhy and Fouad, 2015].

In recent years, a new class of ionic liquids so-called tunable aryl alkyl ionic liquids (TAAILs) based on aryl/alkyl substituted cations have gained much attention because of their high degree of flexibility. Unlike known alkyl substituted ILs, the properties of TAAILs can be tuned by additional mesomeric and inductive effects. TAAILs consisting of imidazolium, 1,2,3-triazolium, and pyrazolium cations and various anions have been synthesized [Ahrens et al., 2009, Meyer and Strassner, 2011, Özdemir and Özgün, 2014, Özdemir and Özgün 2017] and used in several reactions [Strassner et al., 2011, Schulz and Strassner, 2013, Schroeter et al., 2018, Schmolke et al., 2019].

In this study, two new 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium  $\text{BF}_4^-$  salts were synthesized and characterized. The removal of methylene blue from aqueous solution has been carried out with high extraction efficiency using synthesized TAAILs as an extractant and methylene chloride as a solvent. The results obtained were compared to demonstrate the influence of the alkyl chain length on the melting points of the synthesized salts and their extraction efficiency of MB from aqueous solution.

### MATERIALS AND METHODS

All chemicals used in this study purchased from common suppliers were of analytical grade and used as received without further purification. Pentyl methanesulfonate and 1-(4-methylphenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole (1a) were synthesized according to the described procedures [Kolodziejczyk and Manning, 1981, Özdemir and Özgün, 2017]. Microsynth - Milestone oven was used for the microwave-assisted synthesis of 1a, 2a, and 2b. The infrared spectra were recorded with Thermo Fischer Scientific Nicolet iS10 FT-IR spectrometer. Bruker-Avance-300 MHz spectrometer was used to obtain  $^1\text{H}$  (300 MHz),  $^{13}\text{C}$  (75 MHz), and  $^{19}\text{F}$  (282 MHz) spectra. The melting points of the salts were determined with Electrothermal 9200 melting point apparatus. Hach DR 3900 spectrophotometer was used to determine the MB concentration in water.

### General procedure for the synthesis of 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium methanesulfonates (2a, 2b)

1-(4-methylphenyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrazole (5.0 mmol) was dissolved in acetonitrile (5.0 mL), and equivalent moles of ethyl methanesulfonate (for 2a) or pentyl methanesulfonate (for 2b) added. The reaction mixture was heated at 80 °C under MW irradiation for 30 minutes. After completion of the reaction, acetonitrile was evaporated, and the resulting product washed two times with hexane (20 mL) and two times with diethyl ether (20 mL), respectively. Then, the crude product was dissolved in acetonitrile (20 mL), active charcoal added and stirred vigorously under reflux conditions for 2 hours. The mixture was cooled to the room temperature and filtrated. Subsequently, the filtrate was dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated. The salts obtained were dried under vacuum for 48 hours at 75 °C.

#### *2-ethyl-1-(4-methylphenyl)-3,5-dimethylpyrazolium methanesulfonate (2a)*

IR (ATR)  $\nu$  = 3059, 2985, 1654, 1560, 1483, 1418, 1209, 1175, 1037, 767, 716. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS):  $\delta$  = 1.09 (t, J = 7.3 Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.10 (q, J = 7.3 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.82 (s, 1H, CH), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ph), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ph). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 11.79, 12.28, 14.30, 21.39, 40.15, 42.87, 108.46, 129.0, 129.18, 131.47, 143.15, 147.16 and 147.79. Yield: (1.35 g) 87 %, yellow viscous liquid.

#### *1-(4-methylphenyl)-2-pentyl-3,5-dimethylpyrazolium methanesulfonate (2b)*

IR (ATR)  $\nu$  = 3059, 2957, 1653, 1560, 1510, 1460, 1419, 1167, 1038, 767, 716. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS)  $\delta$  = 0.73 (t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.07 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.81 (s, 1H, CH), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ph), 7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ph). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 12.38, 12.49, 13.58, 21.46, 21.76, 28.13, 28.62, 39.41, 47.75, 108.65, 128.66, 128.80, 131.28, 143.23, 147.26 and 147.72. Yield: (1.41 g) 79.9 %, brown liquid.

### General procedure for the synthesis of 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborates (3a, 3b)

To a stirred solution of appropriate 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium methanesulfonate salt (5.0 mmol) in water (10 mL) was added tetrafluoroboric acid solution (5.0 mmol, 48% in water) over 10–15 min at room temperature. Then the reaction mixture was allowed to stir for 2 hours. The precipitated solid was filtered, recrystallized from ethanol and dried under vacuum for 48 h at 75 °C.

#### *2-ethyl-1-(4-methylphenyl)-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate (3a)*

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)  $\nu$  = 3059, 2979, 1560, 1510, 1485, 1448, 1416, 1047, 1035, 963, 820. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS)  $\delta$  = 1.10 (t, J = 7.2 Hz, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.10 (q, J = 7.2 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.80 (s, 1H, CH), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 11.72, 12.23, 14.27, 21.36, 42.83, 108.42, 128.98, 129.15, 131.48, 143.19, 147.14 and 147.81. <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = -148.28, -148.22. M.p. 99.0 °C. Yield: (1.27 g) 84.1 %, white solid.

#### *1-(4-methylphenyl)-2-pentyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate (3b)*

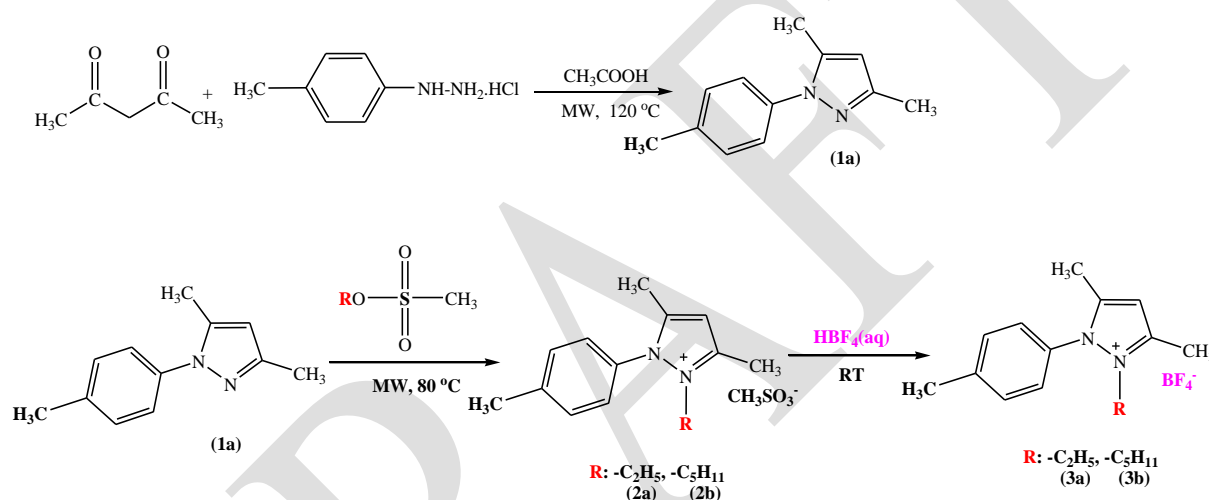
IR (ATR, cm<sup>-1</sup>)  $\nu$  = 3047, 2955-2869, 1558, 1510, 1482, 1420, 1032, 978, 833. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25 °C, TMS)  $\delta$  = 0.74 (t, 3H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.07 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.55 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.07 (t, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.81 (s, 1H, CH), 7.53 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ph). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = 11.98, 12.30, 13.90, 21.36, 21.62, 27.85, 28.04, 47.22, 108.40, 129.04, 129.12, 131.39, 143.13, 147.51, 147.91. <sup>19</sup>F NMR (282 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  = -148.28, -148.22. M.p. 63.5 °C. Yield: (1.39 g) 80.8 %, light brown solid.

## General procedure for removal of MB from aqueous solution

The aqueous solution of methylene blue (5 mL) and the solution of 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate salt in methylene chloride (5 mL) was taken in a separating funnel. Then the mixture was shaken thoroughly, and it was allowed to stand to form separated layers. After observation of separated layers, the upper aqueous phase was collected. The remaining concentration of MB in water was determined with UV-vis spectrophotometer at its maximum absorption wavelength (660 nm).

## RESULTS AND DISCUSSION

The synthetic pathway for preparing 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate ionic liquids is shown in Figure 1. The structure of the pyrazolium salts was elucidated by FTIR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, and <sup>19</sup>F NMR (3a, 3b). All the spectral data confirmed the structures of the synthesized ionic liquids. The FTIR spectra of all the salts show the characteristic bands of the pyrazolium cation and counterions ([CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]). The CH proton of pyrazolium cation and aromatic protons of aryl ring were verified with <sup>1</sup>H NMR spectra by the presence of one singlet around δ 6.80–6.82 ppm and doublets around δ 7.53–7.60 ppm, respectively. In addition, <sup>19</sup>F NMR spectra of 3a and 3b salts show two signals at ca. δ -148.28 and -148.22 due to the coupling of the <sup>19</sup>F nucleus with the two different boron isotopes.



**Figure 1.** Synthesis of 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium BF<sub>4</sub><sup>-</sup> ionic liquids

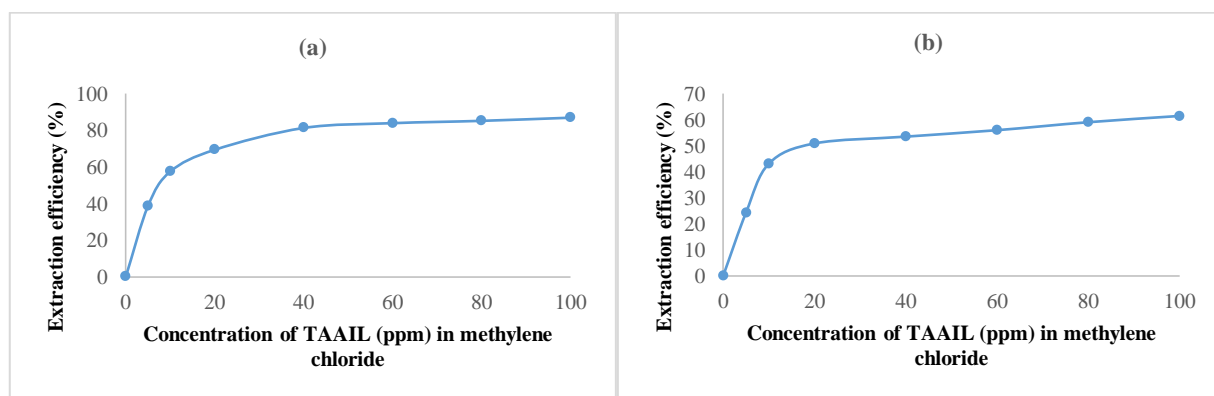
All of the synthesized pyrazolium salts have melting points below 100 °C and fulfill the IL criteria. Based on the results obtained, the increase in the alkyl chain length has led to a reduction of melting points of synthesized 1-(4-methylphenyl)-2-alkyl-3,5-dimethylpyrazolium tetrafluoroborate ionic liquids. Furthermore, synthesized methanesulfonate salts are in the liquid state at room temperature, while tetrafluoroborate salts are in the solid state due to the much stronger coordination of tetrafluoroborate anion with pyrazolium cation compared to the methanesulfonate anion.

The removal of MB from aqueous solution by LLE method was investigated using synthesized salts as an extractant and methylene chloride as a solvent. Primarily, a calibration curve of methylene blue was prepared using different concentrations of MB solutions in deionized water (2-16 ppm). All the extraction experiments were carried out at the natural pH of 20 ppm MB solution at ambient temperature. The extraction efficiency (E%) was calculated by using the Eq. (1).

$$E \% = \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (1)$$

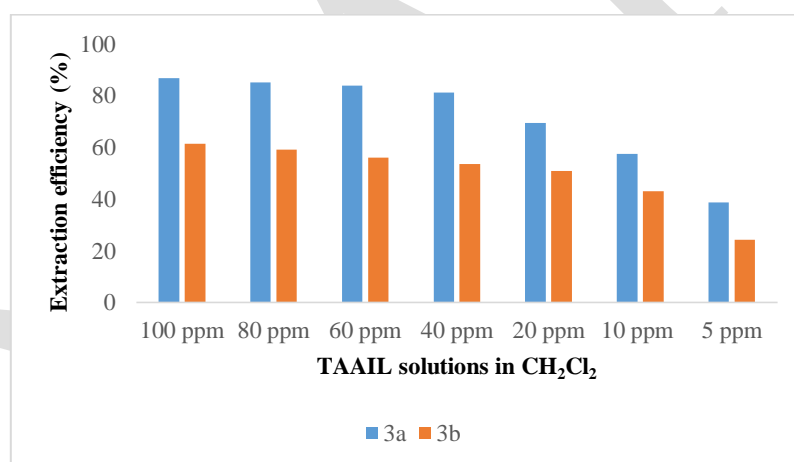
*C<sub>i</sub>*: initial concentration of MB (ppm) in the aqueous phase and *C<sub>f</sub>*: final concentration of MB (ppm) in the aqueous phase.

A series of experiments were carried out by using different concentrations of 3a and 3b salts (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 ppm) in methylene chloride. As seen in Figure 2, the negligible amounts of MB were removed from the aqueous solution when only methylene chloride used for the extraction experiments. On the other hand, the highest extraction efficiencies were achieved using 3a (87 %) and 3b (63 %) salts as an extractant and methylene chloride as a solvent.



**Figure 2.** The extraction efficiency of MB from aqueous solution using different concentrations of (a) 3a and (b) 3b salts (5, 10, 20, 40, 60, 80, and 100 ppm) in methylene chloride.

As seen in Figure 3, the length of the alkyl chain has a significant effect on the extraction efficiency of MB from aqueous solution and increasing the alkyl chain length of the pyrazolium cation results in a decrease in the extraction efficiency of MB.



**Figure 3.** The effect of the alkyl chain length on the extraction efficiency of MB

## CONCLUSION

In conclusion, two new pyrazolium based tunable aryl alkyl ionic liquids were synthesized and characterized. Melting points of the tetrafluoroborate salts were determined. According to the results obtained, both the alkyl chain length and type of the anions ([CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>], [BF<sub>4</sub><sup>-</sup>]) affect the melting points of synthesized salts. The removal of methylene blue from aqueous solution by using synthesized tetrafluoroborate salts as an extractant and methylene chloride as a solvent has been achieved with high extraction efficiency up to 87 %. It may be expected that the type and position of the substituents at the phenyl ring and exchange of the anion have an influence on the extraction efficiency of MB from aqueous solution. Therefore, new studies can be conducted with various types of TAAILs to improve the extraction efficiency of MB.

## REFERENCES

- Ahrens S, Peritz A, Strassner T, 2009. Tunable aryl alkyl ionic liquids (TAAILs): the next generation of ionic liquids. *Angewandte Chemie International Edition*, 48:7908-7910.
- El-Ashtoukhy, ESZ, Fouad YO, 2015. Liquid-liquid extraction of methylene blue dye from aqueous solutions using sodium dodecylbenzenesulfonate as an extractant. *Alexandria Engineering Journal*, 54: 77-81.
- Guo J, 2019. Enhancing biological removal of methylene blue from aqueous solutions using bacillus subtilis inoculated rice straw. *Journal of Environmental Engineering*, 145: 1-7.
- Kolodziejczyk AM, Manning M, 1981. A convenient method for O-alkylation of N-substituted tyrosines using a crown ether. *The Journal of Organic Chemistry*, 46: 1944-1946.
- Liu L, Lin Y, Liu Y, Zhu H, He Q, 2013. Removal of methylene blue from aqueous solutions by sewage sludge based granular activated carbon: adsorption equilibrium, kinetics, and thermodynamics. *Journal of Chemical Engineering Data*, 58: 2248-2253.
- Meyer D, Strassner T, 2011. 1,2,4-Triazole-based tunable aryl/alkyl ionic liquids. *The Journal of Organic Chemistry*, 76:305-308.
- Muthuraman G, Teng TT, Leh CP, Norli I, 2009. Extraction and recovery of methylene blue from industrial wastewater using benzoic acid as an extractant. *Journal of Hazardous Materials*, 163:363-369.
- Özdemir MC, Özgün B, 2014. Phenyl/alkyl-substituted-3,5-dimethylpyrazolium ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 200: 129-135.
- Özdemir MC, Özgün B, 2017. Tunable aryl alkyl ionic liquids (TAAILs) based on 1-aryl-3,5-dimethyl-1H-pyrazoles. *Journal of Molecular Liquids*, 248: 314-321.
- Patil MA, Shinde JK, Jadhav AL, Deshpande SR 2017. Adsorption of methylene blue in waste water by low cost adsorbent rice husk. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 10(1): 246-252.
- Schmolke L, Lerch S, Bülow M, Siebels M, Schmitz A, Thomas J, Dehm G, Held C, Strassner T, Janiac C, 2019. Aggregation control of Ru and Ir nanoparticles by tunable aryl alkyl imidazolium ionic liquids. *Nanoscale*, 11: 4073-4082.
- Schroeter F, Lerch S, Kaliner M, Strassner T, 2018. Cobalt-catalyzed hydroarylations and hydroaminations of alkenes in tunable aryl alkyl ionic liquids. *Organic Letters*, 20: 6215-6219.
- Schulz T, Strassner T, 2013. Biphasic platinum catalyzed hydrosilylation of terminal alkenes in TAAILs. *Journal of Organometallic Chemistry*, 744: 113-118.
- Sharma S, Kaur A 2018. Various Methods for removal of dyes from industrial effluents- A review. *Indian Journal of Science and Technology*, 11(12):1-21.
- Shi Y, Zhang S, Wu M, Chen J, 2014. Comparing different kinds of materials for adsorption of methylene blue. *Applied Mechanics and Materials*, 651-653: 1331-1334.
- Soniya M, Muthuraman G, 2015. Recovery of methylene blue from aqueous solution by liquid-liquid extraction. *Desalination and Water Treatment*, 53: 2501-2509.
- Strassner T, Schulz T, Bernhard G, Raff J, Lehmann F, 2011. Selective extraction of noble metals from an aqueous phase using ionic liquids. WO2013017588A1.
- Tang R, Dai C, Li C, Liu W, Gao S, Wang C, 2017. Removal of methylene blue from aqueous solution using agricultural residue walnut shell: equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Journal of Chemistry*, 2017:1-10.

## Yüksek su adsorpsiyon kapasitesine sahip MOF dolgusu içeren karma matris sodyum alginat membran ile bütanol dehidrasyonu

Derya Ünlü

Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:derya.unlu@btu.edu.tr

### Özet

n-Butanol gelecek vaat eden bir biyoyakıttır. Çoğunlukla aseton-bütanol-etanol (ABE) fermantasyonu ile üretilebilir. Genellikle, fermantasyon sonrasında bütanol konsantrasyonu ağırlıkça %2'ye ulaşamaz. Biobütanol, pervaporasyon (PV) kullanılarak %99.5 saflıkta geri kazanılabilir. Bu çalışmada da katkısız sodyum alginat membran ve MOF dolgusu içeren karma matris sodyum alginat membran kullanılarak pervaporasyon ile bütanolün dehidrasyonu gerçekleştirilmiştir. Katkılı ve katkısız membranların ayırma performansları incelenmiştir. Yüksek su adsorpsiyon kapasitesine sahip MOF dolgusu içeren karma matris sodyum alginat membran ile daha yüksek oranda, başarılı bir dehidrasyon işleminin gerçekleştiği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Bütanol, dehidrasyon, MOF, sodyum alginat, pervaporasyon

### Dehydration of butanol by MOF loaded mixed matrix sodium alginate membrane with high water adsorption capacity

#### Abstract

n-Butanol is a promising future biofuel. It can be produced in the so-called Acetone–Butanol–Ethanol (ABE) fermentation. The concentration of butanol in the fermentation broth does not usually reach 2 wt.%. Biobutanol should be recovery as 99.5% purity. In this study, dehydration of butanol by pervaporation was performed by using pristine sodium alginate membrane and MOF loading mixed matrix sodium alginate membrane. Separation performances of pristine and MOF loading membranes were investigated. It has been observed that the mixed matrix sodium alginate membrane containing MOF with high water adsorption capacity displays success dehydration performance.

**Keywords:** Butanol, dehydration, MOF, pervaporation, sodium alginate

### GİRİŞ

Kömür, ham petrol, doğalgaz gibi yakıtların kullanımı birçok tehdit yaratmakta ve çevre kirliliğine yol açmaktadır. Kimya endüstrisi çevre ve insan sağlığını korumak için yakıt maddelerini ve yakıt maddesi üretim yöntemlerini değiştirme zorluğuyla karşı karşıyadır. Son yıllarda yakıtların biyolojik üretimi büyük önem kazanmıştır. Biyoetanol, biyobütanol ve biyodizel gibi yakıtlar artan enerji talebi, tükenen fosil yakıt kaynakları ve küresel sera gazı emisyonlarını azaltma ihtiyacından dolayı geleneksel yakıtlara cazip bir alternatif oluşturmaktadır (Rdzanek ve ark., 2018).

Üstün bir yakıt adayı olan biyobütanol, benzine benzer özelliklere sahiptir. Etanol gibi geleneksel biyoyakıtlarla karşılaştırıldığında bütanol, daha yüksek enerji içeriği ve daha düşük uçuculuk gibi avantajlara sahiptir. Daha da önemlisi herhangi bir modifikasyon gerektirmeden mevcut içten yanmalı motorlarda yakıt katkısı olarak ya da benzine alternatif bir yakıt olarak doğrudan kullanımı mümkündür (Cai ve ark., 2018).

Biyobütanolün yakıt olarak kullanılabilmesi için üretim sonucunda saf olarak elde edilmesi önemlidir (Lin ve ark., 2018). Bütanol çoğunlukla şeker, gliserol veya lignoselülozik atıklardan fermantasyon yolu ile üretilir. Fermantasyon sonucunda %3'ten daha az konsantrasyonda elde edilen bütanol distilasyonla konsantre edilerek %80 bütanol içeren çözeltiler elde edilir. %80 bütanol içeren bu ortamda suyun varlığı büyük ölçüde beklenmektedir ve bu nedenle bütanolden suyu uzaklaştırmak için etkili ve enerji tasarrufu sağlayan tekniklerin geliştirilmesi önemlidir. Membran destekli ayırma prosesi olan pervaporasyon ile %80 bütanol içeren sulu çözeltilerin %99.5 saflıkta elde edilmesi mümkündür (Rdzanek ve ark., 2018; Liu ve ark., 2013).

Pervaporasyon sıvı-sıvı karışımları ayırmada kullanılan, sıvı karışım içerisindeki bir bileşenin yoğun membran arasından seçici geçtiği membran destekli bir ayırma prosesidir. Kimyasal potansiyel gradyenti ile yürütülür. Sıvı, membranı buhar olarak terk eder ve yoğunlaştırılarak tekrar sıvı olarak elde edilir. Bu proses ekonomik, enerji ve çevre dostudur (Baker, 2000, Basile ve ark., 2016).

Pervaporasyonda yoğun homojen membran, besleme ve geçen akım arasında bariyer olarak rol alır. Sıvı çözeltideki bileşenler membranda çözünerek ve difüze olarak farklı hızlarda membrandan geçer ve sonra membranın alt akımından buharlaşır. Geçen buhar akımı kondensere geçer ve çözelti yoğunlaştırılır.

Literatürde bütanolün geri kazanımı ve dehidrasyonu için pervaporasyon prosesinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Ancak seçilen polimerin ve metal organik kafes yapının bir arada kullanıldığı karma membranlarla yapılan bütanol dehidrasyonu için pervaporasyon uygulamasına rastlanmamıştır. Çalışmada bu açıdan oldukça özgün değere sahiptir. Metal organik kafes yapıların membrana eklenmesi ile ayırma özelliklerinin geliştiği görülmüştür.

Literatürde bütanolün zenginleştirilmesi için yapılmış çok sayıda çalışma var iken, hidrofilik membranlarla dehidrasyonu için yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Literatürde karşılaştığımız bütanol dehidrasyonu ile ilgili pervaporasyon uygulamaları şöyle özetlenebilir:

Huang ve ark., (2014) izobütanolün pervaporasyon ile dehidrasyonunu zeolit LTA membran kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Ağırlıkça %95 bütanol içeren karışım pervaporasyon prosesi ile ayrıldığında çalışılan tüm sıcaklıklarda ve konsantrasyonlarda 3000 ayırma faktörü elde edilmiştir. Sıcaklığın ve besleme konsantrasyonunun ayırma performansına etkisi incelenmiştir. Operasyon sıcaklığı 40°C'de iken 0.53 kg/m<sup>2</sup>h su akısı elde edilirken, 100 °C'de 4.46 kg/m<sup>2</sup>h su akısı elde edilmiştir. Gua ve ark., (2004) hidrofilik ticari Pervap®2510 membranı kullanarak bütanolün dehidrasyonunu gerçekleştirmiştir. Çalışma boyunca besleme konsantrasyonu ağırlıkça %20'den daha az su içermektedir ve sıcaklığın etkisi 60°C ile 100°C arasında incelenmiştir. Besleme konsantrasyonunun ve sıcaklığının ayırma performansına etkisi incelenmiştir. Ağırlıkça %5 su konsantrasyonu içeren karışım 80°C'de pervaporasyon prosesi ile ayrıldığında 850 g/m<sup>2</sup>h su akısı ve 190 ayırma faktörü elde edilmiştir. Lizon ve ark., (2002) ticari polimerik PERVAP 2202 ve PERVAP 2510; mikrogözenekli silika PERVAP SMS ve Sulzer Chemtech GmbH ve zeolit membranlar NaA tipi ve SMART Chemical Company Ltd. (UK) kullanarak bütanolün dehidrasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 60°C'de %10 su içeren besleme konsantrasyonunda dehidrasyon işlemi gerçekleştirildiğinde mikrogözenekli silika membranlarla 3.5 kg/m<sup>2</sup>h, zeolit membranlarla 1.5 kg/m<sup>2</sup>h ve polimerik membranlarla 0.5 kg/m<sup>2</sup>h akı değerleri elde edilmiştir. Su seçicilik değerlerine bakıldığında ise en yüksek seçicilik değeri zeolit membranlarda 16,000 olarak elde edilmiştir. Polimerik ve silika membranların seçicilik değerleri ise sırasıyla 3615 ve 144 olarak elde edilmiştir. Tsou ve ark., (2015) grafen oksit katkılı poliakrilonitril kompozit membranlar hazırlayarak bütanolün dehidrasyonunda kullanmışlardır. Hazırlanan kompozit membran 30°C proses sıcaklığında kullanıldığında, geçen akımda %99.6 oranında su konsantrasyonu bulunmuştur. Geçiş akısı ise 2.54 kg/m<sup>2</sup>h'dir. 70°C gibi yüksek sıcaklıklara çıkıldığında ise geçen akımda %99.5 oranında su konsantrasyonu, 4.34 kg/m<sup>2</sup>h akı değeri elde edilmiştir. Jalal ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada Hyflon AD/polivinilflorid (PVDF) membran geliştirerek bütanolün dehidrasyonunda kullanmışlardır. Geliştirdikleri membranda 150 kg/m<sup>2</sup>h su akısı %99'dan fazla su seçiciliği elde etmişlerdir. Devi ve ark., (2007) sodyum alginat ve polietilenimin polimerlerini kullanarak blend membranlar hazırlamışlardır. Hazırladıkları bu membranları alkollerin dehidrasyonunda kullanmışlardır. 30°C'de %10 besleme su konsantrasyonunda etanol/su, metanol/su, izopropanol/su ve bütanol/su karışımlarında sırasıyla 0.037, 0.056, 0.086 ve 0.103 kg/m<sup>2</sup>h akı değerleri elde edilirken, aynı koşullar altında seçicilik değerleri ise etanol/su, metanol/su, izopropanol/su ve bütanol/su karışımları için sırasıyla 6065, 1449, 1540 ve 1145 olarak elde edilmiştir. Chen ve ark., (2015) grafen oksit kompozit membranlar hazırlayarak bütanol/su sisteminde ayırma performansını incelemişlerdir. 50°C proses sıcaklığında, kütlece %10 besleme su konsantrasyonunda akı değeri 3.1 kg/m<sup>2</sup>h olarak elde edilirken, ayırma faktörü 230 olarak elde edilmiştir. Xu ve Chung (2017) UiO-66/poliimid karma membranlar hazırlayarak etanolün, izopropanolün ve bütanolün dehidrasyonunda kullanmışlardır. UiO-66 nanoparçacıkları da çalışma sırasında sentezlenerek membrana ilave edilmiştir. En yüksek %30 oranında UiO-66 nanoparçacıkları membrana yüklenebilmiş, fazlasında aglomerasyon olduğu gözlenmiştir. Ağırlıkça %30 UiO-66 yüklü karma membranda seçicilik değeri 14214 iken akı değeri 0.292 mg/m<sup>2</sup>h olarak elde edilmiştir. Yong ve ark., (2017) düşük seçicilik sergileyen PIM membranı poliimit membran ile blend yaparak bütanolün dehidrasyonunda kullanmışlardır. 47.8 g/m<sup>2</sup>h akı 5000 ayırma faktörü değeri elde edilmiştir. Penkova ve ark.,



(2016) fullerenol nanoparçacıklar yüklü PVA membranlar hazırlamışlardır. Elde edilen membranlarla dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiş %20 besleme su konsantrasyonunda 0.5 kg/m<sup>2</sup>h akı değeri ve 7 seçicilik değeri elde edilmiştir. Lin ve ark., (2018) SiO<sub>2</sub> yüklü kitosan karma membranları soljel tekniği ile hazırlayıp, glutaraldehit ile çapraz bağlamışlardır. Ağırlıkça %0.25 SiO<sub>2</sub> yüklü kitosan membranla 736 g/m<sup>2</sup>h akı ve 1498 ayırma faktörü değeri elde edilmiştir.

Bu çalışmada saf sodyum alginat membranlar ve metal organik kafes yapı UiO-66 katkılı karma matris sodyum alginat membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu membranların pervaporasyon prosesi ile bütanol dehidrasyonunda ayırma performansları incelenmiştir. Saf sodyum alginat ile katkılı membranların ayırma performansları karşılaştırılmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Deneysel Metot**

#### **Materyal**

Membran hazırlama malzemeleri sodyum alginat, glutaraldehit ve hidroklorik asit Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Metal organik kafes yapı UiO-66 sentezinde kullanılan zirkonyum klorid ABCR GmbH firmasından, tereftalik asit, asetik asit ve dimetil formamid ise Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Pervaporasyon deneyinde kullanılacak olan n-bütanol ise Merck firmasından satın alınmıştır.

#### **UiO-66 Sentezi**

Belirli oranlarda ZrCl<sub>4</sub>, tereftalik asit ve asetik asit, dimetil formamid (DMF) içerisine ilave edilerek 100°C'de 24 saat karıştırıldı. Elde edilen karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra UiO-66 parçacıkları santrifüj ile ayrıldı ve saflaştırmak için birkaç kez DMF ile yıkanarak kullanıma hazır hale getirildi (Xu ve Chung, 2017).

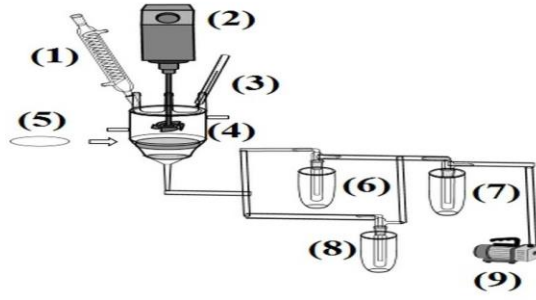
#### **Membran Sentezi**

Ağırlıkça %3 sodyum alginat oda sıcaklığında suda çözülerek polimerik membran çözeltisi hazırlandı. Daha sonra sentezlenen metal organik kafes yapı UiO-66 belirlenen oranlarda membran çözeltisine ilave edilerek homojen bir karışım elde edilince kadar manyetik karıştırıcı da karıştırıldı. Hazırlanan membran cam yüzeye dökülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Hacimce % 75 aseton, % 25 su, % 1 HCl ve % 1 GA içeren çapraz bağlama banyosu hazırlandıktan sonra kuruyan membran bu banyoda 12 saat bekletilmiştir.

#### **Bütanol Dehidrasyonu İçin Pervaporasyon Uygulaması**

Bütanolün dehidrasyonu saf ve metal organik kafes yapı katkılı karma matris sodyum alginat membran ile Şekil 1'de görülen pervaporasyon ünitesinde incelenmiştir.

Ayırma işleminin istenilen operasyon sıcaklığında yürütülebilmesi için membran hücresi ceketli yapılmıştır. Besleme karışımı membran hücresine bir besleme pompası aracılığıyla pompalanmış ve bir mekanik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Hidrofilik özellikteki alginat membran ve karma matris membranlar kullanıldığından ikili karışımdaki bütanol membrandan geçemeyecek ve yoğun sıvıya doğru geri difüze olacak, su da membrandan geçerek ayrılacaktır. Pervaporasyon sırasında membranın bir yanı sıvı fazla temas ederken, diğer yanında vakum bulunur. Su membrandan mükemmelce geçer ve geçen akım tarafında düşük basınçta buharlaşır. Daha sonra buhar olarak elde edilen su, sıvı azot ile yoğunlaştırılıp sıvı fazda elde edilir. Ayırma işlemi farklı sıcaklıklarda, farklı besleme konsantrasyonlarında ve farklı metal organik kafes yapı yükleme oranlarında incelenmiştir. Deney sonunda geçen akımdan alınan numuneler gaz kromatografi cihazında analiz edilerek bileşen konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 1. Pervaporasyon ünitesi (1)geri soğutucu, (2) mekanik karıştırıcı, (3) termokapl, (4) membran hücresi, (5) membran, (6–8) Soğutucu kapanlar, (9) vakum pompası (Unlu ve Hilmioğlu, 2017)

Pervaporasyon işleminin ayırma performansı, akı ve seçicilik ile belirlenmiştir. Seçicilik Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\alpha_{ab} = \frac{C_{a_p} / C_{b_p}}{C_{a_r} / C_{b_r}} \quad (1)$$

$C_{su,geçen}$  ve  $C_{bütanol,geçen}$ , su ve bütanolün geçen akımdaki konsantrasyonları,  $C_{su,besleme}$  ve  $C_{bütanol,besleme}$  ise su ve bütanolün besleme karışımındaki konsantrasyonlarıdır.

Akı ise membran boyunca sıvının birim zamanda, birim alandan geçen akış hızı olarak tanımlanır. Deneysel çalışma sonucu elde edilen akıların hesaplanması Eşitlik 2 kullanılarak yapılmıştır.

$$J = \frac{m}{A.t} \quad (2)$$

kullanılarak yapılmıştır.

Eşitlik 2'deki J; akı ( $kg/m^2.h$ ) m; kapanlarda biriken numune miktarı (kg), A; membran alanı ( $m^2$ ), t; zaman (saat) değeridir.

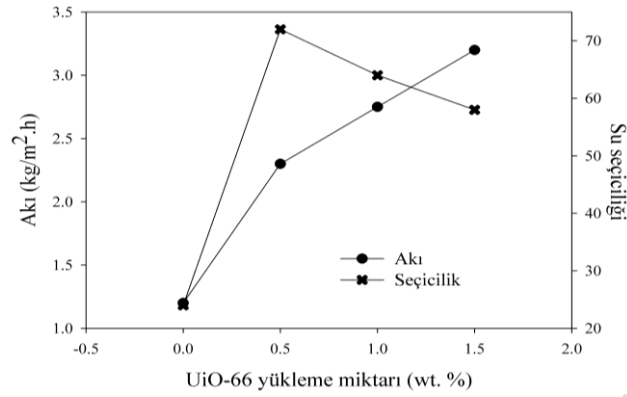
## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Pervaporasyon ile Bütanolün Dehidrasyon Sonuçları

#### UiO-66 Yükleme Oranının Etkisi

Saf sodyum alginat membranının ayırma performansı, UiO-66 miktarının bir fonksiyonu olarak UiO-66 yüklü karma matris sodyum alginat membran ile karşılaştırıldı. Şekil 2'de UiO-66 miktarının akı ve seçicilik üzerindeki etkisi 35°C'de, ağırlıkça %2.5 besleme suyu konsantrasyonunda incelenmiştir.

UiO-66'nın eklenmesi, sodyum alginat membranının hidrofilik özelliklerini geliştirmiştir. UiO-66 yüklü sodyum alginat karma matris membranının yüksek hidrofilik özelliği, bütanol/su karışımının pervaporasyon ile ayrılmasında yüksek seçicilik ve akı değerleriyle sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, yüksek hidrofiliklik, membranda yüksek şişme derecesine neden olmaktadır. Membranın seçicilik değeri UiO-66 miktarı arttıkça azalmıştır. Seçicilik, ağırlıkça %0.5 UiO-66 miktarında maksimum değere ulaşmış ve ardından artan UiO-66 miktarı ile azalmaya başlamıştır. En düşük seçicilik değeri, ağırlıkça %1.5 UiO-66 yüklü membranda 351 olarak elde edildi. Seçiciliğin azalması, membranın hidrofiliklik özelliğinin artmasıyla açıklanabilir. UiO-66'nın hidrofilik doğası nedeniyle, daha fazla su molekülü UiO-66 yüklü sodyum alginat membranı tarafından emilir. Artan su miktarı ile membranın şişme derecesi artar. Böylece daha fazla bütanol molekülü membrandan difüzyon şansı bulur ve suyun seçicilik değeri azalır.

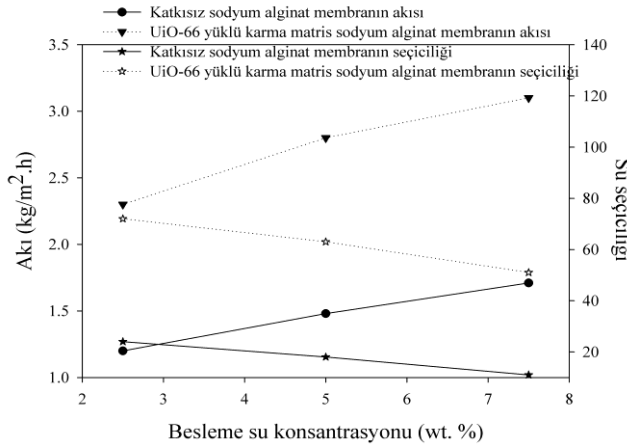


Şekil 2. UiO-66 yüklem miktarının akı ve su seçiciliği üzerine etkisi

UiO-66 yüklem miktarı %0.5'ten %1.5'e arttırıldığında akı değeri 2.30 kg/m<sup>2</sup>h'ten 3.20 kg/m<sup>2</sup>h'e artarken, su seçiciliği 72'den 58'e düşmüştür.

### Besleme Konsantrasyonunun Etkisi

Bütanol dehidrasyonunda besleme konsantrasyonunun ayırma performansına etkisini belirlemek için, besleme su konsantrasyonu ağırlıkça %2.5-7.5 aralığında iken bütanol/su karışımının pervaporasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler 35°C'de ve ağırlıkça %0.5 UiO-66 yüklü sodyum alginat membran ile yürütülmüştür. Farklı konsantrasyonlardaki bütanol/su karışımlarının akı ve seçicilik değerlerine etkisi Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Besleme konsantrasyonunun akı ve su seçiciliği üzerine etkisi

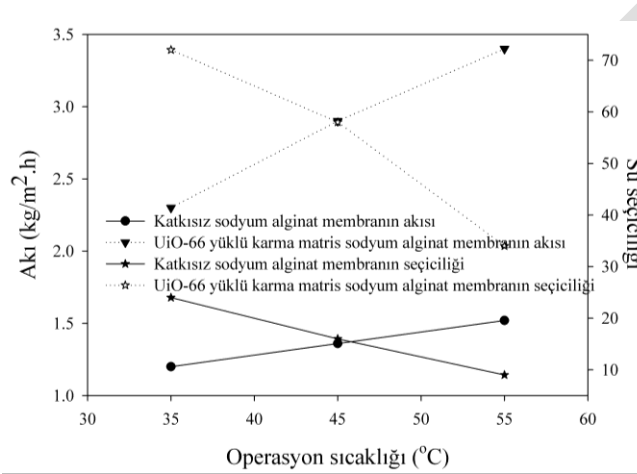
Sodyum alginat membran hidrofilik yapıdadır. Membran yapısındaki -OH grupları ve besleme karışımındaki su molekülleri arasındaki etkileşimden dolayı su akısı beslemedeki su miktarı ile artar. Beslemede artan su konsantrasyonu, membranın daha fazla şişmesi ve polimer zincirlerinin daha esnek olması ile sonuçlanır. Böylece su membrandan kolayca difüze olur. Buna karşılık olarak, polimer zincirleri arasındaki boşlukların artmasından dolayı, şişmiş membran su molekülleri ile birlikte bütanol moleküllerinin difüzyonuna da izin verir. Böylece, sodyum alginat membranın hidrofilik yapısına rağmen bütanol molekülleri membrandan geçer ve su seçiciliği azalır. (Kittur ve ark., 2013).

Çözeltideki su konsantrasyonu arttıkça UiO-66 katkılı membranında Şekil 3'te görüldüğü gibi akı değerlerinin arttığı, seçicilik değerlerinin ise azaldığı görülmüştür. UiO-66'nın hidrofilik doğası yüksek su geçişine neden olmaktadır. Bunun sebebi su molekülleri ile UiO-66 arasında kurulan hidrojen bağlarıdır. Su konsantrasyonu arttıkça karma matris membran şişerek, membrandan difüze olan su miktarının artmasına neden olacaktır. Akı tanımı gereği membran boyunca birim alandan birim zamanda geçen madde miktarı olduğundan su miktarı arttıkça akı değeri de artmaktadır. Ancak membranın şişmesi difüzyon yollarının genişlemesine neden olduğundan su ile birlikte bütanolün de membran boyunca difüze olmasına ve dolayısıyla da seçiciliğin azalmasına neden olmaktadır. Bu yüzden su konsantrasyonu arttıkça seçiciliğin azaldığı görülmüştür (Olukman ve ark., 2015).

Beslemedeki su konsantrasyonu ağırlıkça %2.5 iken, katkısız sodyum alginat membranın su seçiciliği 24 ve akı değeri 1.2 kg/m<sup>2</sup>h'tir. Su konsantrasyonu %7.5'e artırıldığında su seçiciliği 11'e düşerken, toplam akı 1.71 kg/m<sup>2</sup>h'ye artar. UiO-66 katkılı karma matris sodyum alginat membranında beslemedeki su konsantrasyonu ağırlıkça %2.5'ten iken %7.5'e arttıkça, akı değeri 2.3 kg/m<sup>2</sup>h'ten 3.1 kg/m<sup>2</sup>h'e artarken, seçicilik değeri 72'den 51'e düşmüştür.

### Operasyon Sıcaklığının Etkisi

Şekil 4'te 35, 45 ve 55°C'de gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen akı ve su seçiciliği değerleri gösterilmiştir. Besleme su konsantrasyonu ağırlıkça %2.5'tir, sodyum alginat membran ise ağırlıkça % 0.5 UiO-66 yüküdür.



Şekil 4. Operasyon sıcaklığının akı ve su seçiciliği üzerine etkisi

Şekil 4'ten görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça, suyun akısı artarken seçiciliği azalmıştır. Operasyon sıcaklığının artması yüksek doymuş buhar basıncı ile sonuçlanır. Bu durum itici gücün artmasına sebep olur. Böylece itici güç ve besleme karışımındaki seçici bileşen olan suyun difüzyonu artar, dolayısıyla suyun akısı da artış gösterir (Kittur ve ark., 2013; Pulyalina ve ark., 2015). Sıcaklık artışı polimerik membranın yapısını da etkiler. Sıcaklık polimer zincirinin hareketini zenginleştirir. Bu hareket membranda serbest hacim yaratır ve serbest hacim membranın şişmesi ile sonuçlanır (Aliabadi ve ark., 2011). Su şişmiş membrandan kolayca difüze olabilir; fakat membranın şişme derecesinin artması membrandan bütanolün difüzyonuna da izin verir. Çünkü membranın sorpsiyon seçiciliği operasyon sıcaklığı arttıkça artarken, difüzyon seçiciliği operasyon sıcaklığı arttıkça azalmaktadır. Şişme derecesinin artması ile bütanol molekülleri su ile birlikte membranın serbest hacminden geçer. (Pulyalina ve ark., 2015; Xie ve ark., 2011, (Xu ve Wang, 2015). Bu da su seçiciliğini düşürür.

Sıcaklık 35°C'den 55°C'ye arttırıldığında saf membranın akısı 1.2 kg/m<sup>2</sup>h'den 1.52 kg/m<sup>2</sup>h'ye artarken seçiciliği 24'ten 9'a düşmüştür. Karma matris membranın ise 35°C'de akı ve su seçiciliği değeri 2.30 kg/m<sup>2</sup>h ve 72 iken 55°C'de 3.4 kg/m<sup>2</sup>h ve 34'tür.

### SONUÇ

Saf sodyum alginat ve karma matris membran sulu bütanol çözeltisinin pervaporasyon ile dehidrasyonunda kullanılmak için sentezlenmiştir. Membranlar çözeltiden döküm ve solvent buharlaştırma metotları kullanılarak hazırlanmıştır. MOF (UiO-66) yükleme miktarının, besleme konsantrasyonunun ve operasyon sıcaklığının dehidrasyon performansına etkisi incelenmiştir. Yüksek sıcaklık ve yüksek besleme su konsantrasyonu akıyı artırır ve seçiciliği azaltır. UiO-66 yüklü karma matris membran saf sodyum alginat membrana göre oldukça yüksek ayırma performansı göstermiştir. Saf sodyum alginatın en iyi ayırma performansı 35°C operasyon sıcaklığında, 2.5 wt.% besleme su konsantrasyonunda seçicilik değeri 24, akı değeri 1.2 kg/m<sup>2</sup>h olarak elde edilmiştir. UiO-66 yüklü karma matris membranın en iyi ayırma performansı ise 35°C operasyon sıcaklığında, 2.5 wt.% besleme su konsantrasyonunda ve %0.5 wt.% UiO-66 yükleme oranında seçicilik değeri 72, akı değeri 2.3 kg/m<sup>2</sup>h olarak elde edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne tarafından 182N04 proje numarası ile desteklenmiştir. Mali destekleri için teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Aliabadi M, Aroujalian A, Raisi A 2011. Pervaporative removal of acrylonitrile from aqueous streams through polydimethylsiloxane membrane. *Water Science & Technology*, 63: 2820–2827.
- Baker RW 2000. Membrane separation. In: Wilson ID, Adlard ED, Cooke M, Poole CF (eds), *Encyclopedia of Separation Science*. Germany: Academic Press, pp. 205-209.
- Basile A, Figoli A, Khayet M 2015. *Pervaporation, Vapour Permeation and Membrane Distillation: Principles and Applications*. UK: Woodhead Publishing.
- Cai D, Zhang T, Zheng J, Chang Z, Wang Z, Qin PY 2013. Biobutanol from sweet sorghum bagasse hydrolysate by a hybrid pervaporation process. *Bioresource Technology*, 145: 97–102.
- Chen X, Liu G, Zhang H, Fan Y 2015. Fabrication of graphene oxide composite membranes and their application for pervaporation dehydration of butanol. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23:1102–1109.
- Devi DA, Smitha B, Sridhar S, Jawalkar SS, Aminabhavi TM 2007. Novel sodium alginate/polyethyleneimine polyion complex membranes for pervaporation dehydration at the azeotropic composition of various alcohols. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82:993–1003.
- Drioli E, Giorno L 2010. *Comprehensive Membrane Science and Engineering Volume 1 Basic Aspects Of Membrane Science And Engineering*, United Kingdom: Elsevier.
- Gugliuzza A, Basile A 2014. *Membranes for Clean and Renewable Power Applications*, UK: Woodhead Publishing.
- Guo WF, Chung TS, Matsuura T 2004. Pervaporation study on the dehydration of aqueous butanol solutions: a comparison of flux vs. permeance, separation factor vs. selectivity. *Journal of Membrane Science*, 245:199–210.
- Hua D, Ong YK, Wang Y, Yang T, Chung TS 2014. ZIF-90/P84 mixed matrix membranes for pervaporation dehydration of isopropanol. *Journal of Membrane Science*, 453:155–167.
- Huang B, Liu Q, Caro J, Huang A 2014. Iso-butanol dehydration by pervaporation using zeolite LTA membranes prepared on 3-aminopropyltriethoxysilane-modified alumina tubes. *Journal of Membrane Science*, 455:200–206.
- Jalal TA, Bettahalli NMS, Le NL, Nunes SP 2015. Hydrophobic Hyflon AD/Poly(vinylidene fluoride) Membranes for Butanol Dehydration via Pervaporation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54:11180–11187.
- Jee KY, Kim N, Lee YT 2016. The effect of metal complex on pervaporation performance of composite membrane for separation of n-butanol/water mixture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 44, 155–163.
- Kittur AA, Jeevankumar BK, Kariduraganavar MY, College SDM 2013. Pervaporation separation of water-dioxane mixtures poly (vinyl alcohol)-silicone based hybrid membranes, *International Journal of Current Engineering and Technology*, 1:148–156.
- Lin YF, Wu CY, Liu TY, Lin KYA, Tung KL, Chung TW 2018. Synthesis of mesoporous SiO<sub>2</sub> xerogel/chitosan mixed-matrix membranes for butanol dehydration. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 57:297–303.
- Liu S, Liu G, Zhao X, Jin W 2013. Hydrophobic-ZIF-71 filled PEBA mixed matrix membranes for recovery of biobutanol via pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 446:181–188.
- Lizon TG, Edwards E, Lobiund G, Santos LF 2002. Dehydration of water/t-butanol mixtures by pervaporation: comparative study of commercially available polymeric, microporous silica and zeolite membranes. *Journal of Membrane Science*, 197:309–319.
- Olukman M, Oya S 2015. Synthesis of magnetite in poly (vinyl alcohol) matrix and its use in separation of acetone/water mixtures via pervaporation, vapor permeation with and without temperature difference methods. *Vacuum*, 120:107-115.
- Penkova AV, Acquah SFA, Dmitrenko ME, Sokolova MP, Mikhailova ME, Polyakov ES, Ermakov SE, Markelov DA, Roizard D 2016. Improvement of pervaporation PVA membranes by the controlled incorporation of fullerene nanoparticles. *Materials and Design*, 96: 416–423.

- Pulyalina AY, Polotskaya GA, Veremeychik KY, Goikhman MY, Podeshvo IV, Toikka AM 2015. Ethanol purification from methanol via pervaporation using polybenzoxazinoneimide membrane. *Fuel Processing Technology*, 139: 178–185.
- Rdzanek P, Marszałek J, Kamiński W 2018. Biobutanol concentration by pervaporation using supported ionic liquid membranes. *Separation and Purification Technology*, 196:124-131.
- Tsou CH, An QF, Lo SC, Guzman MD, Hung WS, Hu CC, Lee KR, Lai JY 2015. Effect of microstructure of graphene oxide fabricated through different self-assembly techniques on 1-butanol dehydration. *Journal of Membrane Science*, 477: 93–100.
- Unlu D, Ilgen O, Hilmioglu ND 2017. Reactive separation system for 15 effective upgrade of levulinic acid into ethyl levulinate, *Chemical Engineering Research and Design*, 118:248–258.
- Xu YM, Chung TS 2017. High-performance UiO-66/polyimide mixed matrix membranes for ethanol, isopropanol and n-butanol dehydration via pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 531:16–26.
- Xu S, Wang Y 2015. Novel thermally cross-linked polyimide membranes for ethanol dehydration via pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 2015, 496: 142–155.
- Yong WF, Salehian P, Zhang L, Chung TS 2017. Effects of hydrolyzed PIM-1 in polyimide-based membranes on C2–C4 alcohols dehydration via pervaporation. *Journal of Membrane Science*, 523:430–438.

## Batı karadeniz bölgesinde yetiştirilen fındıkların yağ asitleri kompozisyonunun araştırılması

Fikret Tüfekci<sup>1\*</sup>, Şükrü Karataş<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fındık Araştırma Enstitüsü, Gıda Teknolojisi Bölümü, Giresun, Türkiye

<sup>2</sup>Istanbul Aydın Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:fkrttufekci@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada Batı Karadeniz Bölgesinde ticari olarak üretimi yapılan Türk yuvarlak fındıklarının (*Corylus avellana L.*) yağ asitleri kompozisyonu araştırıldı. Araştırma için 2015 yılında 15, 2016 yılında 12 olmak üzere toplam 27 adet numune örnekleme metoduyla toplandı, analizler gaz kromatografisi kullanılarak (GC) gerçekleştirildi ve istatistiksel hesaplamalar paket program (SPSS) kullanılarak yapıldı. Fındık yağının baskın yağ asidinin oleik asit (C18:1, % 82,9) olduğu tespit edildi. Oleik asidi miktar açısından sırasıyla; linoleik asit (C18:2, %8,4), palmitik asit (C16:0, %5,4) ve stearik asit (C18:0, %2,4) takip etmektedir. Fındık yağının majör yağ asidi grubu olan tekli doymamış yağ asitleri toplamının (MUFA) 2015 yılında %83.5, 2016 yılında ise %83.1 olduğu ve aradaki farkın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı tespit edildi. Bulgulara göre Batı Karadeniz Bölgesinde fındık meyvesinin yağ asitlerinden sadece palmitoleik asit ve stearik asitin hasat sezonu farklılığından önemli düzeyde etkilendiği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Fındık (*Corylus avellana L.*), Batı Karadeniz Bölgesi, Yağ asitleri kompozisyonu, İstatistiksel analiz, Palmitoleik asit, Stearik asit.

### Investigating the fatty acid composition of hazelnuts produced in western black sea region

#### Abstract

This study was conducted to find out whether the fatty acid composition of the round type hazelnuts commercially produced in Western Black Sea Region (*Corylus avellana L.*). A total of 27 samples were collected including 15 in 2015 and 12 in 2016. The fatty acid composition was analyzed using gas chromatography (GC) and for statistical analyses, SPSS was used. Oleic acid (C18:1, 82.9%) was found to be the predominant fatty acid in hazelnut oil, which was followed by linoleic acid (C18:2, 8.4%), palmitic acid (C16:0, 5.4%) and stearic acid (C18:0, 2.4%) respectively. The monounsaturated fatty acids (MUFA) content were detected 83.5% in 2015, 83.1% in 2016 and there were no significance between these values. According to the findings, it was determined that only the palmitoleic acid and stearic acid from the fatty acids of the hazelnut fruits were significantly affected from the harvest season in the Western Black Sea Region.

**Keywords:** Hazelnut (*Corylus avellana L.*), Western Black Sea, Fatty acid composition, Statistical analysis, Palmitoleic acid, Stearic acid.

#### 1. GİRİŞ

Fındık, *Fagales* takımı, *Betulacea* familyası, *Coryloidea* alt familyasının *Corylus* cinsi içerisinde yer alan, çok yıllık bir meyvedir (Balık, 2018). Türkiye, 2017 yılı verilerine göre 675.000 ton üretim miktarı ve yaklaşık % 68' lik pazar payı ile Dünya'nın en büyük fındık üreticisidir ve Türkiye'yi sırasıyla İtalya (% 13), Azerbaycan (% 4,3) ve ABD (% 2,9) takip etmektedir (FAOSTAT, 2019). Türkiye'de Karadeniz Bölgesinin hemen hemen tamamında, Marmara Bölgesinin bir kısmında (Sakarya ve Kocaeli) yabani formu ile birlikte 18 farklı fındık çeşidinin tarımı yapılmaktadır (Köksal ve ark., 2006).

Fındığın temel bileşeni yağdır (%50-73) ve bu yağ doymamış yağ asitleri (oleik ve linoleik asit vb.) bakımından oldukça zengindir (Köksal ve ark., 2006). Tekli doymamış yağ asitleri bakımından zengin diyetlerle beslenmenin yüksek yoğunluklu kolesterol (HDL) miktarını artırırken düşük yoğunluklu kolesterol miktarını (LDL) azalttığı ve bu sayede kolesterol kaynaklı kalp hastalıklarından korunma sağladığı (Oliveira ve ark., 2008), oleik asidin insülin direncini artırdığı ve anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Orsavova ve ark., 2015). Fındık, içerdiği yüksek orandaki yağın yanında sahip olduğu enerji (646 kcal), protein (% 14), E vitamini (35 IU) ve fito-sterol değerleri bakımından da önemli ve değerli bir besin kaynağıdır (Parcerisa ve ark., 1998).

Türkiye’ de yasal olarak fındık tarımına izin verilen şehir sayısı 16’ dır ve Sakarya, Kocaeli (Karadeniz’ e kıyısı olması nedeniyle), Bolu, Bartın, Düzce ve Zonguldak Batı Karadeniz Bölgesi içinde değerlendirilmektedir. Türkiye’ nin toplam dikili fındık alanlarının yaklaşık % 26’ sına sahip olan bölge, üretimin ise 2017 yılı verilerine göre % 31’ lik kısmını oluşturmaktadır (ZMO, 2019).

Literatürde Batı Karadeniz Bölgesi fındıklarına ait yağ asitleri kompozisyon değerlerini inceleyen bir çalışma yer almamakta, mevcut araştırmaların ise çeşit farklılıklarına odaklandığı ve örneklerin Fındık Araştırma Enstitüsü’ nün Giresun’ da bulunan bahçelerinden temin edildiği görülmektedir. Bu çalışma; Batı Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen fındıkların yağ asitleri kompozisyon dağılımlarını belirlemek, hasat sezonunun etkisini ölçmek ve başka bölgelerde yetiştirilen fındıklarla farklılık içerip içermediğini incelemek amacıyla yapılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Numune

Fındık örnekleri, 2015 ve 2016 hasat sezonlarında, Eylül ayı içerisinde rastgele seçilen yerel fındık tüccarlarının ambarlarından, Batı Karadeniz’ deki toplam üretimin yaklaşık % 98’ ini temsil eden Zonguldak, Düzce ve Sakarya şehirlerinden temin edildi ve örnek sayıları ile ilgili detaylı bilgilere Tablo 1.’ de yer verildi.

**Tablo 1.** Örneklerin Coğrafi Dağılımları

Batı Karadeniz Bölgesi	Örnek sayısı	
	2015	2016
Zonguldak	4	3
Düzce	3	3
Sakarya	8	6
Toplam	15	12

### 2.2. Yağ ekstraksiyonu ve örnek hazırlama

Öğütülmüş ve homojenize edilmiş 5 gram fındık örneği 50 ml’ lik deney tüpüne tartıldı, üzerine 20 ml analitik saflıkta n-Heptan ilave edilip 10 dakika boyunca vortekste karıştırıldıktan sonra 5000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5804 R, Germany). Santrifüj işleminden sonra üst fazdan 10 ml çekilerek başka bir deney tüpüne alınan yağ-solvent karışımının üzerine 0,7 ml 2M metanollü potasyum hidroksit (KOH) ilave edilerek ikinci kez vorteks-santrifüj işlemleri uygulandı. Elde edilen çözeltinin üst fazından 1’ er ml çekilerek viallendi ve cihazın otomatik örnekleyicisine yerleştirildi.

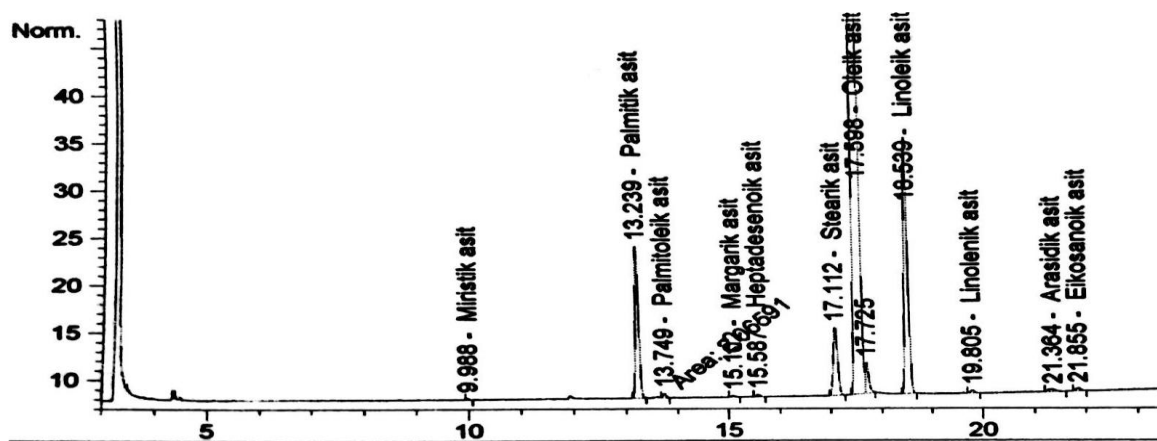
### 2.3. Gaz Kromatografisi

Analizler Agilent 6890 N model gaz kromatografisi (GC) sisteminde, alev iyonizasyonlu detektör (FID) ve JB Scientific marka DB-23 (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kolon kullanılarak yapıldı (ISO 12966-2, 2011). Inlet sıcaklığı 250 ° C , dedektör sıcaklığı 260 ° C olarak ve taşıyıcı gazın (azot) akış hızı ise 1.4 ml/dk., enjeksiyon hacmi 0.2 µL split oranı ise 1:40 olarak ayarlandı.

Kolon çalışma sıcaklığı dört aşamalı olarak programlandı: Kolon 130 ° C’ de 1 dakika tutulduktan sonra 6.5 ° C / dk.’lık artışlar ile 170 ° C’ ye çıkıldı. Daha sonra 2.75 ° C / dk. artış hızı ile 215 ° C’ ye ulaşıldı ve bu sıcaklıkta 15 dakika tutuldu. Son olarak 15 ° C /dk. artış hızı ve 10 dakikalık tutunma zamanı ile 230 ° C’ de analiz bitirildi.

Referans standart karışımları ile (Supelco F.A.M.E. 37 Mix, lot: LC-07964) yağ asitlerinin alıkonma zamanları tespit edildi ve kalibrasyon tablosuna yazıldı. Analizler 2 tekrarlı olarak yapıldı ve her bir yağ asidinin yüzdesi, ilgili pik alanının yağ asitlerinin toplam pik alanına oranından hesaplandı. Tipik bir fındık yağı örneğinin yağ asidi metil esterlerinin kromatogram görüntüsü Şekil 1.’ de yer almaktadır.





Şekil 1. Fındık meyvesinin yağ asidi metil esterlerinin kromatogram görüntüsü

#### 2.4. İstatiksel hesaplamalar

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS paket programı kullanılarak (SPSS ver. 17.0, 2008; International Business Machines Corp. New Orchard Road, Armonk, New York) % 95 güven aralığında ( $p < 0.05$ ) yapıldı.

### 3. SONUÇLAR

Fındık yağının baskın yağ asidi oleik asittir ve Batı Karadeniz Bölgesinde Türk yuvarlak fındıkları için 2015 ve 2016 hasat sezonlarının ortalaması olarak %82.1 ile %84.0 aralığında değişmektedir. Oleik asiti sırasıyla linoleik asit (%7.6-10.0), palmitik asit (%5.3-5.7) ve stearik asit (%2.3-2.7) takip etmektedir (Tablo 2). Miristik, margarik ve heptadekanoik asit bütün örneklerde iz miktarda da olsa bulunmakla birlikte makalede bu değerlere yer verilmemiştir. Zonguldak şehrine ait fındık örneklerinin bütün değerleri Düzce ve Sakarya şehirlerine ait fındık örneklerinden yüksek çıkarken; bunlardan palmitik asit (%5.7), stearik asit (%2.7), oleik asit (%84.0), linoleik asit (%10.0), araşidik asit (%0.13), eikosenoik asit (%0.18), toplam SFA (%8.5), toplam MUFA (%84.3) ve toplam PUFA (%10.1) ile aralarında anlamlı farklılıklar bulundu.

Tablo 2. Batı Karadeniz Bölgesi Fındıklarının Yağ Asitleri Kompozisyonu

Yağ asidi %	Zonguldak		Düzce		Sakarya	
	Ortalama	SH ±	Ortalama	SH ±	Ortalama	SH ±
Palmitik asit (C16:0)	5.7 <sup>a</sup>	0.07	5.3 <sup>b</sup>	0.06	5.3 <sup>b</sup>	0.07
Palmitoleik asit (C16:1)	0.20 <sup>a</sup>	0.007	0.18 <sup>a</sup>	0.005	0.18 <sup>a</sup>	0.01
Stearik asit (C18:0)	2.7 <sup>a</sup>	0.1	2.5 <sup>ab</sup>	0.1	2.3 <sup>b</sup>	0.04
Oleik asit (C18:1)	84.0 <sup>a</sup>	0.7	83.6 <sup>ab</sup>	0.3	82.1 <sup>b</sup>	0.4
Linoleik asit (C18:2)	10.0 <sup>a</sup>	0.3	8.5 <sup>b</sup>	0.4	7.6 <sup>b</sup>	0.5
Linolenik asit (C18:3)	0.08 <sup>a</sup>	0.004	0.07 <sup>a</sup>	0.002	0.07 <sup>a</sup>	0.003
Araşidik asit (C20:0)	0.13 <sup>a</sup>	0.004	0.12 <sup>ab</sup>	0.003	0.11 <sup>b</sup>	0.002
Eikosenoik asit (C20:1)	0.18 <sup>a</sup>	0.01	0.16 <sup>ab</sup>	0.002	0.15 <sup>b</sup>	0.003
Toplam SFA	8.5 <sup>a</sup>	0.01	8.0 <sup>b</sup>	0.16	7.8 <sup>b</sup>	0.07
Toplam MUFA	84.3 <sup>a</sup>	0.7	83.9 <sup>ab</sup>	0.3	82.5 <sup>b</sup>	0.4
Toplam PUFA	10.1 <sup>a</sup>	0.3	8.6 <sup>ab</sup>	0.3	7.7 <sup>b</sup>	0.4

\*SFA: Saturated fatty acids (doymuş yağ asitleri), MUFA: Monounsaturated fatty acids (Tekli doymamış yağ asitleri) ve PUFA: Polyunsaturated fatty acids (çoklu doymamış yağ asitleri). \*Her değer 2 yılın ortalamasıdır ve standart hataları (SH) ile birlikte verilmiştir. Aynı satırda farklı harflerle (a-b) gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

Tüfekçi ve Karataş (2018) Giresun ve Trabzon’ dan temin ettikleri fındıklar üzerinde yaptıkları bir çalışmada oleik asiti %82.4, linoleik asiti %9.1, palmitik asiti %5.2 ve stearik asiti %2.6 olarak bildirmektedir. Bacchetta ve arkadaşlarının (2013) Avrupa fındıkları üzerinde yaptıkları bir çalışmada oleik asiti %80.6, linoleik asiti %10.6, palmitik asiti %7.8 ve stearik asiti % 2.5 olarak buldukları görülmektedir. Bu değerler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle genel olarak uyumludur ancak bire bir aynı değildir ve bu farklılıkların hasat sezonu, ekoloji ve lokasyon gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer yandan Rezai ve arkadaşlarının (2014) İran fındıkları üzerinde yaptıkları bir çalışmada oleik asit % 71.0, linoleik asit %14.5,

palmitik asit %3.7 ve stearik asit %4.0 olarak bildirilmektedir. Derewiaka ve arkadaşlarının (2014) Gürcistan fındıkları üzerinde yaptıkları başka bir araştırmada ise oleik asit %77.4, linoleik asit %8.4, palmitik asit %10.1 ve stearik asit %3.7 olarak bildirilmektedir. Bu veriler ile Türk yuvarlak fındıklarına ait değerler uyum içerisinde değildir. İran fındıklarının düşük oleik asit, yüksek linoleik asit içeriğine sahip olduğu; Gürcistan fındıklarının ise palmitik asit değerlerinin bariz şekilde farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılıklara coğrafi orijin, iklim, hasat sezonu ve varyete gibi faktörlerin neden olduğu değerlendirilmektedir. Alaşalvar ve arkadaşları (2003) coğrafi orijin, lokasyon, tür, iklim, kültürel uygulamalar, gübreleme ve hasat sezonu gibi etkenlerin fındığın yağ asitleri kompozisyonu üzerine önemli derecede etki ettiğini belirtmektedirler. Fındık yağının baskın yağ asidi sınıfı tekli doymamış yağ asitleridir (MUFA) ve Batı Karadeniz Bölgesi fındıklarında %82.5-%84.3 aralığındadır ve MUFA' yı sırasıyla; PUFA (%7.7-10.1) ve SFA (%7.8-8.5) takip etmektedir. Hasat sezonunun sadece palmitoleik ve stearik asit üzerine etkisi önemli bulundu (Tablo 3). Zytkeiwicz ve arkadaşlarının (2015) Polonya' da yetiştirilen fındıklar üzerinde yaptıkları bir araştırmada MUFA %81.2, PUFA %12.3 ve SFA %6.5 olarak bildirilmektedir. Amerikan fındıkları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise MUFA %79.3, PUFA %12.3 ve SFA %7.8 olarak bildirilmektedir (Parcerisa ve ark., 1998). Polonya ve Amerika fındıklarının daha yüksek PUFA ve SFA değerlerine sahip oldukları görülmektedir ve bu duruma coğrafi orijin, ekoloji, gübreleme, varyete ve iklim gibi faktörlerin neden olabileceği düşünülmektedir. Turan (2018) yaptığı çalışmada fındık meyvesinin yağ asitleri kompozisyonuna ve dolayısıyla MUFA, PUFA ve SFA miktarlarına kurutma yönteminin de etki ettiğini bildirmektedir. Cristofori ve arkadaşları (2008) ise soğuk bölgelerde yetişen meyve yağlarının sıcak ve kuru bölgelerde yetişenlere oranla daha fazla doymamış yağ asidi içerdiğini belirtmektedirler.

**Tablo 3.** Hasat Sezonunun Yağ Asitleri Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Yağ asidi %	2015 N=15		2016 N=12	
	Ortalama	SH ±	Ortalama	SH ±
Palmitik asit	5.4 <sup>a</sup>	0.07	5.4 <sup>a</sup>	0.08
Palmitoleik asit	<b>0.17<sup>b</sup></b>	0.005	<b>0.21<sup>a</sup></b>	0.005
Stearik asit	<b>2.5<sup>a</sup></b>	0.07	<b>2.3<sup>b</sup></b>	0.07
Oleik asit	83.1 <sup>a</sup>	0.5	82.7 <sup>a</sup>	0.3
Linoleik asit	8.0 <sup>a</sup>	0.4	8.9 <sup>a</sup>	0.3
Linolenik asit	0.08 <sup>a</sup>	0.002	0.07 <sup>a</sup>	0.003
Araşidik asit	0.12 <sup>a</sup>	0.003	0.12 <sup>a</sup>	0.003
Eikosenoik asit	0.16 <sup>a</sup>	0.005	0.16 <sup>a</sup>	0.003
Toplam SFA	8.1 <sup>a</sup>	0.1	7.9 <sup>a</sup>	0.1
Toplam MUFA	83.5 <sup>a</sup>	0.5	83.1 <sup>a</sup>	0.3
Toplam PUFA	8.1 <sup>a</sup>	0.4	8.9 <sup>a</sup>	0.4

\*Her değer 2 yılın ortalamasıdır ve standart hataları (SH) ile birlikte verilmiştir. Aynı satırda farklı harflerle (a-b) gösterilen değerler istatistiksel olarak anlamlıdır (p <0.05).

Diskriminant analizi; Batı Karadeniz Bölgesinde üretilen fındıkların coğrafi orijinin istatistik yardımıyla tespitinin mümkün olup olmadığını test etmek amacıyla yapıldı. Sonuçlara göre birinci diskriminant fonksiyonu varyansın %99.7' sini tek başına açıklarken, ikinci fonksiyon ancak % 0.3' ünü açıklayabilmektedir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Diskriminant Analizinin Temel Tanımlayıcı Değerleri

Fonksiyon	Öz değer	% Varyans	Kümülatif%	Kanonik korelasyon değeri
1	1.557	99.7	0.78	0.78
2	0.05	0.3	0.074	0.074

Diskriminant analizinin şehirleri ayırt etme yüzdeleri Tablo 5' te verildi. Zonguldak, Düzce ve Sakarya şehirlerine ait fındıklar için doğru tahmin oranları sırasıyla %66.7, %62.5 ve %76.9 olarak bulundu ve testin genel başarı oranı %70.4 oldu. Benzer çalışmalar incelendiğinde bu oranın düşük bir oran olduğu anlaşılmaktadır ve bu duruma neden olan en önemli faktörün örnek sayısının azlığının yol açtığı düşünülmektedir. Birçok araştırmacı yağlı meyvelerin yağ asitleri kompozisyon değerlerinden faydalanarak yöre tayini yapmaya çalışmıştır (Amorello ve ark., 2015; Cortes ve ark., 2013; Esteki ve ark., 2017). Diriman, Saygi ve Hisil (2010) beş farklı bölgeden topladıkları zeytinyağı örneklerinin yağ asitleri kompozisyon

değerleri ile kurdukları istatistiksel modelin ayırma gücünün %84.6 olduğunu bildirmektedir. D'Archivo ve arkadaşları (2014) İtalyan' dan topladıkları safran örneklerinde mineral kompozisyonu değerlerini kullanarak yaptıkları istatistiksel modelin başarı oranını % 80 olarak bildirmektedir.

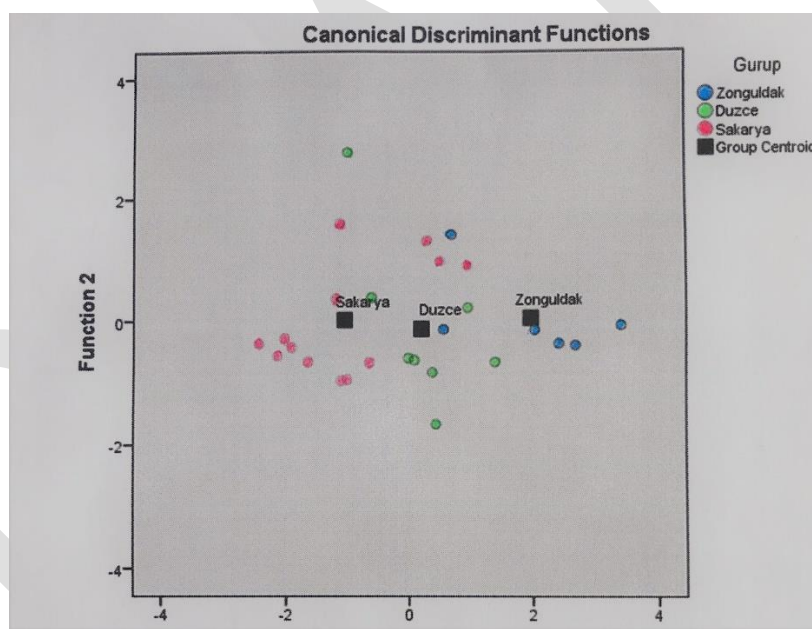
**Tablo 5.** Diskriminant analizine göre sınıflandırma sonuçları ve başarı yüzdesi

Sınıf	Zonguldak	Tahmin Edilen Sınıf			%Toplam
		Düzce	Sakarya		
Orijin	Sayı	4	2	0	
		1	5	2	
		0	3	10	
	%	66.7	33.3	0.0	100
		12.5	62.5	25.0	100
	0.0	23.1	76.9	100	

Sakarya ve Zonguldak fındıkları arasında yanlış sınıflandırma olmazken (Şekil 2), Düzce en fazla yanlış sınıflandırmaya sebep olan şehir olmuştur. Düzce şehrinin lokasyon olarak diğer iki şehrin tam ortasında yer alması coğrafi yakınlığın testin ayırma gücüne etki ettiğini göstermektedir ve beklenen bir durumdur.

## TARTIŞMA

Bildiğimiz kadarıyla Sakarya, Düzce ve Zonguldak şehirlerinin fındık örneklerinin yağ asitleri kompozisyon analizleri ilk kez yapılmıştır. Araştırmada coğrafi orijinin ve hasat sezonunun yağ asitlerinin dağılımına etki ettiği, Batı Karadeniz Bölgesi fındıkları ile Doğu Karadeniz fındıklarının yağ asitleri kompozisyon değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu tespit edildi. Diskriminant analizinde başarı yüzdesini artırmak için daha fazla örneğe ihtiyaç duyulduğu anlaşıldı.



**Şekil 2.** Diskriminant analizine göre şehir örneklerinin dağılımlarının grafiksel gösterimi

## KAYNAKLAR

- Alasalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttas, H. C., Liyanapathirana, C. M., & Rodrigues, F. B. (2003). Turkish Tömbül hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 3797–3805.
- Amorello, D., Orecchio, S., Pace, A., & Barreca, S. (2015). Discrimination of almonds (*Prunus dulcis*) geographical origin by minerals and fatty acids profiling. *Natural Product Research*, 30(18), 2107–2110.
- Bacchetta, L., Aramini, M., Zini, A., Di Giammatteo, V., Spera, D., Drogoudi, P., Botta, R. (2013). Fatty acids and alpha-tocopherol composition in hazelnut (*Corylus avellana* L.): A chemometric approach to emphasize the quality of European germplasm. *Euphytica*, 191(1), 57–73.

- Balık, İ. (2018). Fındıkta kseni ve metakseni üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Türkiye.
- Cortes, I.L., Garcia, D.C.S., Malheiro, R., Guardiola, V., Pereira, J.S. (2013). Chemometrics as a tool to discriminate geographical origin of *Cyperus esculentus* L. based on chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 51,19-25, <http://dx.doi.org/10.106/j.indcrop.2013.08.061>
- Cristofori, V., Ferramondo, S., Bertazza, G., & Bignami, C. (2008). Nut and kernel traits and chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1091–1098.
- D'Archivio, A. A., Giannitto, A., Incani, A., & Nisi, S. (2014). Analysis of the mineral composition of Italian saffron by ICP-MS and classification of geographical origin. *Food Chemistry*, 157, 485-489.
- Derewiaka, D., Szwed, E., & Wolosiak, R. (2014). Physicochemical properties and composition of lipid fraction of selected edible nuts. *Pakistan Journal of Botany*, 46(1), 337-343.
- Diraman, H., Saygi, H., & Hisil, Y. (2010). Relationship between geographical origin and fatty acid composition of Turkish virgin olive oils for two harvest years. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 781-789.
- Esteki, M., Farajmand, B., Kolahderazi, Y., & Gandara, J. S. (2017). Chromatographic fingerprinting with multivariate data analysis for detection and quantification of apricot kernel in almond powder. *Food Analytical Methods*, 10, 3312–3320. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0903-5>.
- FAOSTAT (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Erişim tarihi: 01.03.2019, adres: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/hazelnut>.
- ISO 12966–1. (2011). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters - Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO 12966–2. (2011). Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Köksal, A. İ., Artik, N., Şimşek, A., & Güneş, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chemistry*, 99(3), 509-515.
- Oliveira, I., Sousa, A., Morais, J. S., Ferreira, I. C., Bento, A., Estevinho, L., & Pereira, J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1801–1807.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 12871–12890.
- Parcerisa, J., Richardson, D. G., Rafecas, M., Codony, R., & Boatella, J. (1998). Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *Journal of Chromatography A*, 805(1), 259–268.
- Rezaei, F., Bakhshi, D., Ghazvini, R. F., Majd, D. J., & Pourghayoumi, M. (2014). Evaluation of fatty acid content and nutritional properties of selected native and imported hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties grown in Iran. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 104–107.
- SPSS (2018). Base 22.0 Applications Guide. SPSS Inc., Chicago.
- Tufekci, F., Karatas, Ş. (2018). Determination of geographical origin Turkish hazelnuts according to fatty acid composition. *Food Sci Nutr*. 2018;6:557-562. <https://doi.org/10.1002/fsn3.595>
- Turan, A. *Eur Food Res Technol* (2018) 244: 2181. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3128-y>
- ZMO (2019). Ziraat Mühendisleri Odası erişim tarihi: 21.03.2019 [http://www.zmo.org.tr/genel/bizden\\_detay.php?kod=30070&tipi=17&sube=0](http://www.zmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=30070&tipi=17&sube=0)
- Zytkiewicz, H. C., Verardo, V., Pasini, F., Brys, J., Koczoń, P., & Caboni, M. F. (2015). Determination of lipid and phenolic fraction in two hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars grown in Poland. *Food Chemistry*, 168, 615-622.

## Ozonlama ile endüstriyel atık sulardaki koku bileşiklerinin giderimi: Spekülatif reaksiyon mekanizması ve muhtemel ara yolları

Musa Büyükada

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,  
14030, Bolu, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: musabuyukada@ibu.edu.tr

### Özet

Hava kalitesi ve kirliliği anlamında koku kirliliğinin ilgili literatürde sıklıkla ele alınmasına rağmen, endüstriyel atık sulardaki koku kirliliğinin ilgili literatürde büyük bir boşluk olarak durması mevcut çalışmanın ana motivasyonunu teşkil etmiştir. Bu bağlamda yerel bir kanatlı kesimhanesi tesisine ait atık su arıtma ünitesinden alınan atık sulardaki koku bileşiklerinin hem kuantifikasyonu hem de ozonlama ile giderimi çalışmanın temel hedefleridir. Mevcut çalışmada atık su örneklerindeki koku bileşiklerinin %65'inin alkol- ve asit-bazlı olduğu tespit edilmiştir. Farklı işletme şartlarında, bu bileşiklerin %58 ile %63 aralığında giderimi ozonlamanın etkinliğini ortaya koyarken oluşan ürünler üzerinden de yüzeysel ve spekülatif reaksiyon mekanizmaları önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Endüstriyel atık su, Ozonlama, Ampirik modelleme, Regresyon

### 1. GİRİŞ

Küresel dünya temelli çoğalan insan popülasyonu, başta gıda alanı olmak üzere endüstrinin hemen her alanını gelişen teknolojiyi yakalama ve serbest piyasada ki yerini koruma noktasında sürekli olarak tetikleemektedir (Khetan and Collins, 2007; Buyukada ve Evrendilek, 2017). Gıda sektörünün en önemli kollarından birisi olan kanatlı eti, BESD-BİR (2014) çalıştayında rapor edildiği üzere dünya genelindeki yıllık 91 milyon ton kanatlı eti üretiminin 1.8 milyon tonu Türkiye tarafından karşılanmaktadır. Bu durum ülkemizin kanatlı eti üretiminde dünya 8.si olması sağlamla birlikte aynı zamanda sektörün önemini ve büyüklüğünü açıkça ortaya koymaktadır (BESD-BİR, 2014). Ayrıca ülkemizin kanatlı eti üretiminde kısa vade hedefleri arasında 3.35 milyon ton üretimi temelli dünya üçüncülüğü ve buna bağlı 2.6 milyar \$ ihracat beklentisi olması sektörün büyüklüğünü, önemini ve ne denli hızlı geliştiğini net bir şekilde göstermektedir (BESD-BİR, 2014).

Kesim, yıkama/arıtma, (kaba-)parçalama, sterilizasyon ve paketleme gibi ana işlemlerden sonra müşterilerin beğenisine sunulan kanatlı, üretim büyüklüğüne bağlı olarak büyük miktarlarda atık su oluşumunu tetikleemektedir. Oluşan bu atık su içerdiği kan, deri parçaları, koku ve sterilizasyonda kullanılan kimyasallar vb. kirleticilerden dolayı deşarj edileceği alıcı ortam için büyük bir tehdit teşkil etmektedir. Bu atık suların doğrudan alıcı ortama deşarjı sadece insan temelli değil, aynı zamanda ekosistem açısından da oldukça ciddi sağlık problemlerini de beraberinde getirecektir. Ancak burada açıkça belirtilmesi gereken bir husus, bu atık suların getirdiği sağlık ve çevre kirliliğinin sadece içerdiği yüksek KOİ vb. parametrelerden değil, aynı zamanda beraberinde getirdiği koku kirliliği ile olduğudur. Bu durum, yani koku kirliliği, kanatlı et kesimhanesi atık suların arıtılmasının önemini ve mevcut konunun hassasiyetini açık bir biçimde göstermektedir (Buyukada, 2016; Buyukada, 2017).

İlgili literatürde endüstriyel atık suların arıtımında adsorpsiyon, flokulasyon, aktif karbon vb. klasik konvansiyonel pek çok metot kullanılmış; ancak, uzun işletme süresi ve düşük verim gibi nedenlerden ötürü araştırmacılar sürekli olarak yeni arayışlar içerisinde olmuşlardır. Fotokatalitik bozunma, ultrases, Fenton vb. süreçlerin genel ismi olan ileri oksidasyon süreçleri (İOS), yüksek verim ve kısa sürede bu verime ulaşma gibi avantajlarından ötürü, her ne kadar işletme maliyetleri nispeten yüksek olsa da, son yıllarda araştırmacılar tarafından artan bir hızla kullanılmaktadır (Clevers, 2004). Bu bağlamda ozonlama süreci etkin bir İOS olarak değerlendirilebilir (Buyukada, 2016). Ozon varlığı ile çözelti ortamında hızla hidroksil radikalleri üretilmesi ve bu radikallerin ortamdaki kirleticileri hızla zararsız yan ürünlere indirgemesi kısaca ozonlama sürecini tanımlamaktadır (Buyukada, 2016). Bu noktada bir tavuk kesimhanesi çıkış sularının ileri arıtımında ozonlama sürecinin uygulanması etkin bir yol olarak değerlendirilebilir.

Özellikle son yıllarda dinamik sistemler üzerinde çalışan araştırmacıların yoğunlaştığı en önemli konulardan birisi de sonuçların faydalı model türetmek için kullanılması yani ampirik (deneye dayalı) modellemedir. Bu

bağlamda klasik deney yaklaşımları, deneysel örnekleme noktasında resmin belli bir kısmına yığılan veriler toplanmasına yol açtığı için otokorelasyon gibi sıkıntılı beraberinde getirmektedir. Gerek hata payını minimize etmek, gerek deney tekrarına bağlı maliyeti düşürmek gerekse genel örnekleme veri elde edilmesini sağlayan istatistiksel deney planlama yaklaşımlarına deneme tasarımları (DT) denilmektedir. Bu sayede çok az sayıda deneyle maksimum faydayı sağlayan örnekleme alınması mümkün olmaktadır. DT, sadece giderimi incelenen kirleticilerin tahmin edilmesi temelli faydalı modelde değil, aynı zamanda etkisi incelenen işletme şartlarının optimizasyonunda da son derece etkili ve başarılı olmaktadır (Buyukada, 2017; Ferrari ve ark., 2003; Giri ve ark., 2007; Güyer ve ark., 2011). Genellikle hassasiyeti düşük olan işletme şartları için Box Behnken tasarımı (BBT) faydalı ve katkı sunan bir DT yaklaşımıdır. Bu bağlamda tavuk kesimhanesi çıkış sularının ozonlama ile ileri arıtımında BBT'nin kullanılması ilgili literatüre anlamlı katkı sunabilir.

İlgili literatürde kanatlı et kesimhanesi atık su arıtma ünitesi çıkış sularının ileri arıtımı ile ilgili oldukça az çalışma yapıldığı, ilaveten mevcut çalışmalarda da ne ozonlamanın ne de BBT'nin değerlendirilmediği net bir biçimde görülmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında mevcut çalışmanın amacı ve ana iskeleti şu şekilde özetlenebilir:

- (1) Hindi kesimhanesi çıkış atık sularındaki koku bileşiklerinin GC/MS temelli tayini;
- (2) ilgili koku bileşiklerinin ozonlama ile gideriminde BBT'nin kullanımı;
- (3) başlangıç pH'ı, ozon dozu ve reaksiyon süresinin; koku bileşiklerinin giderimi üzerine doğrusal (- olmayan) etkilerinin kuantifikasyonu;
- (4) koku bileşiklerinin giderimlerinin tahmin edilmesi için çoklu doğrusal olmayan regresyon (ÇDOR) modellerinin türetilmesi ve validasyonu;
- (5) türetilen model içerisindeki belirsizliklerin tanımlanması ve
- (6) ozonlama sonucu oluşan ürünlere (koku bileşiklerine) dayalı spekülatif reaksiyon mekanizması tahmini ve muhtemel ara yolların belirlenmesi.

Ancak, mevcut çalışmada sunulmak üzere sadece (6) numaralı amacın bazı sonuçları ele alınmış ve sonuçları ilgili literatür ışığında karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Atık su

Mevcut çalışmada kullanılan atık su örnekleri Bolu ilinde yer alan yerel bir hindi kesimhanesinin atık su arıtma ünitesinden temin edilmiştir. Alınan örnekler deşarj edilen arıtılmış atık sulardır.

### 2.2 Ozonlama süreci

Deneysel olarak kullanılan ozonlama süreci çeker ocak içerisinde konumlandırılmış bir ozon jeneratörü, debimetre, 250 mL hacminde dikey silindirik cam reaktör ve sistemin üzerine oturtulduğu ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ve debimetreden oluşmaktadır. Başlangıç pH ayarlamaları için ilgili deneylerde 0.1 M konsantrasyonlarında NaOH ve HCl çözeltileri, katı/sıvı oranı hassasiyeti gözetilerek kullanılmıştır.

### 2.3 Box-Behnken tasarımı (BBT)

Üç seviyeli, tek tekrarlı ve çift örnekleme bir BBT, ozonlama sürecinin deneysel kurgusunu oluşturmak için kullanılmıştır. Bu bağlamda ilgili atık suyun arıtımında etkisi incelenecek açıklayıcı değişkenler olarak ozon dozu (OD, mg/L), başlangıç pH'ı (pH) ve reaksiyon (ozonlama) süresi (RS, dk) belirlenmiştir. Bu açıklayıcı değişkenlerin seviyeleri Tablo 1'de verilmiştir; ancak deneyler paylaşılmamıştır.

**Tablo 1.** İşletme parametreleri, seviyeleri ve BBT'ye ait deney çizelgesi.

Seviyeler	Açıklayıcı değişkenler		
	OD (mg/L)	pH	RS (dk)
Min (-1)	8	6.5	10
Mid (0)	16	7.5 (doğal)	20
Maks (+1)	24	8.5	30

#### 2.4. Analizler

İlgili atık sularındaki koku bileşiklerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesinde, yani nicelleştirilmesinde, gaz kromatografi kütle spektroskopisi (GC/MS) tekniğinden yararlanılmıştır. Kullanılan GC/MS tekniği temelde bazı değişiklikler içermekle birlikte Wu ve Duirk (2013) tarafından kullanılan metot ile benzerdir. Bu farklılıklar Tablo 2'de kısaca belirtilmiştir.

**Tablo 2.** Kullanılan GC/MS tekniği ile ilgili bilgiler.

Özellik	Mevcut çalışma	Referans çalışma (Wu ve Duirk, 2013)
GC/MS	Shimadzu GC-2010 QP 2010 MS plus	Agilent 7890A GC with a5975C MS
GC kolon	M-2-1090	Hp-5 MS (60 m, 0.25 µm of ID, 0.25 µm DF) ilave ortam polarite destek kolonu ile w 25760-U (15 m, 0.25 mm ID, Supelo analytical)
He gaz akış hızı (mL/dk)		1.12
Benzerlik oranı (%)		90

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Genel atık su karakteristiği ve ana koku bileşikleri

Çalışılan atık suyun genel karakteristiğini ortaya koymak için Materyal ve Metot kısmında belirtilmeyen bazı analitik testler ile ilgili atık su örneklerinin kirlilik durumu betimlenmeye çalışılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir.

**Tablo 3.** Ham atık su örneklerine ait betimleyici karakteristikler ve ana koku bileşikleri ( $n = 10$ ).

Parametreler	Atık suyun özellikleri ( $n = 10$ )	Başlangıç pH'sı <sup>1</sup>		
		6.5	7.5	8.5
Renk	L*	10.42±1.6	10.43±1.7	10.44±1.4
	a*	0.13±0.02	0.23±0.04	-0.06±0.01
	b*	-0.87±0.02	-1.06±0.03	-0.89±0.02
	$\Lambda_{max}$ (nm)	291±2	292±2	292±2
	Absorbans (IU)	0.417±0.1	0.374±0.1	0.394±0.1
Karakteristik	KOİ (mg/L)	135.3±10.7	144.2±11.2	133.4±9.8
	TOK (mg/L)	87.5±8.5	94.6±9.6	87.2±8.9
	İletkenlik (µS)	1396±41	1375±43	1400±44
	Bulanıklık (NTU)	15.12±1.2	15.52±1.3	15.07±1.2
Ana koku bileşikleri <sup>2</sup>	Asetik asit (%)	20.7±1.3	20.5±1.4	20.1±1.1
	Diisobutil ftalat (%)	31.2±2.4	32.5±2.5	30.7±2.4
	Dimetil silanediol (%)	34.4±2.7	34.3±2.8	34.2±2.7

<sup>1</sup> Doğal pH = 7.61±0.1. <sup>2</sup> %20'den düşük koku bileşikleri hariç bırakılmıştır.

Bu bağlamda belirtilen GC/MS analizi neticesinde elde edilen ana koku bileşikleri de Tablo 3'te verilmiştir. Tablo 3'ten açıkça görüldüğü üzere hindi kesimhanesi çıkış sularındaki koku bileşikleri alkol- ve asit-temelli olup yüksek kirletici içeriğe sahiptir.

### 3.2. Koku bileşiklerinin giderimi

#### 3.2.1. Asetik asit giderimi

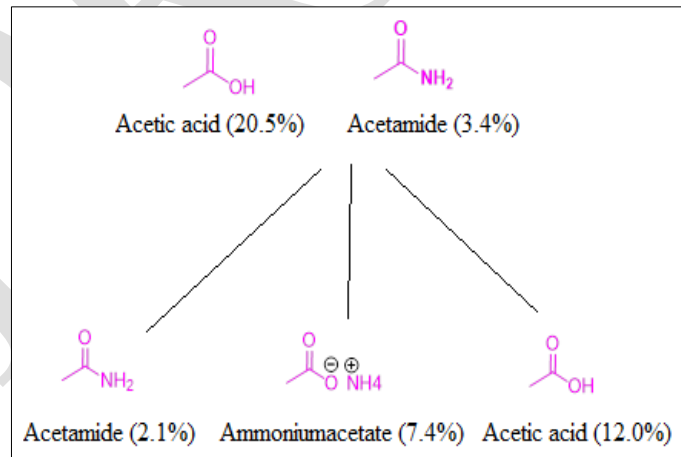
Ozonlama ile asetik asit giderimi 16 mg/L ozon dozu, 7.5 başlangıç pH'sı ve 25 dk ozonlama süresi sonunda %32'den %12'ye düşürülmüş ve böylece %62.5'lik bir giderim elde edilmiştir. Artan ozon dozunun ( $r = 0.153$ ;  $p < 0.032$ ;  $n = 15$ ) ve ozonlama süresinin ( $r = 0.265$ ;  $p = 0.005$ ;  $n = 15$ ) asetik asit gideriminde bir artışa öncülük ettiği gözlemlenmiştir. Asetik asit miktarındaki bu azalma, ham atık su örneklerinde bulunmayan amonyum asetat (%7.4) ve asetamit (%2.1) oluşumunu tetiklemiştir. Bu yan ürünlerin oluşumunda ham atık su özelliklerinde belirtilmeyen ancak eser koku bileşiği olarak bulunan asetamit'in de katkısı bulunmaktadır (%3.4). Muhtemel ürün oluşumunun Şekil 1'de verildiği gibi gerçekleştiği düşünülmektedir.

#### 3.2.2. Dimetil silanediol giderimi

Ozonlama ile dimetil silanediol giderimi 16 mg/L ozon dozu, 7.5 başlangıç pH'sı ve 25 dk ozonlama süresi işletme şartlarında %34.3'ten %12.4'e düşürülmüş ve böylece %58.3'lük bir giderim elde edilmiştir. Artan ozon dozunun ( $r = 0.432$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 15$ ) ve ozonlama süresinin ( $r = 0.356$ ;  $p < 0.001$ ;  $n = 15$ ) dimetil silanediol gideriminde bir artışa öncülük ettiği gözlemlenmiştir. Dimetil silanediol miktarındaki bu azalma, uzun zincirli ve yüksek molekül ağırlıklı organik bileşik oluşumunu tetiklemiştir (Şekil 2). Oluşan yan ürünler ve miktarları üzerinden dimetil silanediol parçalanmasının mevcut hali ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 2).

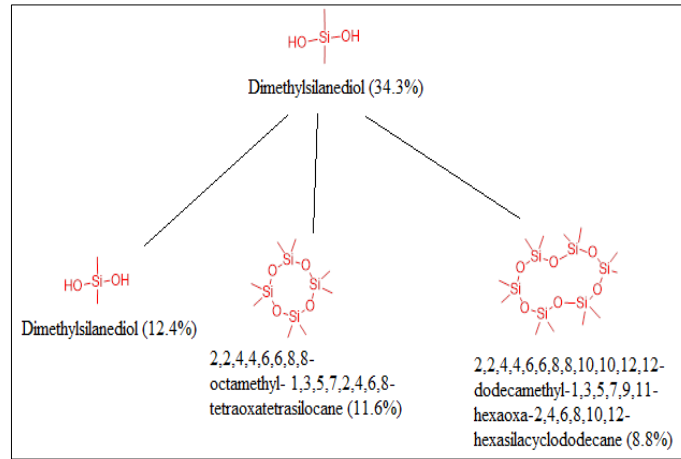
#### 3.2.3. Diisobütil ftalat giderimi

Ozonlama ile diisobutil ftalat giderimi 16 mg/L ozon dozu, 7.5 başlangıç pH'sı ve 25 dk ozonlama süresi sonunda %32'den %12'ye düşürülmüş ve böylece %62.5'lik bir giderim elde edilmiştir. Artan ozon dozunun ( $r = 0.224$ ;  $p = 0.023$ ;  $n = 15$ ) ve ozonlama süresinin ( $r = 0.287$ ;  $p = 0.007$ ;  $n = 15$ ) diisobutil ftalat gideriminde bir artışa öncülük ettiği gözlemlenmiştir. Diisobutil ftalat miktarındaki bu azalma, ham atık su örneklerinde bulunmayan ftalik asit (%22.4) ve 2-(isobutylkarbonil) benzoik asit (%9.2) oluşumunu tetiklemiştir. Bu yan ürünlerin oluşumunda ham atık su özelliklerinde belirtilmeyen ancak eser koku bileşiği olarak bulunan 2-(isobutylkarbonil) benzoik asit'in de katkısı bulunmaktadır (%8.0). Ancak, asetik asit ve asetamit örneğinin tersine, burada 2-(isobutylkarbonil) benzoik asit miktarında bir artış söz konusu olmuştur. Muhtemel ürün oluşumunun ve bozunma yolunun Şekil 3'te verildiği gibi gerçekleştiği düşünülmektedir.

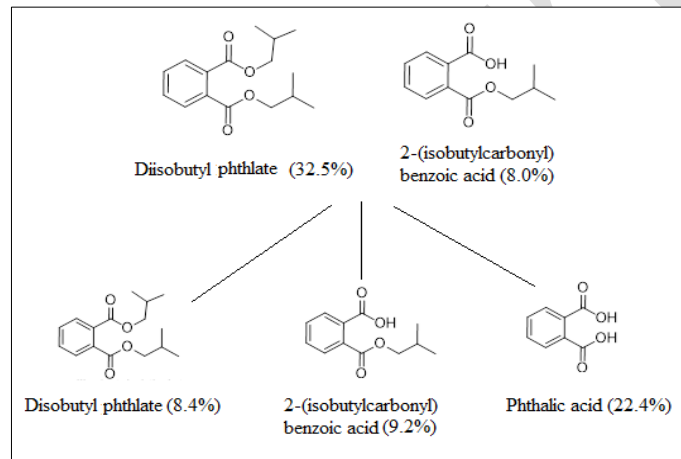


Şekil 1. Asetik asit ve asetamit'in ozonlama ile giderimi ve oluşan yan ürünler.





Şekil 2. Dimetil silanediolün ozonlama parçalanması ve oluşan ürünler.



Şekil 3. Diisobutil ftalat'ın ozonlama ile giderimi ve oluşan yan ürünler.

#### 4. ÇIKTILAR

Yerel bir kanatlı eti kesimhanesi atık su arıtma tesisinden alınan deşarj sularındaki koku bileşiklerinin ozonlama ile gideriminin incelendiği bu çalışmada modifiye bir GC/MS tekniğinden faydalanılmıştır. Bu bağlamda mevcut çalışma hava kalitesi ve kirliliği dışında atık sulardaki koku kirliliğini ele alması bakımından büyük önem taşımakta ve ilgili literatüre önemli katkı sunmaktadır. İlgili atık sulardaki ana koku bileşiklerinin alkol- ve asit-bazlı olduğu, bu koku bileşiklerinin koku kirliliğine sebebiyet veren tüm koku bileşiklerinin %65±3'üne karşılık geldiği belirlenmiştir. Ozonlama ile %58-%63 aralığındaki koku bileşiklerinin giderimi, sürecin etkinliğini ortaya koymuştur.

#### TEŞEKKÜR

Mevcut çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi (BAİBÜ) Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Hidroloji ve Limnoloji laboratuvarı imkanları ve BAİBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAİBÜ-BAP-Proje No: 2019.09.09.1410) biriminin mali desteği ile gerçekleştirilmiştir. Yazar, sundukları bu katkılarından dolayı her iki birime de teşekkürlerini sunar.

#### KAYNAKLAR

- BESD-BİR, 2014. Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçıları Birliği. "Türk Kanatlı Eti Sektörü İhracatta Dünyada İlk 3'e Oynuyor". <http://www.besd-bir.org/haberler/turk-kanatli-eti-sektoru-ihracatta-dunyada-ilk-3-e-oyuyor> (06/11/2014).
- Buyukada M, 2016. Modeling of decolorization of synthetic reactive dyestuff solutions with response surface methodology by a rapid and efficient process of ultrasound-assisted ozone oxidation. *Desalination and Water Treatment*, 57: 14973–14985.

- Buyukada M, 2017. Prediction of Photocatalytic Degradation and Mineralization Efficiencies of Basic Blue 3 Using TiO<sub>2</sub> by Nonlinear Modeling Based on Box–Behnken Design. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 41: 2631-2646.
- Buyukada M, Evrendilek F, 2017. Color and cod removals by photocatalytic degradation: an experimental design approach and cost analysis. *Sigma Journal of Engineering and Architecture*, 8: 217-226.
- Cleuvers M, 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicological Environmental Safety*, 59: 309-315.
- Ferrari BT, Paxéus N, Giudice RL, Pollio A, Garric J, 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicological Environmental Safety*, 55: 359-370.
- Giri RR, Ozaki H, Ishida T, Takanami R, Taniguchi S, 2007. Synergy of ozonation and photocatalysis to mineralize low concentration 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in aqueous solution. *Chemosphere*, 66: 1610-1617.
- Güyer GT, Ince NH, 2011. Degradation of diclofenac in water by homogeneous and heterogeneous sonolysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 114-119.
- Hijosa-Valsero M, Molina R, Schikora H, Müller M, Bayona JM, 2013. Removal of priority pollutants from water by means of dielectric barrier discharge atmospheric plasma. *Journal of Hazardous Materials*, 262: 664-673.
- Khetan SK, Collins TJ 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Reviews*, 107: 2319-2364.
- Kosjek T, Heath E, Krbavčič A, 2005. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environmental Intermediate*, 31: 679-685.
- Laville N, Ait-Aissa S, Gomez E, Casellas C, Porcher JM, 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, 196: 41-55.
- Naddeo V, Belgiorno V, Kassinos D, Mantzavinos D, Meric S, 2010. Ultrasonic degradation, mineralization and detoxification of diclofenac in water: optimization of operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 179-185.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD, 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68: 141-150.
- Wu D, Duirk SE, 2013. Quantitative analysis of earthy and musty odors in drinking water sources impacted by wastewater and algal derived contaminants. *Chemosphere*. 91: 1495-1501.

## Su ve süt kefirlerinin polifenol içeriklerinin ve antioksidan kapasitelerinin araştırılması

Emine Nakilcioğlu-Taş<sup>1</sup>, Büşra Çakaloğlu<sup>1\*</sup>, Semih Ötleş<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: busra.cakaloglu@outlook.com

### Özet

Geleneksel, fermente bir içecek olan kefir, günümüzde süttten endüstriyel olarak üretimi gerçekleştirilen ve piyasada birçok farklı çeşidine rastlayabildiğimiz bir üründür. Su kefirini ise bilinen kefirin farklı olarak süt ile değil su, şeker ve az miktarda meyve kullanılarak elde edilen fonksiyonel bir içecektir. Ayrıca su ve süt kefirleri farklı kültürlerden mayalar ile fermente edilir. Bu çalışmanın amacı süt kefirini mayası kullanılarak inek sütünden elde edilen kefir ile su kefirini mayasından su, şeker ve kuru meyve ile üretilen su kefirinin fenolik içeriklerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda örneklerin toplam fenolik madde miktarları, toplam flavonoid miktarı, DPPH radikalini inhibe etme yetenekleri ve demir (III) indirgeme antioksidan kapasiteleri ortaya konulmuştur. Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar, aralarında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını kanıtlanması için istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Toplam fenolik madde miktarları sırasıyla su ve süt kefirini için 38.66 mg GAE/L ve 70.15 mg GAE/L olarak tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Toplam flavonoid miktarları analiz edildiğinde, süt kefirinin 36.61 mg (+)-CE/L ile su kefirinden (11.55 mg (+)-CE/L) daha yüksek flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Antioksidan aktivitenin belirlenmesi adına gerçekleştirilen analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde ise %57.31 DPPH inhibisyon değeri ile yine süt kefirinin öne çıktığı tespit edilmiştir; su kefirini için bu değer %43.05 olarak belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). FRAP değerleri, aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmakla birlikte sırasıyla su kefirini için 1.19 mmol FeSO<sub>4</sub>/L ve süt kefirini için 2.21 FeSO<sub>4</sub>/L'dır ( $p < 0.05$ ). Analize tabi tutulan kefirlerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları ile DPPH ve FRAP yöntemleriyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri göz önüne alındığında, süt kefirinin tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farkla su kefirinden daha yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın; ülkemizde son zamanlarda tüketilmeye başlanan su kefirinin polifenolik içeriği ve antioksidan etkisiyle ilgili merak edilen sorulara ışık tutacağı ve tüketiciler tarafından tanınırlığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** su kefirini, süt kefirini, fenolik bileşikler, antioksidan maddeler

### Investigation of polyphenol content and antioxidant capacity of water kefir and milk kefir

#### Abstract

Kefir, a traditional fermented beverage, is a product produced industrially from milk and can be found in many different varieties in the market. Water kefir is a functional beverage obtained by using water, sugar and a small amount of fruit, not milk. Water and milk kefir are fermented with yeasts from different cultures. The aim of this study was to determine the phenolic contents and antioxidant activities of kefir produced from cow milk with milk kefir yeast and kefir produced from water, sugar and dried fruit with water kefir yeast. For this purpose, total phenolic content, total flavonoid content, ability to inhibit DPPH radical and iron (III) reducing antioxidant capacities of the samples were determined. The analyses were performed in triplicate and the results obtained were subjected to statistical analysis to prove whether there was a significant difference between them. Total phenolic contents were 38.66 mg GAE/L and 70.15 mg GAE/L for water and milk kefir, respectively ( $p < 0.05$ ). When total flavonoid amounts were analysed, it was found that milk kefir had a higher flavonoid content (36.61 mg (+)-CE/L) than water kefir (11.55 mg (+)-CE/L) ( $p < 0.05$ ). When the results of antioxidant activity were evaluated, it was found that milk kefir came to the fore with 57.31% DPPH inhibition value. This value was determined as 43.05% for water kefir ( $p < 0.05$ ). FRAP values were 1.19 mmol FeSO<sub>4</sub>/L for water kefir and 2.21 FeSO<sub>4</sub>/L for milk kefir, although there was a statistically significant difference between them ( $p < 0.05$ ). When the total phenolic and total flavonoid contents of the kefir analyzed and the antioxidant activity values determined by DPPH and FRAP methods were taken into consideration, milk kefir had a higher phenolic content and antioxidant activity than water kefir in all analyzes with a statistically significant difference. It is thought that this study will shed light on the questions about the polyphenolic content and antioxidant activity of water kefir, which has recently started to be consumed in our country, and will contribute to its recognition by consumers.

**Keywords:** water kefir, milk kefir, phenolic components, antioxidant substances

## GİRİŞ



Kefir; laktik asit ve etil alkol fermentasyonu sonucu oluşan, asidik bir tada sahip, ferahlatıcı, doğal karbonatlı ve kremi kıvamda fermente bir süt ürünüdür. Günümüzden 5000 yıl öncesinden beri Orta Asya'daki atalarımız tarafından inek, at, keçi, manda sütlerine karnabaharı andıran kefir daneleri ilave edildikten sonra fermentasyona bırakılarak elde edilmiştir (Özsoy ve ark., 1998; Karatepe ve Yalçın, 2012).

Fermentasyon; laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalardan oluşan kefir tanelerinin taze süte eklenmesi ile başlar; kefir taneleri suda çözünmez ve farklı boyutlardadır. Kefir taneleri işlemden sonra süzülerek veya filtre edilerek ayrılır. Kefir olgunlaşırken kendilerini yenileyen kefir daneleri yeni fermentasyon için hazırdır, diğer bir deyişle bu daneler çok defa kefir üretmek için kullanılabilir. Giderek artan daneler ile süt miktarı da artırıldığı takdirde daha fazla miktarda kefir üretimi gerçekleştirilebilir (Eryılmaz, 2018).

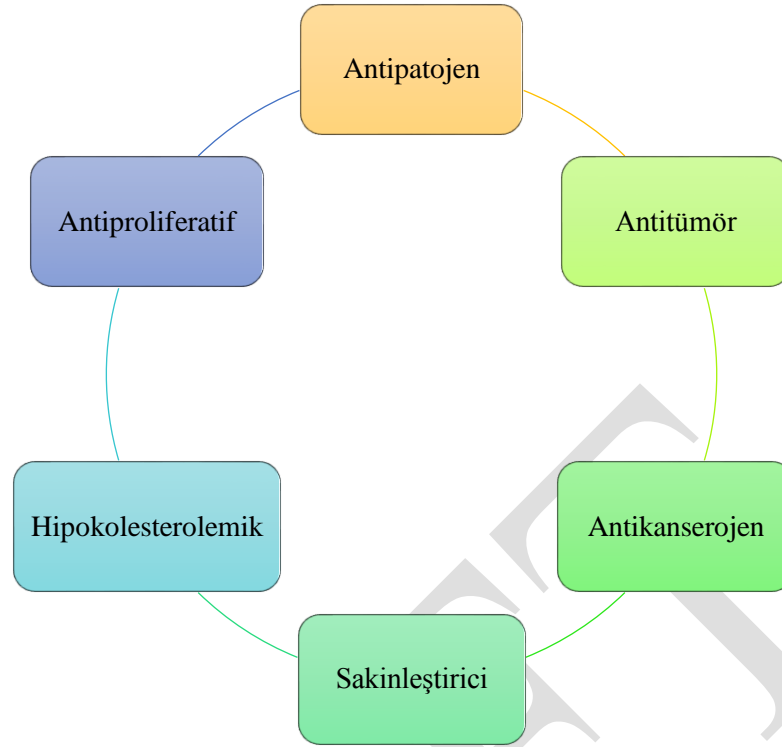
Kefir üretiminde geleneksel ve endüstriyel üretim olmak üzere 2 yöntemin kullanımı söz konusudur. Endüstriyel olarak üretilen kefirler birçok analizden geçmiş daha hijyenik koşullarda üretilmiş olsa da tüketiciler tarafından geleneksel yöntemle hatta ev yapımı kefir daha çok tercih edilmektedir. Bu nedenle endüstriyel bazda geleneksel üretimin sahip olduğu aroma ve kıvamı yakalama çalışmaları sürmektedir (Karagözlü ve ark., 2007).

Su kefir; bitkisel kaynaklı sütler, meyve-sebze suları ile üretilebildiği için hem çok sayıda farklı lezzetler ile tüketilebilmesi hem de vegan, vejetaryen tüketime uygun olması açısından son zamanlarda çok fazla dikkat çekmiştir. Özellikle üretiminin kolay olması, evde üretimini mümkün kıldığı için ev tipi üretim yaygınlaşmıştır.

Farklı damak zevklerine göre çeşitli tatlarda su kefir üretilir.

Laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen dekstran ekzopolisakkariti; su kefir tanelerinin temel yapı taşıdır. Dekstran glikozdan oluşan yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarittir. Ekzopolisakkarit üreten mikroorganizmalardan bazıları şunlardır; *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus hilgardii*.

Kefirin probiyotik ve prebiyotik içeriğe sahip olması nedeniyle mide ve bağırsak üzerine önemli derecede olumlu etkileri mevcuttur. Bunlarla birlikte; sinirsel rahatsızlıklara, iştah sorununa, mide rahatsızlığına, uykusuzluğa iyi geldiği konuyla ilgili yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Dahası obezite ve karaciğer yağlanmasına karşı önemli rol oynadığı bilinmektedir (Hosono ve ark., 1990; Osada ve ark., 1994; Zacconi ve ark., 1995; Karatepe ve Yalçın, 2014; Kim ve ark., 2017). Şekil-1'de kefirin sağlık üzerine etkilerinden bazıları görülmektedir.



Şekil 1. Kefirin sağlık üzerine etkileri

Bu çalışmanın amacı süt kefir mayası kullanılarak inek sütünden elde edilen kefir ile su kefir mayasından su, şeker ve kuru meyve ile üretilen su kefirinin fenolik madde miktarlarını, antioksidan aktivitelerini belirlemektir.

Su ve süt kefirlerinin farkları ortaya konularak hangisinin fenolik bileşik ve antioksidan aktivite bakımından daha üstün olduğunu belirlemek hedeflenmektedir.

Hem su kefirinin tüketiciler tarafından tanınmasını kolaylaştırmak hem de literatürde çok fazla sayıda derleme bulunurken az sayıda olan araştırma çalışmalarına katkı sağlamak bu çalışmanın temel amaçlarındandır.

#### **MATERYAL VE METOD**

Piyasadan temin edilen su kefir ve süt kefir mayası üretim önerileri doğrultusunda üretilmiştir. Süt kefir inek sütü ile mayanın fermente edilmesi ile elde edilirken; su kefir üretiminde bir miktar şeker, su ve az miktarda kuru üzüm kullanılmıştır. Elde edilen kefirler cam şişelerde analizler tamamlanana dek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

#### **Ekstraksiyon**

su ve süt kefir örneklerinin fenolik bileşenlerinin ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde öncelikle fenolik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, tüm analizler elde edilen bu ekstraktlar ile yapılmıştır. Su kefirinin fenolik bileşenleri ekstrakte edilirken literatürdeki çalışmalardan faydalanarak ancak bazı modifikasyonlarla; 5 ml örnek alınıp 10 ml hacme su ile tamamlanmıştır. Süt kefirinin fenolik ekstraktı ise; 15 ml örnek santrifüj tüpüne alınıp üzerine 15 ml su ilave edildikten sonra santrifüj işlemine tabi tutulup işlem sonunda üst fazın alınması ile elde edilmiştir (Yüce, 2015; Eryılmaz, 2018).

#### **Fenolik Bileşenlerin ve Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi**

Toplam fenolik madde miktarı analizi, Folin-Ciocalteu yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar mg GAE/L örnek cinsinden ifade edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965).

Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi; mg (+)-CE/L örnek cinsinden ifade edilmiştir (Heimler ve ark., 2005)

DPPH radikalini indirgeme aktivitesi %inhibisyon değerleri ile ifade edilmiştir (Xu ve ark., 2004).

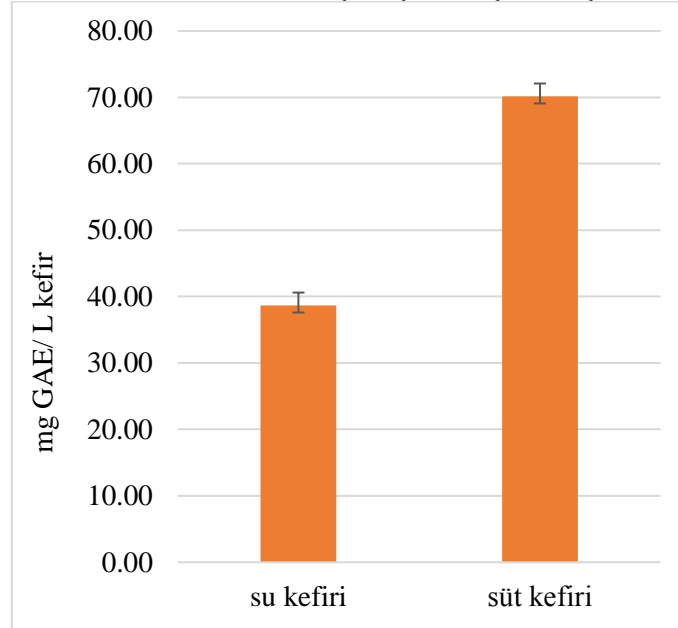
FRAP Demir (III) iyonunu indirgeme yeteneği mmol FeSO<sub>4</sub>/L örnek cinsinden ifade edilmiştir (Chu ve ark., 2000).

#### **İstatistiksel Değerlendirme**

Analizler üç paralel olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar, aralarında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını kanıtlanması için istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Burada SPSS 20.0 ile bağımsız örneklem t testi kullanılarak % 95 güven aralığında değerlendirme gerçekleştirilmiştir.

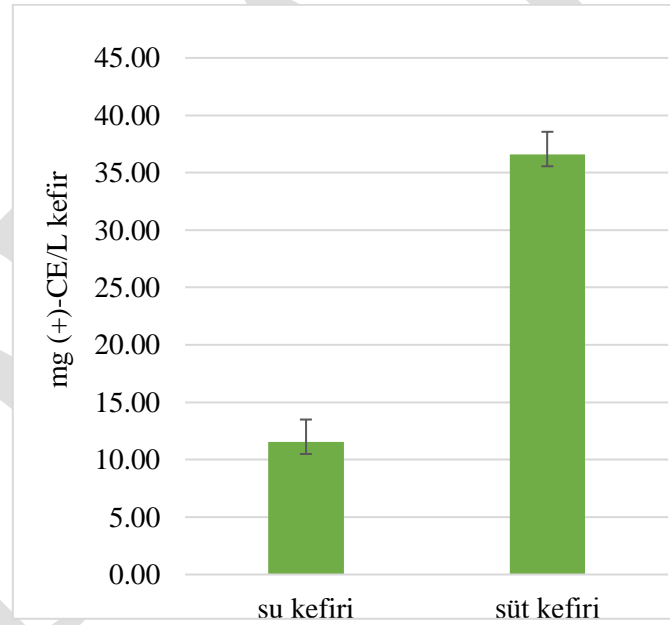
## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Su ve süt kefirlerine ait toplam fenolik madde miktarları, toplam flavonoid madde içeriği, DPPH ve FRAP ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi analizlerinin sonuçları Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4 ve Şekil 5'te görülmektedir.



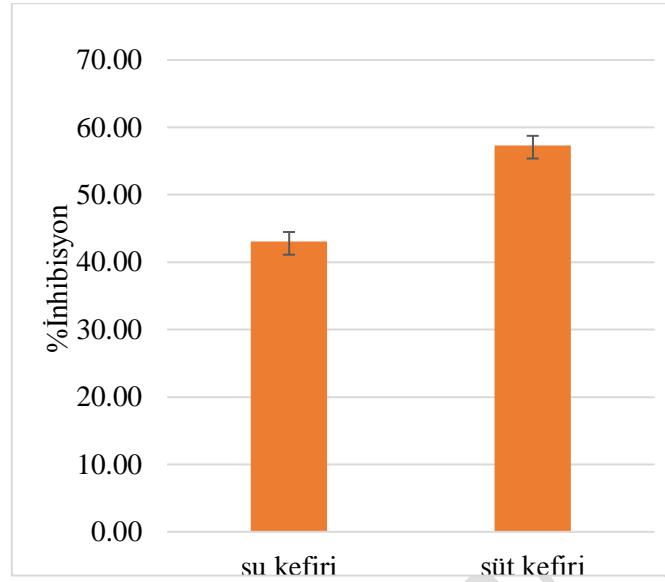
Şekil 2. Su kefir ve süt kefirinin toplam fenolik madde miktarları

Su kefirinin toplam fenolik madde miktarı 38,66 mg GAE/L kefir iken süt kefirinin 70,15 mg GAE/L kefir olarak belirlenmiştir.



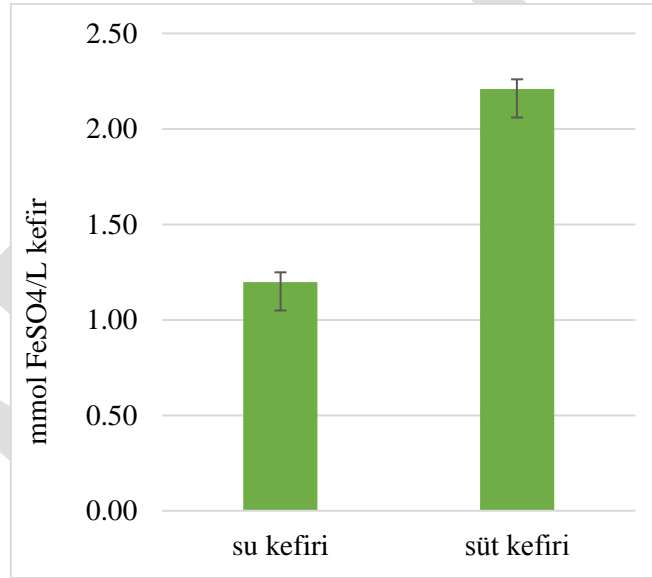
Şekil 3. Su kefir ve süt kefirinin toplam flavonoid madde miktarı

Su kefirinin toplam flavonoid madde miktarı 11,55 mg (+)-CE/L kefir, süt kefirinin 36,61 mg (+)-CE/L kefiridir.



**Şekil 4.** Su kefiri ve süt kefirinin DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivitesi

Yapılan çalışma sonucunda süt kefirinin DPPH ile belirlenen antioksidan aktivitesinin % 57,32 ve su kefirinin % 43,05 olduğu kanıtlanmıştır.



**Şekil 5.** Su kefiri ve süt kefirinin FRAP yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivitesi

FRAP yöntemi ile su ve süt kefirlerinin antioksidan aktivitesi belirlendiğinde analiz sonuçlarının sırasıyla 1,20 ve 2,21 mmol FeSO<sub>4</sub>/ L kefir olduğu görülmektedir.

Analize tabi tutulan kefirlerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları ile DPPH ve FRAP yöntemleriyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri göz önüne alındığında, süt kefirinin tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farkla su kefirinden daha yüksek fenolik içeriğe ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Elde edilen sonuçlar literatürde konuyla ilgili yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında genellikle bu araştırmalar çalışmamızı destekler niteliktedir. Su kefirinin toplam fenolik madde miktarı yapılan çalışmada literatüre kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Taşkın, 2011; Yüce, 2015; Eryılmaz, 2018).

## SONUÇ

Bu çalışmanın; ülkemizde son zamanlarda tüketilmeye başlanan su kefirinin polifenolik içeriği ve antioksidan etkisiyle ilgili merak edilen sorulara ışık tutacağı ve tüketiciler tarafından tanınırlığına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Chu YH, Chang CL, Hsu HF, 2000 Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *J Sci Food Agric.* 80(5):561–6.
- Eryılmaz H, 2018 Farklı kefir kültürleri ve sütlerle elde edilen kefirlerin mineral içeriklerinin ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi (Master's thesis, Munzur Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Heimler D, Vignolini P, Dini MG, Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *J Agric Food Chem.*53(8):3053–6.
- Hosono A, Tanabe T, Otani H, 1990 Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milk Science International*, 45:647-651.
- Karagözlü N, Karagözlü C, Ergönül, B 2007. Survival characteristic of *E. Coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *Stap. aureus* during kefir fermentation. *Czech Journal of Food Science*, 25(4):202-207.
- Karatepe P, Yalçın H, 2012 Kefir ve kefirin mikrobiyolojisi. *Elektronik mikrobiyoloji dergisi.* 10(1):1-10
- Karatepe P, Yalçın H, 2014 Kefir Sağlık. *Iğdır Ünivesitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Dergisi*, 4(2):23-30.
- Kim, DH, Kim H, Jeong D, Kang IB, Chon JW, Kim HS, Song KY, Seo KH, 2017 Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 44:43-45.
- Osada K, Nagira K, Teruya K, Tachibana H, Shirahata S, Murakami H, 1994 Fermented milks. *International Dairy Federation Bulletin*, 300:98-100.
- Özsoy İ, Vatansever F, Orhan, TY, Özkarabacak Ö, 1998. Kefirin in vivo koşullarda bağırsak mikroflorası üzerine etkisi (Diploma Tezi). *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü*
- Singleton VL, Rossi JA, 1965 Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.*16:144–153.
- Taşkın B, 2011 Bazı Fermente Süt Ürünlerinin Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması. *TC Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa.*
- Xu JZ, Yeung SYV, Chang Q, Huang Y, Chen ZY, 2004 Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. *Br J Nutr.* 91(6):873–81.
- Yüce H 2015. Su Kefiri Taneleri İle Fermente Edilen Vişne, Nar Ve Üzüm Suyunun Antioksidan Profili, Miktarı Ve İn-vitro Biyoerişilebilirliğinde Meydana Gelen Değişimler (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Zacconi C, Parisi MG., Sarra PG, Dallavalle P, Bottazzi V, 1995 Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiology Aliments Nutrition*, 12:387-390.



## Ardıç (*Juniperus L.*) türlerinin halk arasında ve modern tıpta hastalıkların tedavisinde kullanımı

Emine Kapdan<sup>1\*</sup>, Mehmet Sezgin<sup>2</sup>, Mustafa Kahya<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çankırı, Türkiye

<sup>2</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Çankırı, Türkiye

<sup>3</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım ve Yaşam Bilimleri Anabilim Dalı, Çankırı

\*Sorumlu yazar e-mail:yarenf.180707@ gmail.com.

### Özet

Bu çalışma ile Ardıç ağaçlarının hastalıkların tedavilerinde kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar güncel literatür taraması ile bir araya getirilmiştir. *Juniperus L. (Cupressaceae)* türleri içinde bulunduğumuz Kuzey yarımkürede; yaklaşık 60 tür ile Ülkemizde ise 2 bölüm 7 tür olarak bulunmaktadır. Genel olarak halk arasında Ardıç ağacı olarak bilinmektedir. Tedaviler için kullanılan meyvelerinin içeriğinde; Flavonoidler, glikozit, invert şeker (%15-30), Kateshin (%3-5), organik asitler, uçucu yağ (%0,5), terpenik asitler, lökoantosiyanidin ile besin maddeleri (Bakır, krom, kalsiyum, demir, fosfor, magnezyum, potasyum, C vitamini) bulunur. Ardıç meyvelerinin içermiş olduğu uçucu yağlar, meyvelere acı bir tat ve terebentin benzeri bir koku verir. Ardıç ekstralarındaki önemli fenolik bileşenler lignanlar, kumarinler, sesquiterpenes, abietan, labdane, ve pimarane diterpenleri, flavonoidler, biflavonoller, flavon glikozitleri ve taninler olarak saptanmıştır.

Ardıç türlerin halk arasında kullanımı eski Mısır'lılara kadar dayanmaktadır. Yaprak ve meyveleri kaynatılarak elde edilen özlerden soğuk algınlığı, enfeksiyon, ürtiker, dizanteri, tüberküloz, sarılık, romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Özütün toksik etkisi nedeniyle bazı insanlarda ciddi alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. Günümüzde modern Tıp'ta ise bitkiden elde edilen sekonder metabolitlerin; kan basıncı ve kan insülin seviyesinin düşürülmesi, mide rahatsızlıkları, bazı kanser türlerinin tedavi denemelerinde kullanılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Ardıç, *Juniperus*, Sekonder Metabolit

### The use of Juniper (*Juniperus L.*) species in the treatment of diseases among people and in Modern Medicine

#### Abstract

In this study, the studies on the use of juniper trees in the treatment of diseases are combined with the current literature review. *Juniperus L. (Cupressaceae)* species in the Northern Hemisphere; In our country with about 60 species, there are 2 types 7 species. It is commonly known as Juniper tree among the people. In the content of fruits used for treatments; Flavonoids, glycosides, invert sugar (15-30%), catechin (3-5%), organic acids, essential oil (0.5%), terpenic acids, leucoanthocyanidine with nutrients (copper, chromium, calcium, iron, phosphorus, magnesium, potassium, vitamin C). The essential oils contained in the juniper fruits give the fruits a bitter taste and a turpentine-like fragrance. Important phenolic components in juniper extracts were lignans, coumarins, sesquiterpenes, abietan, labdane, and pimarane diterpenes, flavonoids, biflavonols, flavone glycosides and tannins.

The use of juniper species among the people dates back to the ancient Egyptians. It is used in the treatment of colds, infections, urticaria, dysentery, tuberculosis, jaundice and rheumatic diseases. Due to the toxic effect of the extract, it causes serious allergic reactions in some people. In modern medicine, secondary metabolites obtained from plants are; Blood pressure and blood are used in the treatment of lowering the insulin level, stomach disorders, and treatment of some types of cancer.

**Keywords:** *Juniper*, *Juniperus*, Secondary Metabolite

### GİRİŞ

İnsanoğlu yaşadığı doğa ortamına her zaman uyum sağlamış, doğadan elde ettiği kaynakları en iyi şekilde değerlendirme isteği yüzyıllarca devam etmiştir. Özellikle orman ağaçlarından barınma ve beslenme ihtiyacı dışında ağaçların meyve, yaprak, kök ve benzeri yapılarını kullanarak hastalıkların tedavisinde kullanmış ve halen kullanılmaktadır. Bu ağaçlar arasında Ardıç (*Juniperus L.*) türleri özel bir öneme sahiptir. Ardıç ağaçlarının meyve ve yapraklarından elde edilen özütler ile geleneksel tıpta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmış ve modern tıp uygulamalarında uzun araştırma süreçleri ve denemeler sonucu hastalıkların tedavisi için sunulan ilaçların etken maddesi içinde Ardıç'tan elde edilen uçucu yağ ve fenolik bileşikler yer almıştır. Bu özütlerin tedavi edici özelliğine rağmen toksik etkide gösterebilmektedir. Bu çalışmada; Tedavi amaçlı

kullanılan Ardıç türleri, geleneksel ve modern tıpta kullanımı ile toksik etkilerini bildiren çalışmalar güncel literatür taraması ile bir araya getirilmiştir.

### **Ardıç (*Juniperus* sp.)**

Ardıçlar (*Juniperus* L.), Cupressaceae (pul yapraklılar) familyasına aittir. Pul yapraklılar familyası taksonları; çok dallanan herdem yeşil ağaç, küçük ağaç veya yerde sürünen çalılar halindeki bitkilerdir. Bazılarında yapraklar iğne, bazılarında pul şeklinde olup diğer familyalardan ayrı olarak sürgünlere çevrel veya karşılıklı olarak yerleşmişlerdir. Hiçbir türün odununda reçine kanalı yoktur. Pul yapraklılar familyası kozalak ve sürgün yapıları bakımından Thujoideae, Cupressoideae ve Juniperoideae şeklinde 3 alt familyaya ayrılır. Ardıç ve andız cinsleri, Juniperoideae alt familyasındandır. *Juniperus* L. (ardıç) cinsi, dişi çiçek, kozalak pulu ile tohum tomurcuğu ilişkisi ve yaprak formuna göre *Oxycedrus* ve *Sabina* adıyla iki seksiyona ayrılır. Ardıç cinsi, Sibirya'dan Afrika'ya kadar çok geniş bir coğrafyada 60'ın üzerinde türü içerir (Kayacık, 1980). Ülkemizde *Oxycedrus* seksiyonuna ait 3 tür, 6 takson, *Sabina* seksiyonuna ait 4 tür doğal olarak yayılır.

#### **A. *Oxycedrus* Seksiyonu**

- (1) *Juniperus comminus* L. subsp. *comminus*
- (2) *Juniperus comminus* L. subsp. *hemisphaerica* (Pres.) Nyman
- (3) *Juniperus comminus* L. subsp. *nana* syme (Yapık, Cüce ardıç)
- (4) *Juniperus oblonga* Beib. (Kafkas Ardıcı)
- (5) *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* (Diken Ardıç)
- (6) *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Diken Ardıç)

#### **B. *Sabina* Seksiyonu**

- (1) *Juniperus phoenica* L. (Servi ardıç, Finike ardıcı)
- (2) *Juniperus foetidissima* Willd. (Yağ ardıcı, Yağlı ardıç, Kokar ardıç)
- (3) *Juniperus sabina* L. (Parda, Karaardıç, Sabin ardıç)
- (4) *Juniperus excelsa* Bieb. (Bozardıç, Karaardıç)

Ardıç, kuraklık ve don gibi en zor iklim koşullarına dayanım gösterebilen dirençli bir türdür ve ormanı terk eden en son ağaç olarak da bilinmektedir. Ardıç ağacı öldükten sonra yüzyıllarca yıl ayakta kalabilmektedir. Türkçe'de "arda kalan, yok olmayan" anlamına gelen adının buradan geldiği düşünülmektedir (Ünver ve ark., 2018).

İlk çağlardan beri ardıç hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Eski mısırlılar, ardıç meyvelerini yemeklerde ve bağırsak parazitlerini iyileştirmek için kullanmışlardır. Avrupa kıtasında ardıç yağının tifo, kolera, tenya ve dizanteri gibi birçok hastalığın tedavisinde iyi geldiğine inanılmıştır. Kuzey Amerika'da yerliler ardıcın vücudu temizleyip iyileştireceğine, enfeksiyonlardan koruduğuna inanılmış, böbrek şikâyetlerinden, mide ağrısına, soğuk algınlığından sifilize kadar geniş bir yelpazede hastalıkları tedavi etmek için kullanmışlardır.

#### **Ardıç meyvelerinin kimyasal bileşimi**

Ardıç meyve ve yapraklarında çıkan uçucu yağın verimi, bitkinin coğrafî, olgunluk ve yaş derecesi, meteorolojik koşullar (sıcaklık, güneş ışığının uzunluğu, aydınlanma süresi), diğer faktörler'e (yağın elde edildiği) göre değişmektedir. Ortalama yağ verimi %0.5-2.5 (meyve) ve %0.2-1.0 (yaprak) arasındadır. *Juniperus comminus* L.'nin meyveleri, flavonidler, glikozit, acı bileşikler, reçine (%10), invert şeker (%15-20), kateşin (%3-5), organik asitler, uçucu yağ (%0,5 yaş, kuru meyve içinde ise % 2,5), terpenik asitler ve lökoantosiyanidin içermektedir. Diğer besin maddeleri bakır, krom, kalsiyum, demir, fosfor, magnezyum, potasyum ve C vitamini olarak sayılabilir (Poddar ve Lederer, 1982) (Tablo 1).

Ardıç meyvelerinin içermiş olduğu uçucu yağlar, meyvelere acı bir tad ve terebentin benzeri bir koku verir. Ardıç ekstralarındaki önemli fenolik bileşenler; lignanlar, kumarinler, sesquiterpenes, abietan, labdane ve pimarane diterpenleri, flavonoidler, biflavonoller, flavon glikozitleri ve taninler olarak saptanmıştır (Topçu ve ark., 1999).

Ardıç meyvesi uçucu yağının diüretik, gastrointestinal, irritant, antiseptik gaz giderici, idrar söktürücü ve antiromatizmal özellikleri bulunmaktadır. Ardıcın diüretik öncelikle terpinen-4-ol içeren uçucu yağdan kaynaklanmaktadır. Ana bileşenleri, pinen, mircene, sabinene, thujon, limonen v.b. gibi hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Yağ ayrıca sesquiterpen hidrokarbonlar (karyofilen, kadinen, elemen) ve terpen alkolleri (terpinen-4-ol) içermektedir (Leung ve Foster, 1996).

**Tablo 1.** Ardıç meyvesinin kimyasal kompozisyonu

Protein(%)	4
Lipit (%)	16
Karbonhidrat (%)	46
Lif (%)	34
N (%)	0,6
P (%)	0,18
K (%)	5,72
Ca (%)	1,43
Mg (ppm)	1,87
Fe (ppm)	79,32
Mn (ppm)	16,58
Zn (ppm)	17,84
Cu (ppm)	18,91

#### **Ardıç meyvelerinin halk arasında hastalıkların iyileştirilmesi için kullanımı**

Ardıç türlerinin orta çağda her derde deva bir ilaç olarak kullanılmaktaydı. İdrar artırıcı, terletici ve antiseptik özellikleri değişik hastalıkların tedavisinde dahili olarak yaygın şekilde kullanıldığı gibi harici olarak da cilt üzerine de uygulanırdı. Günümüzde deri iltihapları, baş ağrıları, şeker hastalıkları, sindirim yolu hastalıkları, bronşit, astım, böbrek ve idrar yolu rahatsızlıkları, sarılık, siyatik, romatizma, nefes yolu rahatsızlıkları, sinüzit, karaciğer rahatsızlıkları, metabolizma bozuklukları için kullanılmaktadır (Tümen ve Hafizoğlu, 2003).

Ardıç yağı veya seyreltilmiş ardıç tohumu çayından içildiğinde vücuttaki birikmiş olan laktik asidi giderdiği, ayrıca çocuklardaki böbrek iltihaplanmasına ve kronik mesane hastalıklarına iyi geldiği tespit edilmiştir. Kadınlarda kan dolaşımını artırdığından düzenli alınan ardıç tohumu çayı, baş ve mide ağrılarını azaltır. Ardıç yağının çeşitli ve şiddetli sinir bozukluklarında özellikle ilaçların etkisiz kaldığı durumlarda baş ağrısı, ense ağrısı, genel kırgınlık, mide krampı, migren ve sinirsel kalp rahatsızlıklarında etkili olarak kullanılmaktadır. Mesane iltihabına bağlı ağrılarda özellikle migren vb. baş ağrılarında ardıç tohumu çayının sürekli kullanımı iyileşme sağlamaktadır. Hazım bozukluklarında ve buna bağlı olarak vücutta mide asidi salgısı bozukluğu ile ortaya çıkan olumsuzlukları giderir. Ardıç bağırsak rahatsızlıklarında etkilidir. İğnelerin ve yeni sürgünlerin kaynatılması ile elde edilen su banyosu ayakların kan dolaşımını rahatlatır ve mantar türü deri bozukluklarına iyi gelir. Bir bardak suya damlatılan ardıç yağı ile yapılan gargara kötü ağız kokularını giderir. Karaciğer ve mide rahatsızlıklarında günde üç ile beş adet tohum kahvaltıdan bir saat önce alınır (Acartürk, 1996).

*Juniperus* cinsindeki ağaçların dalları, meyveleri ve yaprakları yüzyıllardır ilaç ve tentürlerde kullanılmıştır. Ardıç meyveleri, sindirim sistemi için eski bir bitkisel terapi olarak görülmektedir. Meyvelerin içeriği sindirim bezlerini uyarmakta ve dezenfektan etkisi göstermekte, mide ve bağırsağı güçlendirmekte, metabolizmayı desteklemekte ve vücuttan ürik asit ve tuzu uzaklaştırmaktadır. Ardıcın meyve ve yaprakları antihelmintik, diüretik, uyarıcı ve antiseptik olarak yara iyileşmesi için kullanılmaktadır. Anadolu dağlarında yaygın olan *J.excelsa*, yöre halkı tarafından tüberküloz ve sarılığa karşı kullanılmıştır. Yapılan bilimsel çalışmayla da *Juniperus excelsa*'nın heksan ve metanol özütlерinin tüberküloza karşı (*Mycobacterium tuberculosis*) orta derecede aktif olduğu bulunmuştur. Türkiye de yetişen 5 farklı ardıç türünün meyve ve kozalakları ile yapılan çalışmada *J.oxycedrus* subsp. *oxycedrus* ve *J.phoenicea*, bitkilerin halk arasında kullanımını destekleyen yara iyileşmesi ve antienflamatuar aktiviteleri saptanmıştır (Tümen ve ark., 2012).

*Juniperus excelsa* Bieb.'nin odun koruyucu madde ihtiva ettiği belirlenmiştir. Tüberküloz ve sarılık hastalıklarında halk ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Juniper uçucu yağının deri losyonuna katılması sonucu dezenfekte özelliğinin arttığı tespit edilmiştir. Dezenfektan, özelliği diş macununa katılması ile de arttığı gözlenmiştir (Erenler, 1997).

Meyve esansiyel yağı yağlı cilt, akne, dermatit, sedef hastalığı ve egzama gibi deri ile ilgili problemler için losyon ve keremlere eklenmekte ve kompres olarak kullanılmaktadır (egzama, artit ve genel enfeksiyonlar için). Halk arasında buhar uygulaması (bağımlılık, sinir gerginliği gibi sorunların giderilmesinde yardımcı

olur), masaj yağı veya banyo suyuna ekleme (artrit, idrar yollarında ağrı, eklemlerde şişme, gut ve kas yorgunluğu gibi ağrıyı hafifletmek için) gibi yöntemlerle kullanılmaktadır.

*Juniperus oxycedrus*'un dalları ve odunundan damıtma yöntemi ile ardıç katranı elde edilmektedir. Yağ; reçineli, koyu kahverengi, kostik ve katran benzeri garip bir kokusu bulunmaktadır (Koruk ve ark.,2005). Bu bitkinin eterik yağları, triterpenleri (kuru üzüm sadineni) ve fenoller (guaiaicol ve kresol türevleri) içermektedir. *J.oxycedrus* halk arasında hiperglisemi, obezite, tüberküloz, bronşit ve pnömi gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Ardıç katranın hoş bir aroması bulunmaktadır ve sabun, losyon, krem ve parfüm üretiminde de kullanılmaktadır. Sade esansiyel yağı özellikle egzama, deri iltihabı, sedef hastalığı, saç dökülmesi ve yaşlanma lekeleri, kepek gibi sorunlar için dermatolojik kremler ve merhemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Finike ardıcının toprak üstü kısımları emenagog ve menstrüasyonu kolaylaştırıcı olarak kullanılmıştır (Lemordant ve ark.,1978; Bellakhdar, 1991). Yapraklarından hazırlanan deoksiyon, antidiyabetik ve laksatif olarak kullanılmıştır (Boukef ve ark.,1982; Khalil 1995).

### **Ardıç meyve ve yapraklarından elde edilen ekstratların Modern Tıp'ta kullanımı**

*Juniper* ağaç türlerinin halk arasında hastalıkların tedavisinde kullanımı Tıp'ta bilimsel araştırmaların yapılmasına neden olmuştur. Bello ve ark.,(1997)'ları *Juniperus oxycedrus*'un kuru yaprak ile köklerinin dicloromethanol ve methanol yardımı ile elde edilen ekstratların kan basıncına etkisini araştırmak için farelere 4, 8, 16 ve 48 mg/kg dozlar enjekte edilmiştir. 48 mg/kg dozunda farelerin düşük tansiyona bağlı öldükleri tespit edilmiştir. 4, 8, 16 mg/kg dozlarda ise uygulama miktarına bağlı olarak; sistolik ve diastolik kan basıncını adrenerjik sistemden bağımsız olarak azaldığı görülmüş olup bu etkinin ekstratların içerisinde yer alan sesquiterpenlerin neden olduğu düşünülmüştür.

*Juniperus communis* meyveleri diyabeti tedavi etmek için kullanılmıştır. Ardıç meyvelerinden kaynatma ile elde edilen ekstraktın normoglisemik sıçanlarda 250 mg/kg'lık bir dozda glisemik seviyeyi düşürdüğü saptanmıştır (Achour ve ark., 2011).

Chaouche ve ark (2014)'nın *Juniperus oxycedrus*'un köklerinden metanol ile elde ettikleri ekstratların yapılan analizinde değerli doğal antioksidant olarak kabul edilen proantosiyanidin oligomerleri, kersetin hekzozu, kersitrin ve andisorhamnetin glukozit gibi fenolik bileşiklerce zengin olduğu ve bu antioksidantların farmasötik ve gıda endüstrisinin kullanımı için in vitro koşullarında elde edilebileceği değerlendirilmiştir.

Gülsoy ve Çıvğa (2016) yaptıkları çalışmada olgun diken ardıç (*Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*) kozalaklarında uçucu yağ majör bileşenlerinden monoterpenler sınıfına giren  $\beta$ -mirsen ve  $\alpha$ -pinen bulunduğunu tespit etmiştir.  $\beta$ -mirsen bileşeninin sahip olduğu hoş kokusundan dolayı özellikle parfümeri sanayiinde kullanılabilirliğine yönelik bilgiler mevcuttur (Fahlbusch vd., 2002).

Ayrıca  $\beta$ -mirsen üzerinde farmakolojik olarak analjezik (ağrı kesici), antiinflamatuvar (iltihap önleyici) (Lorenzetti ve ark., 1991) ve yatıştırıcı-sakinleştirici (Do Vale ve ark., 2002) gibi çeşitli etkilere sahiptir.  $\alpha$ -Pinen'in iyi bir bronchodilatör (bronş genişletici) özelliğe sahip olduğu ve bunun yanında antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antimetastatik, apoptosis, alerjik rinit ve antibiyotik etkileri vardır. (Martin ve ark., 1993; Nissen ve ark., 2010; Matsuo ve ark., 2011; Russo, 2011; Bae ve ark., 2012; Donahue ve ark., 2012; Nama ve ark., 2014; Rufino ve ark., 2014). Uçucu yağda bulunan limonen bileşeni beyin tümörünün tedavisi (da Fonseca ve ark., 2011), pankreas kanseri (Nakaizumi ve ark., 1997), mide kanseri (Uedo, 1999), cilt, meme, böbrek ve akciğer kanserleri gibi çeşitli hastalıklarda (Wagner and Elmafda, 2003) etkili olabileceği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra limonen bileşeninin hipolipidemik, antianjiogenik, hipertermi, negatif apoptoz düzenleme ve antioksidan etkilerinin olduğu da ifade edilmiştir (de Saldanha da Gama Fischer ve ark., 2011; Ahmad ve Beg, 2013). Diken ardıç kozalaklarının yüksek oranda sahip olduğu bu sekonder metabolitler farmakolojik olarak önemli olup tıbbi aromatik bitki potansiyeli taşımaktadır.

### ***Juniper* türlerinin toksik etkisi**

*Juniperus communis* L'nin kozalakları, nadiren de odunu ve bunlardan elde edilen uçucu yağları halk arasında; İştah açıcı, antiseptik, antiparazitler ve antiinflamatuvar özellikleri sebebi ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak yüksek dozlarda alınması gastrointesinal sistemde ve böbreklerde tahrişe neden olduğu için dahilen kullanımının azaldığı saptanmıştır. Bu istenmeyen etkilerin yüksek oranda terpen hidrokarbonları ve düşük miktardaki terpenin -4-ol ile bağlantısının bulunduğu tespit edilmiştir (Heinz ve ark.,1993).

*Juniperus* türlerinin yaprak, meyve ve köklerinin gıda, tıp ve kozmetik'te kullanımı günümüzde yaygınlaşmıştır. Özellikle Avrupa ülkelerinde yemek tariflerinde, salam, sosis ve jambon gibi işlenmiş et ürünlerinde kullanımına karşın toksik etkisi de bulunmaktadır. Daha önce sağlıklı olan ve ev yapımı *Juniperus oxycedrus*'un ekstratından bir kaşık kadar yutan bir kişide; ateş, hipotansiyon, böbrek yetmezliği, hepatotokside ve ciltte şiddetli kutanöz yanıklara neden olan bir zehirlenme bildirilmiştir.

Fas'ta yeni doğan bir bebekte, ardıç katranının deri uygulamasından sonra konvülsiyonlar, kolaps, akut pulmoner ödem, böbrek yetmezliği ve hepatotoksisite ile seyreden zehirlenmeye neden olduğu bildirilmiştir (Achour ve ark., 2011).

## SONUÇ

İnsanoğlu hastalıklarının tedavisinde doğadaki bitkilerden yüzyıllar boyunca faydalanmış, elde ettiği bilgileri yeni nesillere aktarmıştır. Halk arasında bu amaçla kullanılan *juniperus* türleri, modern tıp alanında dikkatleri üzerine çekmiştir. Yapılan araştırmalarda; *Juniperus* türlerinin yaprak, gövde ve meyveleri gibi organlarından elde edilen uçucu yağ içeriğindeki monoterpenlerin miktarının dikkate değer miktarda olduğu ve farmakolojik özelliklerinden dolayı tıbbi ve aromatik bitki potansiyeli taşıdığı anlaşılmıştır. Hastalıkları tedavi edici özelliklerinin yanında, toksik etkiye de sahip olabilen *juniperus* türleri ile ilgili araştırma yapılmadan kullanılması ciddi sağlık sorunlarında sebep olacaktır. Tıp alanındaki araştırmalara paralel olarak, doku kültürü uygulamaları ile endüstriyel boyutta üretimi mümkün kılarak doğal ortamındaki ağaçlara zarar vermeden ihtiyaç miktarı kadar ürün elde edilecek ve hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir.

## KAYNAKLAR

- Achour S., Abourazzak S., Mokhtari A., Soulaymani A., Soulaymani R., Hida M., 2011. Juniper tar (cade oil) poisoning in new born after a cutaneous application. BMJ case Rep. doi:10.1136/ber.07.2011.4427
- Acartürk R., 1996 Şifalı bitkiler flora ve sağlığımız. OGM Mensupları Y.Vakfı Yayınları, No:1 Ankara.
- Ahmad, S., Beg, Z.H., 2013. Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. Original Research Article Food Chemistry, 138: 1116-1124.
- Bae, G.S., Park, K.C., Choi, S.B., Jo, I.J., Choi, M.O., Hong, S.H., Song, K., Song, H.J., Park, S.J., 2012. Protective effects of alpha pinene in mice with cerulean-induced acute pancreatitis. L. Sciences, 91:866-871.
- Bello R., Moreno L., Beltran B., Primo-Yufera E., Espugues J. 1997. Effects on Arterial Blood Pressure of Methanol and Dichloromethanol Extracts from *Juniperus oxycedrus* L. Phytotherapy Res. Vol.11, 161-162.
- Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. and Younos C., 1991. Reportory of Standart Herbal Drugs in The Moroccan Pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology 35., page 123-141.
- Boukef K., Soussi H.R. and Balansard G. 1982 Contribution to the Study on Plants Used in Traditional Medicine in Tunisia. Fitoterapia- Elsevier Science Publisher -16, pages 260-279.
- Chaouche T.M., Haddouchi F., Bekara F.A., Ksouri R., Azzi R., Boucherit Z., Tefiani C., Larbat R. 2015 *Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MS characterization of phenolic compounds from root bark of Juniperus oxycedrus subsp. Oxycedrus*. Industrial Crops and Products., volume 64., p 182-187.
- De Saldanha da Gama Fischer, J., Costa Carvalho, P., da Fonseca, C.O., Liao, L., Degrave, W.M., da Gloria da Costa Carvalho, M., Yates, J.R., Domont, G.B., 2011. Chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. Proteomics Research Journal, 10 (1):153-160.
- Do Vale, T.G., Couto Furtado, E.C., Santos, J.G., Viana, G.S., 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. Phytomedicine. International Journal of Phytotherapy And Phytopharmacology, 9 (8):709-714.
- Donahue, N.M., Henry, K.M., Mentel, T.F., Kiendler-Scharr, A., Spindler, C., Bohn, B., Brauers, T., Dorn, H.P., Fuchs, H., Tillmann, R., Wahner, A., Saathoff, H., Naumann, K.H., Mohler, O., Leisner, T., Müller, L., Reinnig, M.C., Hoffmann, T., Salo, K., Hallquist, M., Frosch, M., Bilde, M., Tritscher, T., Barmet, P., Praplan, A.P., DeCarlo, P.F., Dommen, J., Prevot, A.S.H., Baltensperger, U., 2012. Aging of biogenic secondary organic aerosol via gas-phase OH radical reactions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(34): 13503-13508.
- Da Fonseca, C.O., Simao, M., Lins, I.R., Caetano, R.O., Futuro, D., Quirico-Santos, T., 2011. Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. Journal of cancer research and clinical oncology, 137(2):287-293.
- Erenler, R. 1997 Yüksek Ardıç (*Juniperus excelsa* Bieb.)'ın Meyvelerindeki Bileşiklerin İzolasyonu, Yapı Tayini ve Aktivite Testleri, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi.
- Fahlbusch, K.G., Hammerschmidt, F.J., Panten, J., Pickenhagen, W., Schatkowski, D., Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2002. Flavors and Fragrances, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Wiley-VCH.
- Gülsoy S., Çivça A., 2016 Diken ardıç (*Juniperus oxycedrus* L. subsp. oxy) kozalaklarının uçucu yağ özellik ve çevresel faktörlerle ilişkileri., Türkiye Ormanlık Dergisi 17(2): sayfa 142-152.

- Heinz S., Dagmar E. and Christel K., 1993 Gazchromatographic Comparison of Commercially Available Juniper Oils and Their Toxicological Evaluation. 35.Quality Control and Phytopharmacologica Value Determination and Suggestion for it Standartdization.PZ Wiss. 6,85-9.
- Khalil S.,1995 A survey of plant used in Jordanian Traditional Medicine. İnt J.Pharmacognosy.33,pages 317-323
- Kayacık H., 1980. Orman Park ve Ağaçları Özel Sistematiği. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayın No:281, Cilt :1 İstanbul.
- Koruk ST., Ozyılkan E., Kaya P., Colak D., Donderici O., Cesaretli Y.2005 Juniper tarpoising.Clin Toxicol (Phila), 43: 47-49.
- Leung A.Y., Foster S., 1996 Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics, 2nd ed., John Wiley & Sons, Newyork, USA.
- Lemordant D., Boukef K. and Bensalem M.,1978. Toxic and Useful Plants of Tunusia.Fitoterapia-Elsiver Science Publisher-48, page 191.
- Lorenzetti, B.B., Souza, G.R.E.P., Sarti, S.L.J., Santos Filho, D., Ferreira, S.R.H., 1991. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. Journal of Ethnopharmacology, 34(1): 43–48.
- Martin, S., Padilla, E., Ocete, M.A., Galvez, J., Jimmenez, J., Zarzuelo, A., 1993. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum fruticosens*. *Planta Medica*, 59: 533–536.
- Matsuo, A.L., Figueiredo, C.R., Arruda, D.C., Pereira, F.V., Scutti, J.A., Massaoka, M.H., Travassosa, L.R., Sartorellib, P., Lagob J.H.G., 2011.  $\alpha$ - Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29: 411–54.
- Nama, S.Y., Chungb, C., Seoc, J.H., Rahd, S.Y., Kima, H.M., Jeong, H.J., 2014. The therapeutic efficacy of  $\alpha$ -pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. *International Immunopharmacology*, 23:273–282.
- Nakaizumi, A., Baba, M., Uehara, H., Iishi, H., Tatsuta, M., 1997. d-Limonene inhibits N-nitrosobis(2-oxopropyl) amine induced hamster pancreatic carcinogenesis. *Cancer letters*, 117(1):99-103.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., Monti, A., 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5):413-419.
- Poddar S., and Lederer RJ. 1982. Juniper berries as an exclusive winter forage for townsend’s solitaries. *The American Midland Naturalist*, 108(1):34-40.
- Russo, E.B., 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7): 1344–1364.
- Rufino, A.T., Ribeiro, M., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Mendes, A.F., 2014. Antiinflammatory and chondroprotective activity of (+)- $\alpha$ -Pinene: structural and enantiomeric selectivity. *Journal of Natural Products*, 77:264–269.
- Topçu G., Erenler R., Çakmak O., Johansson C.B., Çelik C., Chai H., Pezzuto J.M., 1999.Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*. *Pythochemistry*, 49: 1195-1199.
- Tümen I., Süntar I., Keleş H., Küpeli A.E. 2012 .A terapeutic approach for wound healing by using essential oil of cupressus and *Juniperus* species growing in Turkey. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine <http://dx.doi.org/10.1155/2012/728281>
- Tümen İ., Hafızoğlu H., 2003. “Türkiye’de yetişen ardıç (*Juniperus* L.) türlerinin kozalak ve yaprak uçucu yağlarının birleşiminde bulunan terpen grupları”, ZKÜ Bartın Orman Fakültesi yayınları Cilt:5, Sayı:5.
- Uedo, N., Tatsuma, M., Iishi, H., Baba, M., Sakai, N., Yano, H., Otani, T., 1999. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N’-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Letters*, 137:131-136.
- Ünver A. A , Akgül C. , Badayman M. , Dinçel E. 2018 Ardıç Meyve ve Yağının Kullanım Alanları. *Aydın Gastronomy*,2 (2):45-60.
- Wagner, K., Elmafda, I., 2003. Biological relevance of terpenoids-overview focusing on monodi- and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 47: 95-106.

## Amerikan sarmaşığı (*Parthenocissus quinquefolia* L.) çeliklerinin köklenme başarısı üzerinde bazı ön işlemlerin etkisi

Erol Kırdar, Halil Barış Özel\*

Bartın Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Bartın, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: halilbarisozel@gmail.com

### Özet

Endüstrileşmiş ve nüfusun yoğun olduğu yaşam alanlarında toplumu meydana getiren en önemli öge olan insanların biyolojik ve psikolojik sağlıklarının korunmasında bitkilerin rahatlatıcı etkisinin önemli bir rolü bulunmaktadır. Bu nedenle iş hayatının ve yaşam mücadelesinin yoğun olduğu büyük şehirlerde en etkili peyzaj teknikleri kullanılarak görsel ve rekreatif açıdan çok etkili olan peyzaj uygulamalarının yapılarak yeni parklara ve çevresel düzenlemelere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu anlamda özellikle hızlı gelişen ve beton yapıların soğuk ve olumsuz etkilerini ortadan kaldıran yayılcı türlerin kullanılması gerekmektedir. Bu türlerin başında sarmaşıklar gelmektedir. Bu araştırmada da ülkemizde park, bahçe ve diğer mekan düzenlemelerinde yaygın olarak Amerikan Sarmaşığı (*Parthenocissus quinquefolia* L.) türünün sert gövde çelikleriyle üretilmesi sürecinde, çeliklerin köklenme başarısı üzerine ön işlemlerde kullanılan bazı biyokimyasal bileşenlerin etkisi incelenmiştir. Gökçebey Orman Fidanlığında gerçekleştirilen bu araştırmada; alınan Amerikan Sarmaşığı gövde çeliklerine 1- 24 saat 400 mg/l Baikal EM1, 2- 24 saat 400 mg/l Biohumus, 3- 24 saat Baikal EM1 + Biohumus, 4- 2saat 350mg/l Indolobütirik Asit (IBA) ve hiçbir ön işlemin uygulanmadığı kontrol olmak üzere 5 farklı uygulama gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamaların gerçekleştirildiği çeliklerde tespit edilen köklenme yüzdesi sonuçlarına uygulanan varyans analizinden elde edilen bulgulara göre, ön işlemler arasında P<0,01 güven düzeyinde istatistiki açıdan anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu kapsamda ön işlemleri gruplandırmak amacıyla gerçekleştirilen Duncan testi sonucunda %82,6 köklenme yüzdesi ile 3. ve %79,8 köklenme yüzdesi ile 4.ön işlemler birinci grupta yer alırken, %61,4 köklenme yüzdesi ile 2. ön işlem ikinci grupta, %58,7 köklenme yüzdesi ile 1. ön işlem üçüncü grupta ve kontrol grubu da %12,5 köklenme yüzdesi dördüncü grupta sıralanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ön İşlemler, Çelik, Amerikan Sarmaşığı, Peyzaj, Köklenme Yüzdesi

### The effect of some pretreatments on the rooting success of American ivy (*Parthenocissus quinquefolia* L.) cuttings

#### Abstract

The relaxing effect of plants has an important role in the protection of the biological and psychological health of the people who constitute the society in the industrialized and densely populated areas. For this reason, the most effective landscape techniques are used in the big cities where the business life and life struggle is intense, and landscape and landscaping practices are needed to make new parks and environmental arrangements. In this sense, it is necessary to use spreading species which develops rapidly and eliminates the cold and negative effects of concrete structures. There are vines at the beginning of these species. In this research, the effect of some biochemical components used in pretreatment on the success of rooting of cuttings in the process of production of American Ivy (*Parthenocissus quinquefolia* L.) species with hard body steel was investigated. In this research carried out in Gökçebey Forest Nursery; taken to 1- 24 hours 400 mg / l Baikal EM1, 2- 24 hours 400 mg / l Biohumus, 3- 24 hours Baikal EM1 + Biohumus, 4- 2 hours 350mg / l Indole 3 butyric acid (IBA) and no pretreatment 5 different applications were carried out. According to the results obtained from the variance analysis applied to the percentages of rooting determined in the steels where these applications were performed, a statistically significant difference was found in P <0.01 confidence level between the pretreatments. As a result of the Duncan test performed in order to group pretreatments in this scope, 82.6% of the rooting percentage was 3. and 79.8% of the rooting percentage were in the first group. In the first group of rats with a rate of 58.7% and in the third group and 12.5% in the control group rooting percentage were listed in the fourth group.

**Keywords:** Pretreatments, Cutting, American Ivy, Landscape, Rooting Percentage

## GİRİŞ

İnsanoğlunun ve toplumların talepleri her dönem değişmekle birlikte istenilen ve beklenen tek ortak istek sağlıklı, mutlu ve temiz bir çevreye sahip olmaktır. Doğal kaynakların sürekli olarak başta enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla aşırı tahripkar kullanımı, tüm doğal yaşam şartlarını bozmuş, doğal popülasyon dengelerini, ekolojilerini ve ekosistemlerini geri dönülemeyecek düzeyde tahrip etmiştir. Büyük kentler ya da yerleşim alanları ne kadar çevrelerinde yeşil kuşak alanlara veya kent ormanlarına sahip olsalar da yeşil ve temiz havanın sağladığı faydalardan yeterince yararlanılması mümkün olmamaktadır. Betonlaşma şehir merkezlerinde çok yüksek değerlere ulaşan sıcaklık adalarının meydana gelmesine neden olarak temiz ve rahatlatıcı hava akımlarının önüne geçmekte ve kentleri yaşanamaz kötü koşullara sahip alanlara dönüştürmektedir. Bitkiler ve orman kaynakları her zaman olduğu gibi insanlığın yararına hareket ederek bu olumsuz tablonun değişmesinde vazgeçilemez bir unsur ve kurtarıcı faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Çünkü yaşamın nimetlerini ve dengesini içinde barındıran ormanlar ve ev sahipliği yaptığı bitkiler, hayvanlar ve diğer unsurlar her zaman insanlığın yararına sergiledikleri koruyucu fonksiyonel faydaları her koşulda devam ettirmektedir (Ürgenç, 1998). Ancak tüm kaynaklarda olduğu gibi ormanlar üzerinde de yoğunlaşan ağır baskılar ve yararlanmalar, biyotik ve abiyotik zararlı unsurların meydana getirdiği zararlar, yangınlar ve maden işletmeleri bu önemli kaynağın da bitme noktasına gelmesine neden olmuştur. Günümüzde Türkiye orman varlığının hızla artarak 22,7 milyon ha' ulaştığı vurgulansa da (OGM, 2016), kalite ve kantite yönünden il bazında değerlendirildiğinde bazı illerimizde orman varlığının çok ciddi düzeyde gerilediği ortaya çıkmıştır (FAO, 2015).

Bu bilgiler ışığında özellikle büyük kent merkezlerinde daha zararlı ısı adacıklarının oluşmasının önüne geçmek amacıyla bitkisel tasarımları üst düzeyde gerçekleştirilmiş ve tamamen yeşil yapılaşmanın güzel örneklerini teşkil eden tesislerin kurulması ve restorasyon çalışmalarında kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla, hızlı gelişen ve yoğun yaprak biyokütlesi ile taş ve duvar mekanları kapatan bitkisel örneklerden oluşan yeşil yapıların ve sürdürülebilir inşaat tekniklerinin kullanılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Hızlı gelişen ve tırmanıcı özelliği olan türlerin başında da Amerikan Sarmaşığı (*Parthenocissus quinquefolia* L.) gelmektedir. Ancak vejetatif olarak genellikle gövde çeliklerinden üretilen bu türde çeliklerin köklenme başarısında bazı stres faktörlerine bağlı olarak çok önemli sorunlar yaşanmakta ve düşük köklenme başarısı değerleri elde edilmektedir.

Bu araştırmada da, uygulanan bazı biyokimyasal ön işlemler ile Amerikan sarmaşığı türündeki çelik köklenme başarısının üst düzeylere çıkarılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Amerikan sarmaşığı, peyzaj çalışmalarında yaygın olarak kullanılan tırmanıcı ve yayılcı özelliği yaygın olan bir türdür. Bu nedenle peyzaj çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir. Bu araştırmada orman sarmaşığının Oregon orijinli dal çelikleri kullanılmıştır.

### Metot

Araştırmada çelikler, 2018 yılı Nisan ayının son haftasında alınmıştır. Çelikler alınırken sağlıklı dallar seçilmiş ve 12 cm uzunluğunda ve 0,7cm kalınlığında alınmıştır.

Ortetlerin sağlıklı dallarından alınan çelikler laboratuvar ortamına getirilerek güneş görmeyen ve serin ortamda (4°C) 2 hafta saklandıktan sonra Tablo 1'de gösterilen ön işlemler uygulandıktan sonra, üretim ortamları olan sera koşullarına aktarılmıştır (Şekil 2). Araştırma kapsamında Amerikan sarmaşığı çeliklerine tüm öne işlemler 3 tekrarlı olarak uygulanmış ve her bir replikasyonda 20 adet taze dal çeliği kullanılmıştır.





Şekil 1. Amerikan Sarsığı Çelikleri

Tablo 1. Amerikan Sarsığı Çeliklerine Uygulanan Bazı Ön İşlemler

Ön İşlemler	Örnekleme Miktarı (adet)
1. 24 saat 400 mg/l BAIKAL-EM1	60 adet çelik
2. 24 saat 400 mg/l BIOHUMUS	60 adet çelik
3. 24 saat 375 mg/l Baikal EM1 + Biohumus	60 adet çelik
4. 2 saat 350mg/l Indulobütrik Asit (IBA)	60 adet çelik
5. Kontrol	60 adet çelik



Şekil 2. Çeliklerin Sera Koşullarına Aktarılması

### İstatistik Analizler

Araştırmada dal çeliklerine uygulanan ön işlemlerin ve kontrol numunesi arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve gruplandırmalarda da Duncan testi uygulanmıştır. Bu analizlerin gerçekleştirilmesinde SPSS paket istatistik programından yararlanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Amerikan sarmaşığı türünde alınan taze dal çeliklerinde köklenme başarısını artırmak amacıyla bazı biyokimyasal ön işlemlerin gerçekleştirildiği bu çalışmada, köklenme yüzdesi yönünde taze dal çeliklerine uygulanan ön işlemlere ait tek yönlü Varyans Analizi ve  $P<0,05$  güven düzeyinde gerçekleştirilen Duncan testi sonuçları Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Amerikan Sarmaşığı Çeliklerinin Köklenme Yüzdesi Değişkeni Yönünden Ön İşlemler itibarıyla Varyans Analizi ve Duncan Testi Sonuçları

Ön İşlemler	$P<0,01$ Köklenme Yüzdesi (%)
1. 24 saat 400 mg/l Baikal-EM1	58,7 <sup>c</sup>
2. 24 saat 400 mg/l Biohumus	61,4 <sup>b</sup>
3. 24 saat 375 mg/l Baikal EM1 + Biohumus	82,6 <sup>a</sup>
4. 2 saat 350mg/l Indulobütrik Asit (IBA)	79,8 <sup>a</sup>
5. Kontrol	22,3 <sup>d</sup>

a, b ve c: Farklı harfler, farklı grupları göstermektedir ( $P<0,05$ )

Tablo 2’de yer alan veriler incelendiğinde, taze dal çeliklerine uygulanan tek yönlü varyans analizi sonucunda ön işlemler arasında çeliklerin köklenme yüzdesi değişkeni yönünden  $P<0.01$  güven düzeyinde istatistiki açıdan anlamlı farklılığın olduğu belirlenmiştir. Bu kapsamda gruplandırmaları yapmak için  $P<0.05$  güven düzeyinde uygulanan Duncan testi sonuçlarına göre; en yüksek köklenme yüzdesi sırasıyla %82,6 ve %79,8 ile 3. ve 4. ön işlemlerde elde edilmiştir. Bu ön işlemleri sırasıyla %61,4 ile 2. Ön İşlem ve %58,7 ile 1. Ön İşlem takip etmiştir. Aynı türde yapılan bir başka çalışmada da özellikle köklenmeyi destekleyecek biyokimyasal sentezlemeye sahip maddeler içeren indulobütrik asit ve benzer karbon zincirlerine sahip doğal solüsyon maddelerin büyüme, fotosentez ve köklenmede %93,4’e varan sonuçlar elde edilmesini sağladığı bildirilmektedir (Li ve ark., 2000). Bu konuda yapılan bir başka çalışmada da özellikle hızlı gelişen Amerikan sarmaşığı ve orman sarmaşığı çeliklerine uygulanan biyokimyasal ön işlemlerin türün ışık alma periyodunu uzatarak önemli büyüme farklılıkları meydana getirdiği tespit edilmiştir (Yeh ve Hsu, 2004). Bu karşılaştırmalı bulgular ışığında Baikal EM1 + Biohumus kombinasyonu ile Indulobütrik asit (IBA) uygulamalarının Amerikan sarmaşığı çeliklerinde köklenme başarısını önemli ölçüde pozitif yönde etkilediğini söylemek mümkündür.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen bulgular ışığında özellikle kent merkezlerinde yapılan geniş yüzey alanına sahip beton yüzeylerin ve kent parklarının düzenlenmesinde ve toplum yaşamı için olumsuz ısı adacıklarının oluşumunun engellenmesinde yapılacak bitkisel modern tasarımlarda ve uygulamalarda kullanılabilecek türlerden birisi olan Amerikan sarmaşığı çeliklerinin köklenmesinde bitki fizyolojisini hızlandıran, koruyan ve fotosentez aktivitesini artırarak büyümeyi ve köklenmeyi güçlendiren Baikal EM1 ve Biohumus kombinasyonunun 375mg/l ve Indulobütrik asit (IBA) uygulamasının 350 mg/l düzeylerinde uygulanmasının, köklenme yüzdesi düşük olan çeliklerin başarıyla köklenmesi açısından oldukça etkili olduğunu söylemek mümkündür. Bu nedenle söz konusu ön işlemler ile muamele edilecek olan çeliklerin kent merkezlerindeki yüzey kaplama çalışmalarında yüksek ve düşük sıcaklık koşullarına daha iyi adapte olabileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yardımlarını bizlerden esirgemeyen Orman Genel Müdürlüğüne, Zonguldak Orman Bölge Müdürlüğüne ve Gökçebey Orman Fidanlık Müdürlüğüne teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

- FAO, 2015. Global Forest Resources Assessment 2015 Country Report (Turkey), 104 p., Rome.
- Li, J. H., Gale, J., Volokita, M., Sinai, T. And Novoplansky, A. 2000. Effect of leaf variegation on acclimation of photosynthesis and growth response to elevated ambient CO<sub>2</sub>. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **75**, 679–83.
- OGM, 2016. Türkiye Orman Varlığı, Ankara. 23 s.
- Yeh, D. M., Hsu, P. Y. 2004. Heat tolerance in English ivy as measured by an electrolyte leakage technique. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **79**, 298–302.
- Ürgeç, S. 1998. Ağaç ve Süs Bitkileri Fidanlık ve Yetiştirme Tekniği, İ.Ü Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 3395/442, İstanbul, 717 s.

DRAFT

## Silolanan ürünlerdeki mikotoksinlerin hayvanlarda verim ve sağlık üzerine etkileri

Ekin Sucu\*, Ahmet Okumuş, Emrah Gülgün

Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ekins@uludag.edu.tr

### Özet

Küfler her yerdedir ve 80'den fazla farklı küf türü mısır ve çayır silajında tanımlanmıştır. Silaj, silajın mikroaerobik ve asidik koşullarına uyum sağlayan küfler tarafından istila edilir. Yüksek sıcaklık silolanan ürünlerde aside toleranslı olan maya ve küflerin büyümesini teşvik eder. Penicillium küfleri; asidik ortama toleranslı ve oksijen ihtiyacı da düşük olduğundan silajlarda yaygın olarak gözlenir. Küfler çevresel koşullara bağlı olarak mikotoksinler üretebilirler. Silajda küflerin ve toksinlerin oluşumları, dağılım ve yayılma dereceleri oldukça değişkendir. Küflerin silajda çoğalmaları düzensiz olmakla birlikte, büyümeleri ve stabiliteyi de değişkenlik göstermektedir. Penicillium roqueforti silajı istila edebilme yeteneği ile küf istilasının bir göstergesidir. Silajı bozar ve giderek artan ısınmaya neden olur ki bu da diğer olası patojenik mikroorganizmalar için ortam hazırlar. Bozulmuş silajlarda toksin üretici küfler ve mayalar (Monascus ruber, Aspergillus fumigatus, Byssoschlamys spp.) potansiyel olarak Listeria monocytogenes ve Clostridia butyricum gibi patojenik bakteriler ile birlikte bulunabilirler. P. roqueforti ve A. Fumigatus antimikrobiyal ya da bağışıklığı baskılayıcı etkileri olan sekonder (ikincil) mikotoksinleri üretirler. Toksinlerin bu düzensiz ve geçici dağılımları alınan örneklerdeki mikotoksin teşhisini zorlaştırmaktadır. Bu derlemede, silajda yaygın gözlenen küf ve mikotoksinleri tanımlanmış olup, etki mekanizmaları ile hayvanlarda korunma ve tedavi önerileri üzerinde durulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** küfler, mikotoksinler, silaj, sağlık, verim

### The effects of micotoxins in silage on animal production and health

#### Abstract

Molds are everywhere and more than 80 different types of molds have been identified in maize and meadow silage. Silage is invaded by molds that are compatible with the microaerobic and acidic conditions of the silage. It promotes the growth of yeasts and molds that are acid-tolerant in high temperature silos. Penicillium molds; It is widely observed in silages since it is tolerant to acidic environment and low oxygen demand. Molds can produce mycotoxins depending on environmental conditions. The formation, distribution and spreading degrees of molds and toxins in silage are highly variable. Although the proliferation of molds in silage is irregular, their growth and stability also varies. Penicillium roqueforti is an indication of mold infestation with its ability to invade the silage. It disrupts silage and causes increased heating, which prepares the environment for other possible pathogenic microorganisms. Toxin-producing molds and yeasts (Monascus ruber, Aspergillus fumigatus, Byssoschlamys spp.) In degraded silages can potentially be associated with pathogenic bacteria such as Listeria monocytogenes and Clostridia butyricum. P. roqueforti and A. Fumigatus produce secondary (secondary) mycotoxins with antimicrobial or immunosuppressive effects. These irregular and transient distributions of toxins make the diagnosis of mycotoxins difficult. In this review, the common mold and mycotoxins, which are commonly observed in silage, have been described, and the mechanisms of action and the protection and treatment recommendations in animals have been emphasized.

**Keywords:** molds, mycotoxins, silage, health, yield

### GİRİŞ

Mikotoksinler; düşük yem tüketimi, süt üretimi, hastalıkları, üreme problemleri ve çiftlik hayvanlarında ölüme neden olabilecek 100'ün üzerinde farklı küf tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. Belirli tip mikotoksinler, çiftlik hayvanlarının rasyonlarından süt ürünlerine geçebilir ve bundan dolayı besin güvenliğinde tehlikeli olabilirler. Mikotoksinler, karsinojenik, mutajenik (mutasyona neden olan etki), immünotoksik, östrojenik, teratojenik (embriyotoksik ya da fetotoksik ajan) veya nörotoksik olabilirler (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Mikotoksinler, yemle alınan besinlerin içeriğini, emilimi ve metabolizmayı etkileyerek, enzim, hormon ve nöroendokrin fonksiyonlarını değiştirir ve bağışık sistemini baskılayarak etkisini gösterirler (CAST, 1989).

Hayvanlarda görülen hastalıkların bazısına mikosis olarak adlandırılan küfler doğrudan neden olurken, bazılarında ise mikotoksikozlar olan mikotoksinler neden olur (CAST, 1989).

Mikotoksikozların teşhisi zordur. Teşhislerini zorlaştıran unsurlar arasında; yemleri temsil edici şekilde örneklemede yaşanan zorluklar, hastalık vakalarında mikotoksinlerin rolleri ile ilgili sınırlı bilginin bulunması, mikotoksin kaynaklı hastalık belirtileri ile diğer patojenlerin hastalık belirtileri arasındaki benzerlikler, mikotoksinler arasındaki etkileşimler, mikotoksin analizinin masraflı ve karmaşık oluşu sayılabilir (Whitlow, 1993).

Aşağıdaki durumların dışında hastalığa mikotoksinlerin neden olduğu düşünülmemektedir:

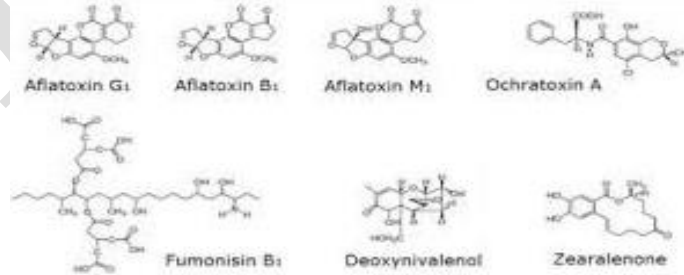
- 1) Hastalığın yemlerle bağlantılı olması durumunda,
- 2) Hastalık, bulaşıcı ve aktarılabılır veya enfeksiyonla ilgili olmadığında,
- 3) Hastalık, bir patojenik mikroorganizmayla bağlantılı değilse,
- 4) Hastalık, terapötik ilaçlar ve antibiyotiklerle tedaviye cevap vermezse,
- 5) Besin analiziyle hastalığa neden olan mikotoksinlerin varlığı doğrulanırsa,
- 6) Kontamine olmuş yem geri çekildiği zaman hastalığın belirtileri yok olması durumlarının dışında hastalığa mikotoksinlerin neden olduğu düşünülmemektedir (Robb, 1990).

Küfler; sıcak, rutubetli ve karanlık ortamlarda üreyen bir mantar türüdür. Küfler farklı renklerde olurlar (Şekil 1); fakat küfün rengi veya istilası mikotoksin bulaşma türü ve düzeyini göstermez; mikotoksinler küfler görünmez olsalar bile var olabilirler. Bununla birlikte, olası mikotoksinlerin varlığından dolayı ve besin değeri çoktan kaybolduğu için görsel olarak küflü yemler hayvanlara verilmemelidir. Küfler oksijen varlığında çoğalırlar, bundan dolayı mikotoksin üretimi bitkilerin gelişmesi sırasında veya hava alan silajlarda ve depolama aşaması sırasında oluşabilir. Silaj yapımında yapılan hatalar; örneğin hasadın, doldurmanın ve kapatmanın geciktirilmesi, yetersiz sıkıştırma, yavaş yemleme oranı, paket silajlarda paketlerin birleştirilmesi, zarar görmüş plastik örtü gibi unsurlar yani oksijen varlığını sağlayan mikro-iklim yaratan koşullar, küf çoğalmasını ve fazla miktarda mikotoksin üretilmesine neden olur (Whitlow, 1993).



Şekil 1. Bozulmuş silajlarda küf oluşumunun görünümü

Kaba yemlerdeki en yaygın mikotoksinler; aflotoksin, deoksinivalenol (DON), zearalenon (ZEN), T-2 toksini ve fumonisindir (Şekil 2). Bu mikotoksinler; ılık ve nemli koşullarda gelişen *Aspergillus* küfleri veya nemli, su içeriği yüksek, serin koşullarda gelişen *Penicillium* ve *Fusarium* küfleri tarafından üretilirler. *Fusarium* ılıman ve nemli iklimlerde yetişen mısır bitkisinin dane, somak ve başak püskülünde yaygın olarak bulunur. Küf gelişimi ve mikotoksin üretimini önceden hazırlayan diğer faktörler; böcek, kemirgen, yağmur, dolu, sel ve kuraklıktır. Bu faktörler mikotoksin üreten mantar sporlarının gelişmesi için başlangıç oluşturur. Kaba yemleri en fazla tüketen çiftlik hayvanlarından ruminantlar, rumendeki detoksifikasyondan dolayı bazı mikotoksine daha dayanıklıdır (Seglar, 2001). Buna karşın, günümüzün yüksek verimli süt sığırlarında yemlerin rumenden geçiş hızının yüksek olması rumenin detoksifik etkisini düşürebilir (Seglar, 2001). Genel olarak, döngüsel lakton halkasına zincirine sahip olan mikotoksinler rumende hidrolize olurlar.



Şekil 2. Kaba yemlerde yaygın bulunan mikotoksinlerin kimyasal yapıları

Aşağıdaki bölüm küf kaynaklarına dayalı olarak mikotoksinleri sınıflamakta ve onların çiftlik hayvanları üzerindeki olumsuz etkilerini, yemdeki toksik düzeylerini, silaj ve hayvanlardaki bilinen etkilerini özetlemektedir.

## **Aspergillus Toksinler**

### **Aflatoksinler**

Aflatoksinler kaba yemlerde en yaygın görülen ve en tesirli olan mikotoksinlerdir. Onların üretimi nem, sıcaklık, böcek zararı ve kuraklık stresinde artar (DeWolf ve ark., 2005). Bu kansorejenik toksinler, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* ve *A. fumigatus* gibi toprak kaynaklı küfler tarafından üretilir. Aflatoksinlerin etkileri arasında yem tüketiminde azalma (iştahsızlık), rumen fonksiyonlarında bozulma, karaciğer hasarı, tüylerde kabalaşma, kanın pıhtılaşmasında gecikme ve bağışıklık sisteminde bozulma gibi belirtiler sayılabilir (Deikman ve Green, 1992). Aflatoksinler ultraviyole ışın altında bakıldığında yeşil veya mavi olarak sınıflandırılır. Aflatoksinler lakton zincirine sahip değildir, rumende az çözünür ve düşük konsantrasyonları bile rumen bakteriyel gelişimini etkileyebilir (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). En toksik ve yaygın olanı B1'dir ve aflatoksin M1 olarak sütte salgılanır. Süt M1 konsantrasyonu rasyon kuru maddesindeki aflatoksin B1 konsantrasyonunun genellikle %1.7'sidir (Whitlow, 2005). 100 ppb'nin üzerindeki B1 düzeyleri süt sığırlarında verimi olumsuz etkiler ve et sığırlarında böbreklerde hasara neden olabilir (Garett ve ark., 1968; Whitlow, 2005). Aflatoksin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından önlem alınmasını gerektiren tek mikotoksin olarak kabul edilmiştir. Aflatoksinlerin sınır değeri yemde 20 ppb ve sütte 0.5 ppb olarak belirlenmiştir (FDA).

Hayvanlardaki mikotoksikozislerin etiyolojisindeki rolleri anlaşılmayan diğer etkili *Aspergillus* mikotoksinleri şunları içerir: Güneydoğu Amerika'da yapılan silajlarda yaygın olarak gözlenen *A. fumigatus* ailesinden olan fumitremorginlerden örneğin A ve B; anoreksiya, ishal, verim kaybı, sinirliliğe neden olur (Cole ve ark., 1977, cited by Whitlow, 1993). Bunlar tremorgan olarak da adlandırılır. Çünkü nörotoksik olduklarından titremeye neden olurlar. *A. versicolor* tarafından üretilen Sterigmatisin sığırlarda kanlı ishal ve ölüme neden olur (Whitlow ve Hagger, 2004). *A. fumigatus* ve bazı *penicillium* küfleri tarafından üretilen gliotoksin, süt sığırlarında sindirim sistemi bozukluğuna ve hemorajik bağırsak sendromuna neden olur.

### **Fusarium Toksinler**

Fusarium mikotoksinleri bitkileri tarlada istila eden ve silolama sırasında yaşayabilen çeşitli toksinleri içerir. Onlar *F. sporotrichiodes* ve *F. graminearum*'u içeren değişik mantarlar tarafından üretilen yaklaşık 150, yapısal olarak ilişkili, bileşiği olan trikotesenleri içerir. Diacetoxyscirpenol (DAS), nivolenol, neosolanol ve hidroksil T2'de olmasına rağmen silajda üretilen en tehlikeli trikotesenlerin bazıları deoksinivalenol ve T2 toksindir.

### **Deoksinivalenol (DON)**

Vomitoksin olarak da bilinen DON, kaba yemlerde en yaygın bulunan mikotoksinlerden biridir ve sıklıkla diğer mikotoksinlerle birlikte üretilir. Genelde de mikotoksinlerin varlığının markeri (işaretçisi) olarak kullanılır. Soğuk ve ıslak bir dönemi kısa ve kuru bir dönem takip ettiğinde *Fusarium roseum* ya da *graminearum* (*Gibberella zeae*) tarafından üretilirler (Diekman ve Green, 1992). Nemli koşullar, ılık gündüz ve serin gecelere aynı zamanda denk geldiğinde yaygın görülürler. Hastalık belirtileri; yem tüketiminde azalma, süt üretiminde düşme, kusma, bağışıklık sisteminin baskılanması, bağışıklığın aşırı uyarılması, ishal, üremede sorunlar, aşırı kilo kaybı ve ölümdür (Whitlow, 1993; Rotter ve ark., 1996). Deoksinivalenol, vücutta protein sentezini engeller, serotonin üretimindeki beyin kimyasallarını içerir (Rotter ve ark., 1996). Deoksinivalenol, rumende çok daha az zararlı ürünlere dönüştürülür. Esas olarak idrarla atılır ve süte transferi düşük düzeydedir (Cote ve ark., 1986 ve Prelusky ve ark., 1984; Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), DON düzeyinin insan tüketimine sunulan buğdayda 1 ppm, sığır yemlerinde kullanılan danelerde 5-10 ppm, gıda işleme artıklarında %50 olarak önermektedir. Et sığırlarının 20 ppm'lik DON düzeyini tolere ettikleri gözlenmiştir. Buna karşın, düşük DON düzeylerinin (2-6 ppm) süt sığırlarında süt üretimindeki etkileri henüz netlik kazanmamıştır.

### **Zearalenon (ZEN)**

Zearalenon; *F. graminearum* ve *F. sporotrichiodes* tarafından üretilen östrojen benzeri bir bileşiktir. 11-27 °C ortam sıcaklığı ve nemli koşullarda üretimleri artar (De Wolf ve ark., 2005). Östrojene yapısal benzerliği ve hormonu taklit etme yeteneğinden dolayı ZEN; kısırılığa, uzayan östrusa, düşük döl tutma oranına, doğurganlığın düşmesine, rektal ya da vajinal prolapsusa, sakat yavruya, düşüğe neden olur (Mirocha ve Christensen, 1974; Whitlow, 1993). ZEN'e bağlı diğer belirtiler ise süt veriminde düşme, yem tüketimde azalma ve ishaldir.

Zearalenon'un yaklaşık 3'te biri rumende çözümlenebilir durumdadır. Bununla birlikte ZEN metabolitleri ana toxinden daha toksik olabilir. Yemin içerdiği ZEN'in %0.06'sı oranında süte geçtiği tespit edilmiştir. 21 gün

boyunca günlük 544 mg ZEN tüketildiğinde ise bu oranının %0.6'sının süte geçtiği de bildirilmiştir. Daha yüksek tek dozların sindirimi süte geçişin daha düşük düzeyde olduğunu göstermiştir (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). 12-50 ppm oranında ZEN miktarı dışı düvelerin ve süt sığırlarının döl tutma oranını düşürebilir (DeWolf ve ark., 2005).

### **Fumonisinler**

Son zamanlarda keşfedilen FB1 ve FB2 silaj toksinlerinin %15'ini oluşturan önemli bir toksin grubudur. F.moniliforme ve F.proliferatum tarafından üretilen FB1 ve FB2 insanlarda östrojenik, karsinojeniktir. Bu toksinler; önemli hücre çeperi yağlarının biyosentezini bloke ederek, insanlarda hücrelerin bozulmasına ve ölüme bile neden olabilirler (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Nemli koşullarda ve böcek (sinek) zararı tarafından izlenen sıcak ve kuru ortamlar fumonisin üretimini artırır (DeWolf ve ark., 2005). Hastalık belirtileri; atlarda leukoencephalomalacia ve ruminantlarda iştahsızlık ve karaciğer hasarının şekillenmesi gibi ortaya çıkabilir (DeWolf ve ark., 2005). Bir yem 3 ppm FB1 toksini içerdiğinde süte geçiş oranının % 0.05 olduğu bildirilmesine rağmen (Yiannikourisa ve Jouany, 2002), süt ile Fumonisin atımının çok düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir (Scott ve ark., 1994, cited by Whitlow, 2005).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Fumonisin ile kontamine olan mısır veya mısır yan ürünlerindeki total fumonisin konsantrasyonunun insan gidasında en fazla 2-4 ppm, ruminantların rasyonlarında 30 ppm, buzağı yemlerinde 60 ppm olması gerektiğini vurgulamıştır. Kontamine olmuş mısır ve mısır yan ürünlerinin rasyonda kullanım oranı %50'yi geçmemelidir.

### **T-2 Toksinler**

T-2 yemlerde yaygın bulunan kontaminanttır ve ıslak, ılık koşullarda (15.5-31.6 °C) daha yaygındır. T-2 toksinine bağlı hastalık belirtileri, yem tüketiminde düşme, perineal ve boğazda kanamalı oluşumlar, düşük bağıışıklık, gastroenterit bağırsak kanalı, ishal, kısırlık ve ölümü içerir. T-2 toksininin rasyonda 0.7-1.5 ppm düzeyleri sığırlarda toksiktir (KM bazında, Adams, 1995). T-2 rumende daha az toksik olan metabolitlere çözüne de hala toksiktir (Whitlow, 1993). 0.05 ila %2 düzeyindeki rasyonla alınan T-2 süt ile dışarı atılabilir. Sığırlardaki ölümcül dozu her bir kg vücut ağırlığı başına 13 mg'dır (Yiannikourisa ve Jouany, 2002).

### **Fusarik asit**

Fusarik asit; *F.moniliforme*, *F.proliferatum* ve değişik diğer *Fusarium* türleri tarafından üretilir. Fusarik asit bitki gelişimini engeller ve hayvanlardaki sinir sisteminde etkili olan Dopamin β-hidroksilazı bloke eder (Angel, 1998). Sıklıkla DON'daki trikotesenlerle birlikte bulunur ve bunun gibi toksinlerin zehir etkisini artırır.

### **Penicillium Toksinleri**

#### **Okratoksin**

Bu toksin özellikle sıcaklığın 20-25 °C arasında seyrettiği, nemin %6'yı aştığında *Aspergillus ochraceus*, *A. clavatus* ve *Penicillium verrucosum* tarafından üretilir. Okratoksin A ve B doğal olarak oluşur ve bunlardan A daha yaygındır. Okratoksinler; karsinojenik ve immunotoksiktir, sindirim enzimlerine ve böbrek fonksiyonlarına zarar verir, hücre selülünü ve glikoz metabolizmasını engeller; bundan dolayı yağlı karaciğer sendromunun oluşumunu artırır ve büyümeyi geciktirir (Whitlow, 1993; Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Toksin rumende daha az toksik ürünlere dönüştürülebilir (Hult ve ark., 1976). Rumenin detoksifik kapasitesi aşıldığında (>1.7 mg/kg canlı ağırlık) toksin sütte de saptanabilir. Bu durumda ishal, böbrek tahribatı gibi hastalık belirtileri ile süt üretiminde azalma gözlenir (Whitlow, 1993; Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Hayvan performansı ve sağlığı üzerindeki etkileri az anlaşılmış olan diğer etkili *Penicillium* mikotoksinleri ise sekalonik asit, patulin ve PR toksidir. Sekalonik asit; *P.oxalicum* tarafından üretilen bir teratojendir ve doğum güçlüklerine neden olur. Patulin ise *P. expansum*, *P. urticae*, *A. clavatus* ve *Byssoschlamys nivea* tarafından üretilir (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). Bozulan silajlarda yaygın olarak bulunur. Rumende protein, selüloz, organik maddelerin sindirimini düşürür, rumende uçucu yağ asidi profilini değiştirir ve inekleri öldürür (Seglar, 2001). Karsinojenik ve mutajeniktir aynı zamanda motor sistemi organlarının koordinasyonunun bozulmasına, gastrik felce ve ölüme neden olur (Yiannikourisa ve Jouany, 2002). *Penicillium* mikotoksinlerinden olan PR toksin *P. roqueforti* tarafından üretilir ve rumen hareketlerinin yavaşlaması, sindirim bozuklukları, doğumda düşük tehlikesi, plasantanın atılamamasına neden olur (Whitlow, 1993). Silajdaki dayanıklılıkları düşüktür. *P. roqueforti*' nin silajda diğer küf türlerinden daha baskın olduğu Avrupa'da yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Yiannikourisa ve Jouany, 2002).

### **Mikotoksikozlardan Korunma**

Mikotoksinler ile kontamine olmuş silajların tam detoksifikasyonu mümkün değildir. Mikotoksinler büyümesi (gelişmesi) oksijen varlığında gelişen küfler tarafından üretildikleri (oluşturdukları) için, silolama işlemi sırasında uygulanan sıkıştırma ile ortamdaki oksijenin uzaklaştırılması ve depolama sırasında silaja oksijen girişinin minimuma indirilmesi önemlidir. Aşağıdaki ziraat ve silo yönetim uygulamaları küf büyümesi ve mikotoksin üretilmesinin en aza indirilmesi için önemlidir:

- Böcek ve hastalıklara karşı dayanıklı bitkilerin ekilmesi ve nöbetleşe ekim uygulanması,
- Küf istilasına ve mikotoksin üretimine neden olan bitki stresörlerinin (yetersiz gübreleme, böcek, kuş ve dolu zararı, sel, kuraklık) etkilerinin en aza indirilmesi,
- Kurumayı engellemek ve sıkıştırmayı kolaylaştırmak için silolanacak ürünün zamanında hasat edilmesi,
- Lactobacillus buchneri* ya da formik, propiyonik asit gibi aerob mikroorganizmaların gelişimini en aza indirdiği kanıtlanan inokulant ya da organik asitlerin kullanılması.
- Sıkıştırmanın iyi yapılması için kanat makinesinin bıçaklarının keskin olmasına dikkat edilmesi ve dakikadaki hızının 1 ton olmasına özen gösterilmesi. Sıkıştırma yoğunluğunun en az 132/m<sup>3</sup> olması.
- Bank tipi silonun kullanmadan önce temizlenmesi,
- Sıkıştırmanın yapıldığı gün silonun kapatılması,
- Üzerine yeteri kadar lastik (20 lastik/9 m<sup>2</sup>) koyulması,
- Paket ya da bank tipi silajlarda kapatmada kullanılan örtü materyalinin kontrol edilmesi, hasarlı olanların uygun silaj bantı ile kapatılması,
- Isınma, bozulmayı önleyen; silajın yüzeyinin günlerce bozulmadan kalmasını sağlayacak oranlarda silajın silodan alınması,
- Blok kesiciler ya da bıçaklar ile düz bir silo yüzeyi oluşturulması,
- Yem makinesinin temizlenmesi ve bozulmuş silajların atılmasıdır (Bolsen ve Bolsen, 2004).

### **Mikotoksikozlar İçin Tedavi Önerileri**

Bir mikotoksin sıkıntısından şüphelenildiğinde geniş spektrumlu bir mikotoksin bağlayıcı (kil, alüminyum silikat, glukomannan, mannan oligosakkarit) ile tedavi pratik bir yöntemdir. Mikotoksin bağlayıcı uygulamasının kullanılması halinde klinik semptomlar azalır ya da yok olursa bu büyük ihtimal mikotoksinin besin yoluyla alındığının göstergesidir. Aşağıdaki önlemler ile de mikotoksinlerin zararlı etkilerinin önüne geçilebilir.

- Bozulmuş problemlili silajların rasyonlarda kullanılmaması,
- Yedirilen problemlili silajın miktarının azaltılması,
- Belirli toksin bağlayıcıların yemdeki mineral ve vitaminlerin faydalanabilirliğini azaltacağı göz önünde bulundurulması ve sadece bağımsız araştırma denemelerinde etkili olduğu gözlenen ürünler kullanılması,
- Besinsel antioksidan düzeylerinin (A ve E vitaminleri, selenyum ve çinko) rasyonlarda yeterli olduğundan emin olunması,
- Rasyonun yeterli besin öğelerini içerdiğinden emin olunmasıdır.

### **KAYNAKLAR**

- Angell J 1998. A study into the importance of mycotoxins in the aetiology of equine grass sickness and other diseases of farm livestock and wildlife. B. S. Thesis, University of Wales, Aberystwyth, UK.
- Bolsen KK and Bolsen RE 2004. The silage triangle and important practices in managing bunker, trench and drive-over pile silos. Southeast Dairy Herd Management Conference, Macon, Georgia. Pp. 104-111.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. 1989. Mycotoxins: Economic and health risks Task Force Report No. 116, Ames, Iowa.
- CAST, Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task Force Report No. 139, Ames, Iowa.
- Cole RJJ, Kirksey W, Dorner JW, Wilson DM, Johnson JC, Johnson AN, Bedell DM, Springer JP, Chexal KK, Clardy JC, and Cox RH 1977. Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from moldy silage. J. Agric. Food Chem. 25:826.
- Cote LM, Dahlem AM, Yoshizawa T, Swanson SP, and Buck WB. 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine and feces of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 69:2416-2423.
- DeWolf E, Kuldau G, Lipps P, Munkvold G, Vincelli P, Woloshuk C, and Mills D. 2005. Subject: Moldy grains, mycotoxins and feeding problems. <http://www.oardc.ohio-state.edu/ohiofieldcropdisease/Mycotoxins/myco-pagedefault.html> [Erişim 30.11.2005]



- Diekman, MA and Green ML. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1615-1627.
- Garrett WN, Heitman Jr, and AN Booth. 1968. Aflatoxin toxicity in beef cattle. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 127:188.
- Hult K, Teiling A, and Gatenbeck S 1976. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:443.
- Mirocha, CJ and Christensen CM 1974. Oestrogenic mycotoxins produced by *Fusarium*. In *Mycotoxins*. I. F. H. Purchase, ed. Elsevier, Amsterdam.
- Nash R 1990. The effect of mycotoxins on performance. In *Recent advances in animal nutrition*. Haresign, W and D.J.A. Cole (eds.), Butterworths, London, UK.
- PreluskyDB, Trenholm HL, Lawrence GA, and Scott PM 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral admission to dairy cows. *J. Environ. Sci. Health.* B19:593.
- Rotter BA, Prelusky DB and Pestka JJ 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxic. Environ. Health.* 48: 1-34.
- Scott PM, Delgado T, Prelusky DB, Trenholm HL and Miller J D 1994. Determination of fumonisin in milk. *J. Environ. Sci. Health.* B29:989-998.
- Seglar B 2001. Mycotoxin effects on dairy cattle. *Proceedings of the 25th Forage Production and Use Symposium, Eau, Claire, Wisconsin.* Pp. 81-90.
- Whitlow LW 1993. Mycotoxin contamination of silages: A potential cause of poor production and health in dairy herds *Silage production from seed to animal. Proceedings of the NRAES-93 National Silage Production Conference, Syracuse, NY.* pp. 220-231.
- Whitlow LW 2005. *Molds and mycotoxins in feedstuffs - Prevention and treatment. Proceedings of the 16th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida.* Pp. 123-142.
- Whitlow L W and Hagler WM. 2004. Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs.* 76:66-76.
- Yiannikourisa A and Jouany JP 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *51:81-99.*

## Morphology and distribution of some Vespinae (Hymenoptera: Vespidae) species in Turkey

Samet Eray Yalınz<sup>1\*</sup>, Ayla Tüzün<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: seyalniz@ankara.edu.tr

### Abstract

This study is based on the examination of 4785 specimens of Vespinae (Hymenoptera: Vespidae) subfamily collected from different localities of Turkey between 1979 and 2017 and maintained in Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Entomology Research Laboratory. Morphological characters such as mandibular, clypeus, scape, pedicel, flagellum, oculo-malar space, inner part of compound eyes, occiput, vertex, gena, pronotum, mesonotum, scutellum, postscutellum, tegula, wing, leg, tergite and sternite; color and pattern status were detailed. The structures showing the morphological characteristics of each species were examined in the LEICA brand EZ4 model stereo-microscope and the images of the distinctive characters were depicted. Turkey and the world distribution of the material examined for all types of phenology were described in detail. The distribution of each species was shown on the maps and the original names of the species with their current names were given. Literature was used in the diagnosis and control of samples. With this study, it was aimed to determine the morphological characteristics of Vespinae species distributed in Turkey and contribute to biodiversity.

**Keywords:** Social wasps, hornets, yellowjackets, *Vespa*, *Vespula*, *Dolichovespula*.

### INTRODUCTION

The Aculeata group comprises of three superfamilies, namely the Apoidea, Chrysoidea and Vespoidea. The Vespoidea superfamily, in turn, consists of 10 families, which are the Vespidae, Bradynobaenidae, Formicidae, Scoliidae, Mutillidae, Pompilidae, Sierolomorphidae, Tiphiidae, Rhopalosomatidae and Sapygidae (Yıldırım, 2016).

Vespidae species are represented by 250 genera and six subfamilies, and these subfamilies are Euparagiinae, Eumeninae, Masarinae, Stenogastrinae, Polistinae and Vespinae (Pickett and Carpenter, 2010). A total of 298 species and subspecies in 53 genera of the subfamilies Vespinae, Polistinae, Eumeninae, and Masarinae have been recorded from Turkey. Of them, 65 species and subspecies, comprising 22% of Turkish vespids, are endemic (Yıldırım, 2012).

In Turkey, comprehensive faunistic studies on the family of Vespidae are extremely limited. Tüzün and Tanyolaç (1987) gave the records of the Aegean region Vespidae species and determined their distribution areas. Yıldırım and Özbek (1992, 1993) conducted research on the species of Eastern Anatolia Vespinae and Polistinae. Erdoğan and Tüzün (2000), Kekillioğlu and Tüzün (2000) and Tüzün and Kekillioğlu (2003) have determined the distribution areas of Vespidae species in and around Kayseri, Malatya and Ankara provinces, respectively. Yıldırım (2012, 2016) also gave a list of all of Turkey according to the distribution of species and species of Vespidae geographic region.

In this study, a systematic evaluation of the Vespidae species was aimed in order to contribute to existing knowledge on fauna, species distribution areas and biodiversity.

### MATERIALS AND METHODS

In this study, 4785 specimens of Vespinae (Hymenoptera: Vespidae) subfamily collected from different localities of Turkey were examined between 1979 and 2017 in Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Entomology Research Laboratory. A museum material has been created with these specimens and they are identified according to their morphology, color, and pattern. A Leica brand EZ4 stereomicroscope was used for the identification.

For the identification of the fauna, the color, the pattern and the morphological characteristics such as mandibul, clypeus, scape, pedicel, flagellum, inter-antenna area, inside of compound eyes, occiput, vertex, gena, pronotum, mesonotum, scutellum, postscutellum, tegula, wing, leg, tergite and sternite have been studied in detail.

The control and identification of the specimens was carried out based on the methods applied in Tüzün and Tanyolaç (1987), Yıldırım and Kojima (1999), Buck et al. (2008), Yıldırım and Gusenleitner (2012), Fateryga (2017, 2018).



Figure 1. Map of administrative regions of Turkey (Anonymous, 2019)



Figure 2. Vespidae subfamilies habitus (Buck et al., 2008)

## RESULTS

### Key to Palaearctic Vespinae genera (Yellowjackets and Hornets)

- 1 Posterior ocelli separated from hind margin of vertex by several times ocellar diameter (Fig. 3; separated by only ca. 2x ocellar diameter in males). Pronotal carina nearly complete (Fig. 3). Tyloids of male flagellum prominent (Fig. 3). Large wasps (fore wing length 16–24 mm) with ferruginous markings on head and mesosoma.....*Vespa*
- Posterior ocelli separated from hind margin of vertex by at most one ocellar diameter (Fig. 3). Pronotal carina absent or broadly interrupted medially. Tyloids of male flagellum, if present, not prominent and hardly discernible in profile. Smaller wasps (fore wing length 8–18 mm) without ferruginous markings on head and mesosoma.....2
- 2 Malar space long (ca. 2x mid ocellar diameter, Fig. 3). Pronotal carina present, broadly interrupted medially.....*Dolichovespula*
- Malar space short (at most one mid ocellar diameter, Fig. 3). Pronotal carina absent.....*Vespa*

Numbers of Vespidae genera and species reported from Turkey (including type localities) and Europe

Family	Subfamily	Turkey		Type localities in Turkey			Europe	
		Genus	Species and sub species	Genus	Species	Sub species	Genus	Species and sub species
Vespidae	Vespinae	3	12	-	-	-	3	13
	Polistinae	2	10	-	-	-	1	9
	Eumeninae	44	260	3	65	15	37	312
	Masarinae	4	16	-	6	1	4	23
	Total	53	298	3	71	16	45	357

Figure 3. Present situation of Vespidae in Turkey (Yıldırım, 2012).

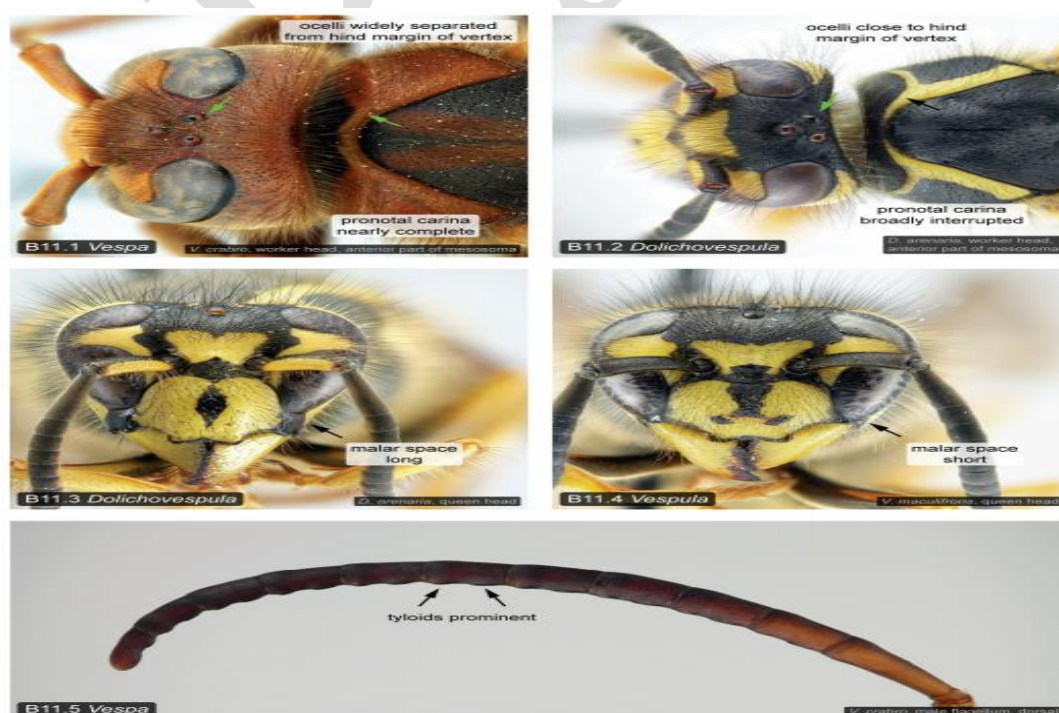


Figure 4. Diagnostic characters of Vespinae genera (Buck et al., 2008)

**Genus *Vespa*** Linnaeus, 1758

*Vespa crabro* Linnaeus, 1758

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Europe, Caucasus, Turkey, Iran, Russia, Crimean Peninsula, Kazakhstan, Turkmenistan, Mongolia, China, Korea, Japan, Taiwan (Fateryga, 2018).

**Phenology:** June-September.

*Vespa orientalis* Linnaeus, 1771

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Eastern and Southern Europe, North Africa, Somalia, Caucasus, Turkey, Cyprus, Syria, Jordan, Lebanon, Israel, Saudi Arabia, Yemen, Oman, UAE, Iraq, Iran, Afghanistan, Pakistan, Central Asia, Kazakhstan (Fateryga, 2018).

**Phenology:** May-September.

**Genus *Vespula*** Thomson, 1869

*Vespula (Vespula) austriaca* (Panzer, 1799)

**Distribution in Turkey:** Eastern Anatolia and Central Anatolia Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012; Tüzün and Yalnız, 2018).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Albania, Austria, Belarus, Belgium, Bosnia & Herzegovina, Bulgaria, Canada, China, Croatia, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, France, Georgia, Germany, Greece, Hungary, India, Ireland, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Kyrgyzstan, Latvia, Liechtenstein, Lithuania, Luxembourg, Macedonia, Moldova, Mongolia, Netherlands, Norway, Pakistan, Poland, Romania, Russia, Serbia, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, Turkey, United Kingdom, Ukraine (Kumar and Carpenter, 2018).

**Phenology:** June-September.

*Vespula (Paravespula) germanica* (Fabricius, 1793)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Europe, Northern Africa, Caucasus, Turkey, Syria, Jordan, Lebanon, Israel, Iraq, Iran, Afghanistan, Central Asia, Pakistan, Kazakhstan, Mongolia, China, Korea, Taiwan (Fateryga, 2018).

**Phenology:** May-September.

*Vespula (Paravespula) vulgaris* (Linnaeus, 1758)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Europe, Caucasus, Turkey, Iran, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Mongolia, China, Korea, Japan (Fateryga, 2018).

**Phenology:** July-September.

**Genus *Dolichovespula*** Rohwer, 1916

*Dolichovespula (Dolichovespula) media* (Retzius, 1783)

**Distribution in Turkey:** Black Sea and Mediterranean Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Caucasus, Western Europe, Kazakhstan, Mongolia, China, Korea, Japan (Tyumaseva and Guskova, 2018).

**Phenology:** July-August.

***Dolichovespula (Metavespula) sylvestris*** (Scopoli, 1763)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Europe, North Africa, Caucasus, Turkey, Syria, Iran, Afghanistan, Pakistan, Central Asia, Kazakhstan, Mongolia, China, India (Fateryga, 2018).

**Phenology:** July-August.

***Dolichovespula (Pseudovespula) omissa*** (Bischoff, 1931)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Eastern Anatolia and Central Anatolia Regions (Figure 1) (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Scandinavia, Central Europe, Turkey, Georgia, Iran (Tyumaseva and Guskova, 2018).

**Phenology:** July-August.

## CONCLUSION

With this study, distribution of *Vespa crabro* Linnaeus, 1758; *Vespa orientalis* Linnaeus, 1771; *Vespula (Vespula) austriaca* (Panzer, 1799); *Vespula (Paravespula) germanica* (Fabricius, 1793); *Vespula (Paravespula) vulgaris* (Linnaeus, 1758); *Dolichovespula (Dolichovespula) media* (Retzius, 1783); *Dolichovespula (Metavespula) sylvestris* (Scopoli, 1763) and *Dolichovespula (Pseudovespula) omissa* (Bischoff, 1931) species found in Turkey was reported. Also, Yıldırım (2012) stated that *Vespula (Allovespula) rufa* (Linnaeus, 1758); *Dolichovespula (Boreovespula) norwegica* (Fabricius, 1781); *Dolichovespula (Boreovespula) saxonica* (Fabricius, 1793) and *Dolichovespula (Pseudovespula) adulterina* (du Buysson, 1905) species were distributed in Turkey.

## REFERENCES

- Anonymous. (2019). Map of administrative regions of Turkey. <https://www.nationsonline.org/oneworld/map/turkey-map.htm> (Date of access: 12.02.2019).
- Buck, M., Marshall, S. A., Cheung, D. K. B. (2008). "Identification Atlas of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of the northeastern Nearctic region". *Canadian Journal of Arthropod Identification* No.5 (February 2008), 492p. doi: 10.3752/cjai.2008.05
- Erdoğan, A., Tüzün, A. (2000). "Ecological and Systematical Studies on Vespidae (Hymenoptera: Vespoidea) Species of Kayseri Province". *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3):771-780.
- Fateryga, A. V. (2017). "New records of solitary Vespidae (Hymenoptera: Vespidae: Eumeninae, Masarinae) from Russia and adjacent countries". *Far Eastern Entomologist*, 334:1-16.
- Fateryga, A. V. (2018). "Wasps of the family Vespidae (Hymenoptera) of the Crimean Peninsula". *Entomofauna*, 39/1(10):193-233.
- Kekillioğlu, A., Tüzün, A. (2000). "Malatya İli Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Vespoidea) Türleri Üzerine Faunistik, Ekolojik ve Sistemik Araştırmalar". *Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2):127-156.
- Kumar, P. G., Carpenter, J. M. (2018). "A taxonomic review of the genus *Vespula* Thomson (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) from the Indian subcontinent" *Halteres*, 9:86-110. doi: 10.5281/zenodo.1258043.
- Pickett, K. M., Carpenter, J. M. (2010). "Simultaneous Analysis and the Origin of Eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera)". *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 68(1):3-33.
- Tüzün, A., Tanyolaç, T. (1987). "Ege Bölgesi Vespidae (Insecta: Hymenoptera) Türlerinin Saptanması". *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5:147-171.
- Tüzün, A., Kekillioğlu, A. (2003). "Ankara Vespidae (Insecta, Hymenoptera) Türleri Üzerine Faunistik Çalışmalar ve Ekolojik Gözlemler". *Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 22:97-105.

- Tüzün, A., Yalnız, S. E. (2018). “Türkiye’nin Farklı Lokalitelerinden Toplanan Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Vespoidea) Türleri”. International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2018), November 22-23, 2018, Ankara. Proceeding Book p. 226-233.
- Tyumaseva, Z. I., Guskova, E. V. (2018). “Species diversity of social wasps (Hymenoptera, Vespidae) in the urbanized territories of Chelyabinsk region”. Ukrainian Journal of Ecology, 8(1), 745–748. doi: 10.15421/2018\_275
- Yıldırım, E., Özbek, H. (1992). “Türkiye Vespinae (Hymenoptera: Vespoidea: Vespidae) türleri üzerinde sistematik ve faunistik çalışmalar”. Turkish Journal of Entomology, 16(4):227-242.
- Yıldırım, E., Özbek, H. (1993). “Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) of Turkey”. Turkish Journal of Entomology, 17(3): 141-156.
- Yıldırım, E., Özbek, H. (1996). “Eumenidae (Hymenoptera, Vespoidea) of Turkey”. Turkish Journal of Zoology, 20:189-209.
- Yıldırım, E., Kojima, J. (1999). “Distributional checklist of the species of the family Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Aculeata) of Turkey”. Natural History Bulletin of Ibaraki University, 3:19-50.
- Yıldırım, E. (2012). “The distribution and biogeography of Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) in Turkey”. Turkish Journal of Entomology, 36(1): 23-42.
- Yıldırım, E., Gusenleitner, J. (2012). “Contribution to the knowledge of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of Turkey, with checklist of the Turkish species”. Turkish Journal of Zoology, 36(3): 361-374. doi:10.3906/zoo-1012-62
- Yıldırım, E. (2016). “The current knowledge of some hymenopterous families (Insecta: Hymenoptera) in Turkey”. Linzer biologische Beiträge, 48(2):1817-1822.

## Morphology and distribution of some Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) species in Turkey

Samet Eray Yalınz<sup>1\*</sup>, Ayla Tüzün<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Biology, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: seyalniz@ankara.edu.tr

### Abstract

This study is based on the examination of 3728 specimens of Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) subfamily collected from different localities of Turkey between 1979 and 2017 and maintained in Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Entomology Research Laboratory. Morphological characters such as mandibular, clypeus, scape, pedicel, flagellum, oculo-malar space, inner part of compound eyes, occiput, vertex, gena, pronotum, mesonotum, scutellum, postscutellum, tegula, wing, leg, tergite and sternite; color and pattern status were detailed. The structures showing the morphological characteristics of each species were examined in the LEICA brand EZ4 model stereo-microscope and the images of the distinctive characters were depicted. Turkey and the world distribution of the material examined for all types of phenology were described in detail. The distribution of each species was shown on the maps and the original names of the species with their current names were given. Literature was used in the diagnosis and control of samples. With this study, it was aimed to determine the morphological characteristics of Polistinae species distributed in Turkey and contribute to biodiversity.

**Keywords:** Insecta, Vespoidea, social wasps, paper wasps, *Polistes*.

### INTRODUCTION

The Aculeata group comprises of three superfamilies, namely the Apoidea, Chrysoidea and Vespoidea. The Vespoidea superfamily, in turn, consists of 10 families, which are the Vespidae, Bradynobaenidae, Formicidae, Scoliidae, Mutillidae, Pompilidae, Sierolomorphidae, Tiphiidae, Rhopalosomatidae and Sapygidae (Yıldırım, 2016).

Vespidae species are represented by 250 genera and six subfamilies, and these subfamilies are Euparagiinae, Eumeninae, Masarinae, Stenogastrinae, Polistinae and Vespinae (Pickett and Carpenter, 2010). A total of 298 species and subspecies in 53 genera of the subfamilies Vespinae, Polistinae, Eumeninae, and Masarinae have been recorded from Turkey. Of them, 65 species and subspecies, comprising 22% of Turkish vespids, are endemic (Yıldırım, 2012).

In Turkey, comprehensive faunistic studies on the family of Vespidae are extremely limited. Tüzün and Tanyolaç (1987) gave the records of the Aegean region Vespidae species and determined their distribution areas. Yıldırım and Özbek (1992,1993) conducted research on the species of Eastern Anatolia Vespinae and Polistinae. Erdoğan and Tüzün (2000), Kekillioğlu and Tüzün (2000) and Tüzün and Kekillioğlu (2003) have determined the distribution areas of Vespidae species in and around Kayseri, Malatya and Ankara provinces, respectively. Yıldırım (2012, 2016) also gave a list of all of Turkey according to the distribution of species and species of Vespidae geographic region.

In this study, a systematic evaluation of the Vespidae species was aimed in order to contribute to existing knowledge on fauna, species distribution areas and biodiversity.

### MATERIALS AND METHODS

In this study, 3728 specimens of Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) subfamily collected from different localities of Turkey were examined between 1979 and 2017 in Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Entomology Research Laboratory. A museum material has been created with these specimens and they are identified according to their morphology, color, and pattern. A Leica brand EZ4 stereomicroscope was used for the identification.



For the identification of the fauna, the color, the pattern and the morphological characteristics such as mandibul, clypeus, scape, pedicel, flagellum, inter-antenna area, inside of compound eyes, occiput, vertex, gena, pronotum, mesonotum, scutellum, postscutellum, tegula, wing, leg, tergite and sternite have been studied in detail.

The control and identification of the specimens was carried out based on the methods applied in Tüzün and Tanyolaç (1987), Yıldırım and Kojima (1999), Buck et al. (2008), Yıldırım and Gusenleitner (2012), Schmid-Egger (2017), Fateryga (2017, 2018).



Figure 1. Map of administrative regions of Turkey (Anonymous, 2019)

## RESULTS

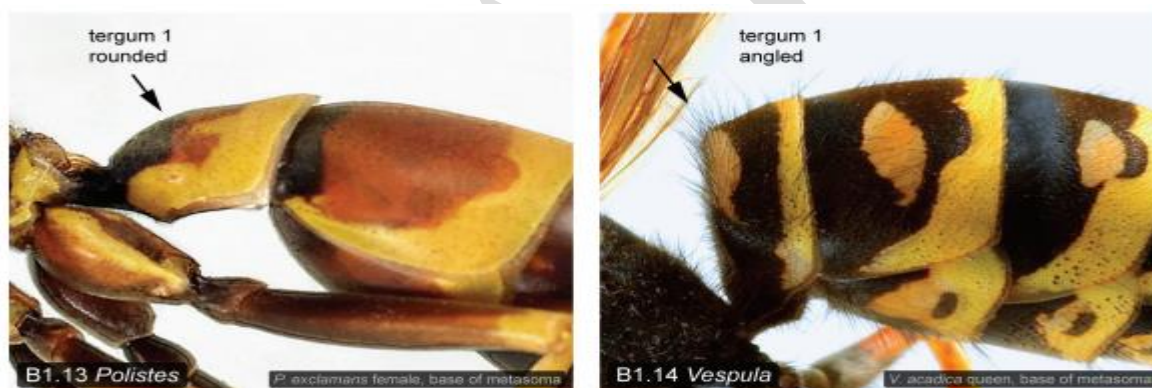
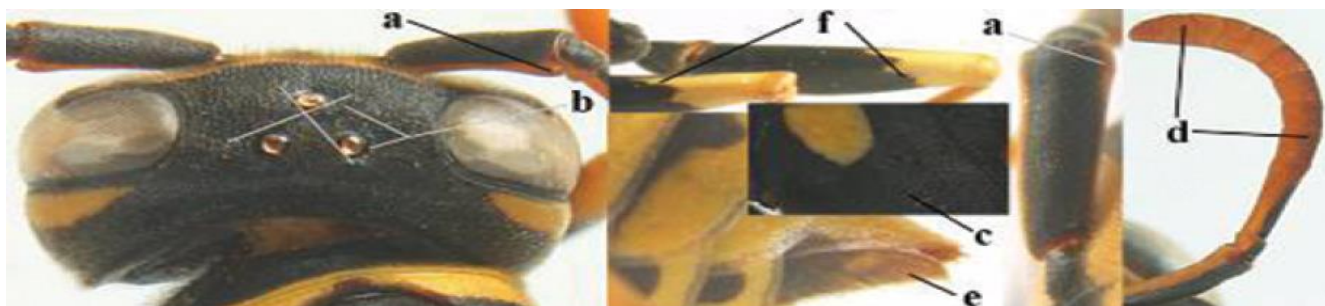


Figure 2. Vespidae subfamilies diagnostic characters (Buck et al., 2008)

Genus *Polistes* Latreille, 1802

*Polistes (Polistes) associus* Kohl, 1898

**Diagnosis:** Scapus slightly widened apically in dorsal view (a), if scapus intermediate then ocellar triangle acute anteriorly (b); change in sculpture between mesepisternum and epicnemium frequently gradual (c; = epicnemial ridge indistinct); apical half of antenna more or less brownish dorsally (d); apical half of hypopygium (= sternite VI) often largely black and brown or largely brown, slightly darker than apex of last tergite (e); border of black and yellow on outer side of middle and hind femora often sharp and often without orange intermediate area in Balkan populations (f); often smaller species (Figure 3) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 3.** *Polistes associus* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Posterolateral yellow bands of pronotum usually not connected to anterior transverse band (a); anterior transverse yellow band of pronotum medio-laterally as wide as dorso-laterally or wider (b); mesoscutum with paired yellow spots (c); [clypeus with transverse black band; hypopygium all black, with apical yellow or reddish spot or entirely reddish; distinction from *P. nimpha* in SW Asia is not always possible, because *P. nimpha* is highly variable in this region; usually sculpture of ventral part of mesopleuron finer in *P. associus* than in *P. nimpha*] (Figure 4) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 4.** *Polistes associus* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Ventral half of clypeus distinctly depressed (a) and with distinct lateral ridges (b); dorsal length of apical antennal segment about 3.0 times its width (c); frons with a distinct longitudinal depression medially (d); sternites III-VII usually with transverse yellow band basally (e; visible with sternites sufficiently extruded) and last sternite often partly yellow (f); apical half of antenna usually distinctly darkened dorsally (g); clypeus more or less truncate medio-ventrally (h) (Figure 5) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 5.** *Polistes associus* male diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Yıldırım, 2012; Tüzün and Yılmaz, 2018).

**Distribution in the Palearctic Region:** Southern Europe and Turkey, northwards to Switzerland, southwards to Israel, eastwards to Azerbaijan (Schmid-Egger et al., 2017).

**Phenology:** June-September.

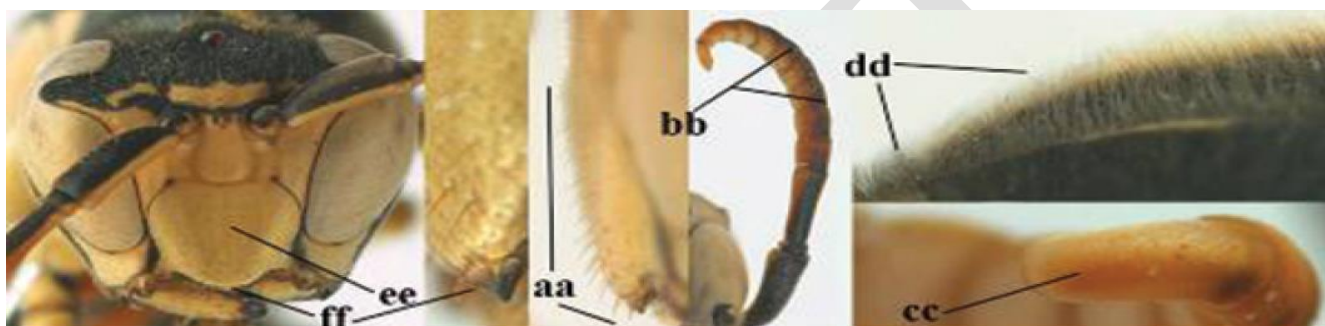
*Polistes (Polistes) biglumis* (Linnaeus, 1758)

**Diagnosis:** Malar space 1.22–1.76 times as long as POL (a); change in sculpture and level between mesepisternum and epicnemium abrupt (b; = epicnemial ridge distinct); yellow lateral stripes of pronotum usually absent (c); tegula in most specimens with large dark medial spot, reaching outer margin (d); pubescence of mesoscutum on average 0.9 times as long as greatest diameter of anterior ocellus (Figure 6) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 6.** *Polistes biglumis* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Dorsal 0.7 of clypeus without bristles and punctures (aa); apical half of antenna usually darker dorsally than ventrally (bb); apical antennal segment more slender, dorsally about twice as long as wide basally (cc); setae of pronotum medio-dorsally and of mesoscutum at least 0.8 times as long as width of posterior ocellus (dd) or longer; width of clypeus about equal to its length (ee) and medio-ventrally less flattened (ff); [fourth and fifth antennal segments moderately oblique in lateral view] (Figure 7) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 7.** *Polistes biglumis* male diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

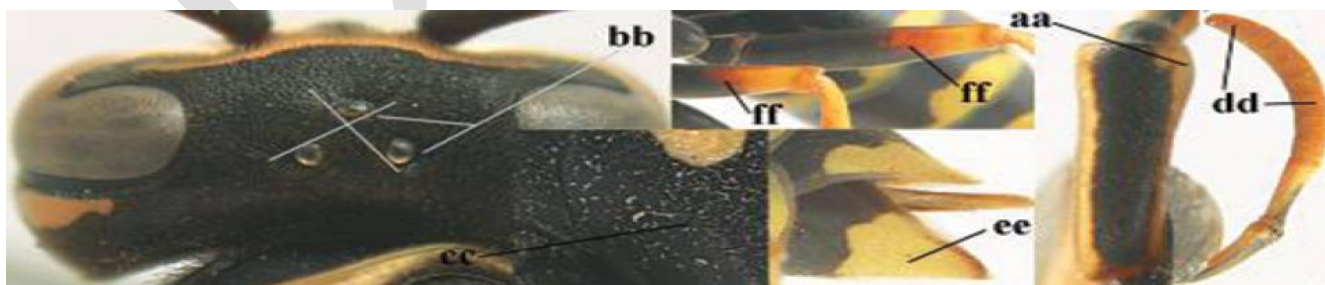
**Distribution in Turkey:** Black Sea, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Marmara Regions (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palearctic Region:** Europe including Norway and Sweden south of 65° N to Turkey, Central Asia (Schmid-Egger et al., 2017).

**Phenology:** June-August.

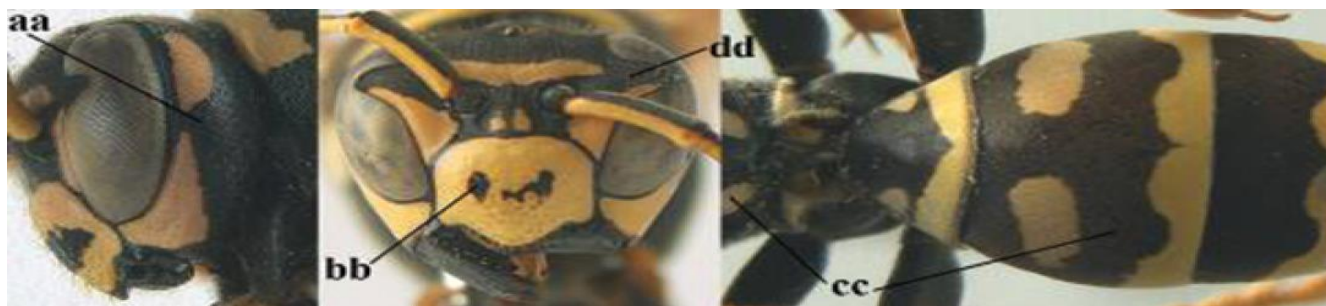
*Polistes (Polistes) dominula* (Christ, 1791)

**Diagnosis:** Scapus distinctly widened apically in dorsal view (aa); ocellar triangle transverse (bb); change in sculpture between mesepisternum and epicnemium abrupt (cc; = epicnemial ridge distinct); apical half of antenna orange or yellow (dd); apical half of hypopygium yellow or largely so and as pale as apex of apical tergite (ee), rarely darker; border of black and yellow on outer side of middle and hind femora washed out, partly because of orange intermediate area (ff); somewhat larger species) (Figure 8) (Schmid-Egger et al., 2017).



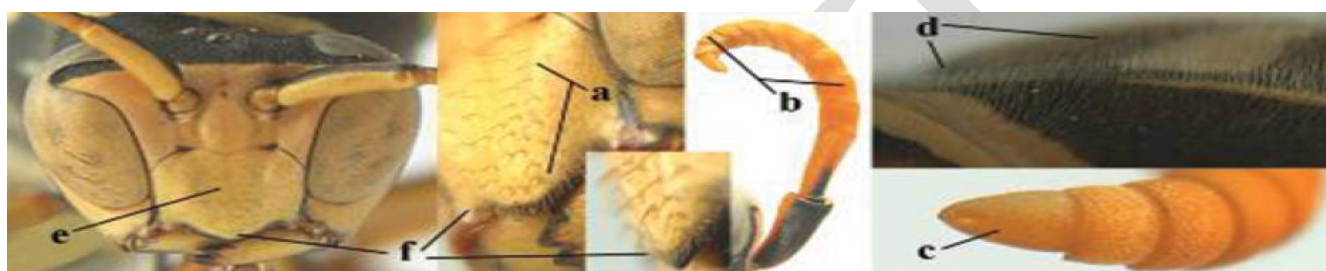
**Figure 8.** *Polistes dominula* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Temple with separated yellow spots (aa), if connected then band medially narrower than half width of temple; clypeus with medial black spot, may lack in few specimens (bb); propodeum and second tergite largely black (cc); incision of eye mainly black (dd); [bristles of clypeus conspicuous] (Figure 9) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 9.** *Polistes dominula* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Most of clypeus with long bristles and distinct punctures (a); apical half of antenna uniformly orange-yellow dorsally and ventrally (b); apical antennal segment comparatively stout and dorsally about 1.5 times as long as wide basally (c); setae of pronotum medio-dorsally and of mesoscutum about half as long as width of posterior ocellus (d); width of clypeus 1.1 times its length (e) and medio-ventrally more flattened (f); [fourth and fifth antennal segments strongly oblique in lateral view] (Figure 10) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 10.** *Polistes dominula* male diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palaearctic Region:** Russia, Europe, North Africa, Caucasus, Turkey, Cyprus, Syria, Jordan, Israel, Iran, Afghanistan, Pakistan, Central Asia, Kazakhstan, Mongolia, China (Fateryga, 2018).

**Phenology:** May-September.

*Polistes (Polistes) gallicus* (Linnaeus, 1767)

**Diagnosis:** Transverse yellow band of pronotum medio-laterally wider than dorso-laterally (a); central dark patch on clypeus usually developed, but small, rounded or forming a transverse band (b); mesoscutum usually with pair of medium-sized to large yellow spots (c); [some specimens have an all yellow clypeal disk and all black mesoscutum; specimens from NW Africa often have sternite IV apically yellow, which is more or less darkened in northern specimens] (Figure 11) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 11.** *Polistes gallicus* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Yellow transverse pronotal band moderately to strongly widened laterally, of even width medio-laterally (aa); apical half of antenna uniformly orange to yellow dorsally and ventrally (bb), mesoscutum nearly always with minute to large paired yellow spots (cc); scutellum with large yellow spots (dd); setae of pronotum and mesoscutum usually shorter, about 0.5 times diameter of posterior ocellus and mainly straight (ee) (Figure 12) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 12.** *Polistes gallicus* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

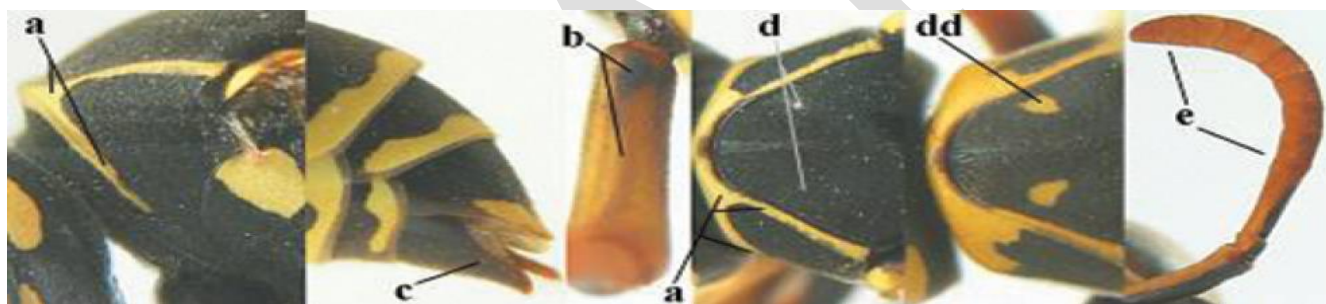
**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Yıldırım, 2012).

**Distribution in the Palearctic Region:** Russia, Europe, North Africa, Ethiopia, Caucasus, Turkey, Cyprus, Jordan, Israel, Iran, Afghanistan, Pakistan, Turkmenistan, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Mongolia (Fateryga, 2018).

**Phenology:** May-September.

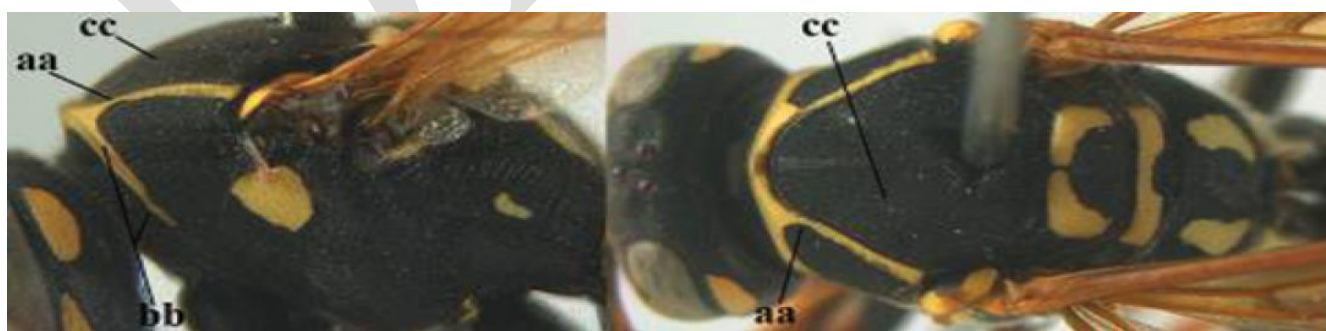
*Polistes (Polistes) nimpha* (Christ, 1791)

**Diagnosis:** Transverse yellow band of pronotum narrower medio-laterally than dorso-laterally near junction with oblique yellow stripes of pronotum (a), rarely narrowed dorso-laterally and slightly widened below it and then mesoscutum usually without yellow markings (d); scapus more or less dark brown or blackish baso-ventrally (b), apical half of hypopygium often entirely black or dark brown (c), sometimes with small yellow spot, rarely apical quarter of hypopygium yellow; mesoscutum usually without paired yellow spots (d) but sometimes minute, or medium-sized (dd); apical half of antenna more or less darkened dorsally (e) (Figure 13) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 13.** *Polistes nimpha* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Posterolateral yellow bands of pronotum usually connected to anterior transverse band (aa); anterior transverse yellow band of pronotum medio-laterally narrower than dorso-laterally (bb); mesoscutum sometimes lacking yellow spots (cc) (Figure 14) (Schmid-Egger et al., 2017).



**Figure 14.** *Polistes nimpha* diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

Dorsal length of apical antennal segment 2.2–2.9 times as long as its maximal width (a), 1.3–1.5 times as long as fifth antennal segment (b); clypeus distinctly depressed medially (c) and with distinct lateral ridges (d); medio-longitudinal depression of face more or less impressed and U-shaped (e); antenna coloured according to fig. f; short carina between antennal sockets sharp dorsally and usually pale yellow (g); clypeus with short bristles and medio-ventrally flat; width of clypeus 1.0–1.1 times its length; [head sometimes distinctly narrowed ventrally] (Figure 15) (Schmid-Egger et al., 2017).

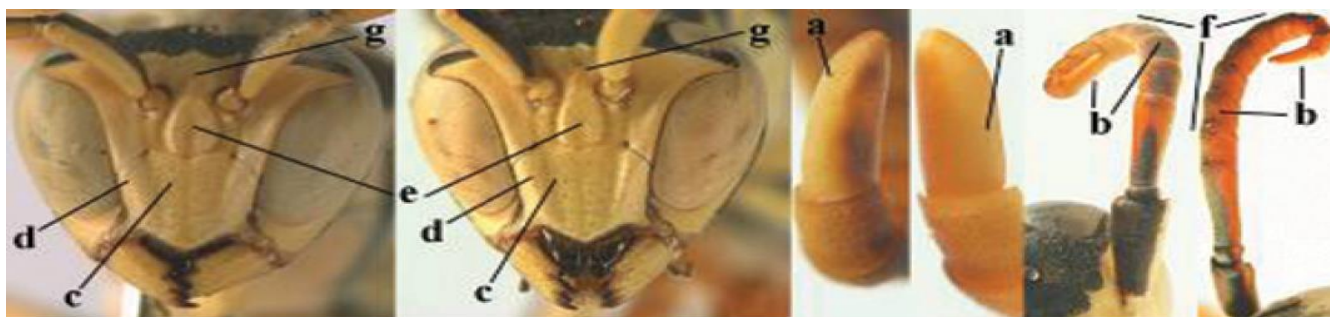


Figure 15. *Polistes nimpha* male diagnostic characters (Schmid-Egger et al., 2017)

**Distribution in Turkey:** Black Sea, Southeastern Anatolia, Eastern Anatolia, Central Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara Regions (Yıldırım, 2012; Tüzün and Yalınz, 2018).

**Distribution in the Palearctic Region:** Russia, Europe, North Africa, Caucasus, Turkey, Jordan, Israel, Iraq, Iran, Pakistan, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Mongolia, China, India (Fateryga, 2018).

**Phenology:** May-September.

## CONCLUSION

With this study, distribution of *Polistes (Polistes) associus* Kohl, 1898; *Polistes (Polistes) biglumis* (Linnaeus, 1758); *Polistes (Polistes) dominula* (Christ, 1791); *Polistes (Polistes) gallicus* (Linnaeus, 1767) and *Polistes (Polistes) nimpha* (Christ, 1791) species found in Turkey was reported. Also, Yıldırım (2012) stated that *Polistes (Polistes) bischoffi* Weyrauch, 1937; *Polistes (Sulcopolistes) atrimandibularis* Zimmermann, 1930; *Polistes (Sulcopolistes) semenowi* Morawitz, 1889; *Polistes (Sulcopolistes) sulcifer* Zimmermann, 1930 species were distributed in Turkey.

## REFERENCES

- Anonymous. (2019). Map of administrative regions of Turkey. <https://www.nationsonline.org/oneworld/map/turkey-map.htm> (Date of access: 12.02.2019).
- Buck, M., Marshall, S. A., Cheung, D. K. B. (2008). "Identification Atlas of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of the northeastern Nearctic region". *Canadian Journal of Arthropod Identification* No.5 (February 2008), 492p. doi: 10.3752/cjai.2008.05
- Erdoğan, A., Tüzün, A. (2000). "Ecological and Systematical Studies on Vespidae (Hymenoptera: Vespoidea) Species of Kayseri Province". *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3):771-780.
- Fateryga, A. V. (2017). "New records of solitary Vespidae (Hymenoptera: Vespoidea: Eumeninae, Masarinae) from Russia and adjacent countries". *Far Eastern Entomologist*, 334:1-16.
- Fateryga, A. V. (2018). "Wasps of the family Vespidae (Hymenoptera) of the Crimean Peninsula". *Entomofauna*, 39/1(10):193-233.
- Kekillioğlu, A., Tüzün, A. (2000). "Malatya İli Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Vespoidea) Türleri Üzerine Faunistik, Ekolojik ve Sistemik Araştırmalar". *Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2):127-156.
- Kumar, P. G., Carpenter, J. M. (2018). "A taxonomic review of the genus *Vespula* Thomson (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) from the Indian subcontinent" *Halteres*, 9:86-110. doi: 10.5281/zenodo.1258043.
- Pickett, K. M., Carpenter, J. M. (2010). "Simultaneous Analysis and the Origin of Eusociality in the Vespidae (Insecta: Hymenoptera)". *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 68(1):3-33.
- Schmid-Egger, C., van Achterberg, K., Neumeyer, R., Morinière, J., Schmidt, S. (2017). Revision of the West Palearctic *Polistes* Latreille, with the descriptions of two species – an integrative approach using morphology and DNA barcodes (Hymenoptera, Vespidae). *ZooKeys* 713: 53–112. <https://doi.org/10.3897/zookeys.713.11335>
- Tüzün, A., Tanyolaç, T. (1987). "Ege Bölgesi Vespidae (Insecta: Hymenoptera) Türlerinin Saptanması". *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5:147-171.

- Tüzün, A., Kekillioğlu, A. (2003). “Ankara Vespidae (Insecta, Hymenoptera) Türleri Üzerine Faunistik Çalışmalar ve Ekolojik Gözlemler”. Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 22:97-105.
- Tüzün, A., Yalnız, S. E. (2018). “Türkiye’nin Farklı Lokalitelerinden Toplanan Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Vespoidea) Türleri”. International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2018), November 22-23, 2018, Ankara. Proceeding Book p. 226-233.
- Tyumaseva, Z. I., Guskova, E. V. (2018). “Species diversity of social wasps (Hymenoptera, Vespidae) in the urbanized territories of Chelyabinsk region”. Ukrainian Journal of Ecology, 8(1), 745–748. doi: 10.15421/2018\_275
- Yıldırım, E., Özbek, H. (1992). “Türkiye Vespinae (Hymenoptera: Vespoidea: Vespidae) türleri üzerinde sistematik ve faunistik çalışmalar”. Turkish Journal of Entomology, 16(4):227-242.
- Yıldırım, E., Özbek, H. (1993). “Polistinae (Hymenoptera: Vespidae) of Turkey”. Turkish Journal of Entomology, 17(3): 141-156. Yıldırım, E., Özbek, H. (1996). “Eumenidae (Hymenoptera, Vespoidea) of Turkey”. Turkish Journal of Zoology, 20:189-209.
- Yıldırım, E., Kojima, J. (1999). “Distributional checklist of the species of the family Vespidae (Insecta: Hymenoptera: Aculeata) of Turkey”. Natural History Bulletin of Ibaraki University, 3:19-50.
- Yıldırım, E. (2012). “The distribution and biogeography of Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) in Turkey”. Turkish Journal of Entomology, 36(1): 23-42.
- Yıldırım, E., Gusenleitner, J. (2012). “Contribution to the knowledge of the Vespidae (Hymenoptera, Aculeata) of Turkey, with checklist of the Turkish species”. Turkish Journal of Zoology, 36(3): 361-374. doi:10.3906/zoo-1012-62
- Yıldırım, E. (2016). “The current knowledge of some hymenopterous families (Insecta: Hymenoptera) in Turkey”. Linzer biologische Beiträge, 48(2):1817-1822.

## Thermal kinetics and thermodynamics of the dehydration reaction of $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$

Fatma Tugce Senberber<sup>1,\*</sup>, Emek Moroydor Derun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nisantasi University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Civil Engineering, Istanbul, Turkey.

<sup>2</sup>Yildiz Technical University, Faculty of Chemistry and Metallurgy, Department of Chemical Engineering, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: fatma.senberber@nisantasi.edu.tr

### Abstract

$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  lost its crystal water in the temperature range of 40 - 200°C and the calcined sample was identified as  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ , was a notable for its further treatments in optical and electrical applications. Dehydration process was studied using non-isothermal thermogravimetry (TG) applying model-fitting method. Different mechanism models (chemical reaction order, diffusion and phase interfacial reaction) were applied. The activation energies calculated for the dehydration reaction; and average of activation energy was found as 160 kJ/mol. The better kinetic model of the dehydration reaction for  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  was selected as F3 (chemical reaction - third order). The thermodynamic functions ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) of the dehydration reaction were calculated by the activated complex theory and found that the process was endothermic, non-spontaneous and fast.

**Keywords:** Magnesium phosphate, decomposition kinetic, thermal behaviour, thermodynamic.

### INTRODUCTION

Chemically bonded phosphate ceramics generally occur with the reaction of a metal cation and phosphate ion. They can be classified according to the metal cation in structure. Although being cementitious materials, magnesium phosphates have similar features and with ceramics. They are quick-setting and hard materials. The phosphate anion in the structure makes the ceramic biocompatible (Yu et al., 2017; Yu and Jiang, 2018). They can be used novel biomaterial designs or can be added to calcium phosphate to increase hardness (Wu et al., 2008). Therefore, magnesium phosphates are preferred in dental and bone restorations, implants, medicine and agriculture (Lu and Chen, 2016; Boonchom, 2009; Qiao et al., 2010; Yang et al., 2000; Rouzic et al., 2017; Kongshaug et al., 2001). Also, this type of phosphate has dissolubility in water, chemical and thermal resistance. This situation makes them useful for anti-corrosive coating and surfaces (Pokorny et al., 2016; Zhang and Tang, 2015).

Magnesium phosphates can be synthesized by chemical precipitation, hydrothermal, solid-state, microwave or biosynthesis methods (Yu et al., 2016; Zhou et al., 2012). Thermal-treated magnesium phosphates can be used as catalyst in organic processes of biomass applications. (Boonchom, 2009; Gopinath et al., 2015; Debnath et al., 2016; Aramendia et al., 1999). The dehydrated forms of magnesium phosphate,  $\text{MgHPO}_4$  and  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ , are notable for their dielectric, ferroelectric, piezoelectric and optical features (Assaaoudi et al., 2007; Zhang et al., 2016). The chemical structure and textural features of phosphates are notable for these usage areas. For this purpose, the studies on thermal behaviour, thermal decomposition mechanism and thermodynamic functions of  $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$  are important in the manufacturing processes this purpose (Kanazawa et al., 1979; Sadiq et al., 2015; Sadiq et al., 2008).  $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and  $\text{LiMnPO}_4$  are the characterized forms of metal phosphates by thermal kinetic and thermodynamic studies (Boonchom, 2009; Sronsri and Boonchom 2018, Boonchom and Danvirutai 2008).

In this research, it is aimed to explain the mechanism, kinetics and thermodynamics of the decomposition of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  using thermal analyses techniques. Thermal decomposition process of mineral was interpreted by Coats-Redfern non-isothermal kinetic method. The thermal kinetic ( $E_a$ ,  $A$ ,  $n$ , mechanism and model) and thermodynamic ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  and  $\Delta G$ ) parameters of the dehydration reaction of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  were determined.

### MATERIALS AND METHODS

#### Mineral preparation and characterization

Hydrates forms of magnesium phosphates can be synthesized in basic hydrothermal conditions (Mousa, 2010). Magnesium source of magnesium oxide (MgO) and phosphorus source of phosphoric acid were reacted under



magnetic stirring at room temperature for 1 hour. pH value was determined 10. The prepared white powders were filtered and dried at 40°C.

The sample was identified by X-ray diffraction analysis (XRD). A Philips PANalytical XPert Pro X-ray diffractometer was used at 40 mA, 45 kV and Cu-K $\alpha$  radiation in the 2 $\theta$  range of 5°–60°. The vibrational modes of sample were analysed by a PerkinElmer Spectrum One FT-IR with a universal attenuation total reflectance (ATR) sampling accessory with a diamond/ZnSe crystal. Thermal behaviour of sample was studied between the temperature ranges of 30–500°C with a Perkin Elmer Diamond TG/DTG. Five different heating rates (5, 10, 15, and 20°C/min) were applied under the nitrogen atmosphere.

The prepared sample was placed in a Protherm MOS 180/4 high-temperature furnace in nitrogen flowing (5 ml/min) atmosphere. Calcined sample was further analysed by XRD.

### Thermal dehydration kinetics and thermodynamic analysis

Thermal solid-state decomposition in solid-gas system of the single-crystalline compound was given in Equation 1. For a hydrate mineral, the escaping gas was water and this process was called dehydration.



Thermal behaviour can be explained by using the thermogravimetric data. The activation energy ( $E_a$ , kJ/mol), exponential factor ( $A$ ) and reaction order ( $n$ ) of dehydration reaction were calculated by using the Coats-Redfern Method. Integrated and linear forms of Coats Redfern were given in Equations 2 and 3. In this method, the  $E_a$  and  $A$  can be calculated from the slope and intercept of the  $\ln[g(\alpha)/T^2]$  vs  $1/T$  plot, respectively (Lopez et al., 2015; Boonchom and Puttawong, 2010).

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d(\alpha)}{f(\alpha)} = \frac{A}{\beta} \int_{T_0}^T \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) dT \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{g(\alpha)}{T^2}\right) = \ln\left(\frac{AR}{E_a\beta}\right) - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

where  $\alpha$  is the degree of conversion,  $f(\alpha)$  is a function of conversion according to the reaction mechanism,  $g(\alpha)$  is a kinetic function of different reaction mechanisms which is obtained from integration of  $f(\alpha)$ .  $R$  is the gas constant ( $8.314 \times 10^{-3}$  kJ/mol),  $T$  is the absolute temperature, and  $\beta$  is the heating rate (°C/min). The solid-state reaction mechanisms and models were listed in Table 1.

Table 8. Reaction mechanisms, model names and functions of  $f(\alpha)$  and  $g(\alpha)$

Reaction Mechanism	Model Name	Model Code	$f(\alpha)$	$g(\alpha)$
Chemical reaction order	1 <sup>st</sup> order	F1	$1-\alpha$	$-\ln(1-\alpha)$
	2 <sup>nd</sup> order	F2	$(1-\alpha)^2$	$1-(1-\alpha)^2$
	3 <sup>rd</sup> order	F3	$(1-\alpha)^3$	$(1-(1-\alpha)^3)/2$
Diffusion	One dimensional	F4	$1/2\alpha$	$\alpha^2$
	Two dimensional	F5	$-(\ln(1-\alpha))^{-1}$	$\alpha+(1-\alpha)1-(1-\ln(1-\alpha))$
Phase interfacial reaction	Shrinkage geometrical column	F6	$2(1-\alpha)^{1/2}$	$1-(1-\alpha)^{1/2}$
	Shrinkage geometrical spherical	F7	$2(1-\alpha)^{2/3}$	$1-(1-\alpha)^{1/3}$

The thermodynamic factors of enthalpy change ( $\Delta H$ ), Gibbs energy change ( $\Delta G$ ), and entropy change ( $\Delta S$ ) were calculated by using the obtained thermal kinetic parameters of  $A$  and  $E_a$  for the best-fitted reaction mechanism. The equations used in thermodynamic calculations were given in Equations 4-6 (Naqvi et al., 2018).

$$\Delta H = E_a - RT \quad (4)$$

$$\Delta G = E_a + RT_m \ln\left(\frac{K_B T}{hA}\right) \quad (5)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T_m} \quad (6)$$

where  $K_B$  is Boltzmann constant ( $1.381 \times 10^{-23}$  m<sup>2</sup>kg/s<sup>2</sup>K),  $T_m$  is the temperature at which maximum decomposition occurs (peak point of the DTG curve) and  $h$  is the plank constant ( $6.626 \times 10^{-34}$  m<sup>2</sup>kg/s<sup>2</sup>).

## RESULTS

### XRD results

XRD patterns of un-calcined and calcined samples were presented in Figure 1. The prepared sample was identified as Magnesium Phosphate Hydrate (Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·22H<sub>2</sub>O) with the powder diffraction file number of

00-044-0775 (Figure 1a). The magnesium phosphate hydrate was calcined at 500°C. The calcined sample was identified as Farringtonite ( $(\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2)$ ) with the powder diffraction file number of 00-033-0876 (Figure 1b).

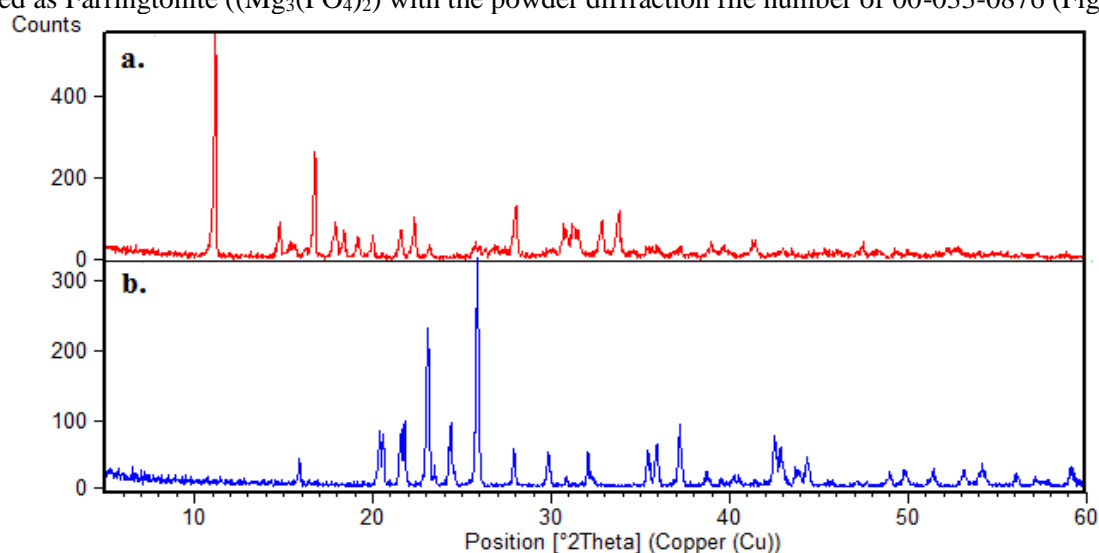


Figure 1. XRD patterns of a. un-calcined and b. calcined samples

### FT-IR results

FT-IR spectrum of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  was presented in Figure 2. The  $\text{OH}^{-1}$  vibrations in hydrate structure and H-O-H vibrations were seen  $3450 \text{ cm}^{-1}$  and  $1655 \text{ cm}^{-1}$ , respectively. The characteristic band values for the  $\text{PO}_4^{3-}$  was seen at the band value of  $1066 \text{ cm}^{-1}$ . The band values at the  $715 \text{ cm}^{-1}$  can be explain with the bending of  $\text{PO}_2(\text{OH})$ . The out of plane of phosphate ion was observed at  $578 \text{ cm}^{-1}$ .

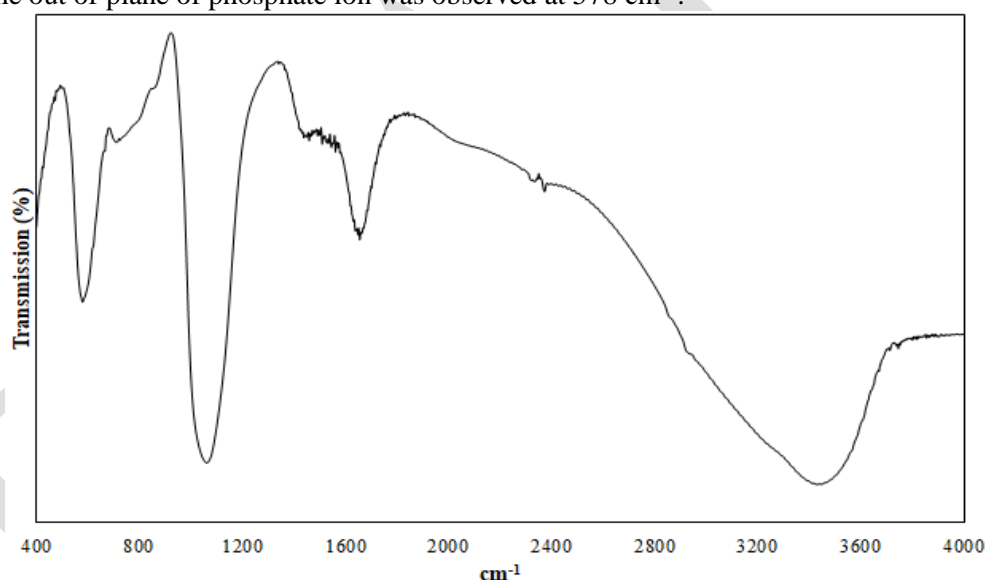


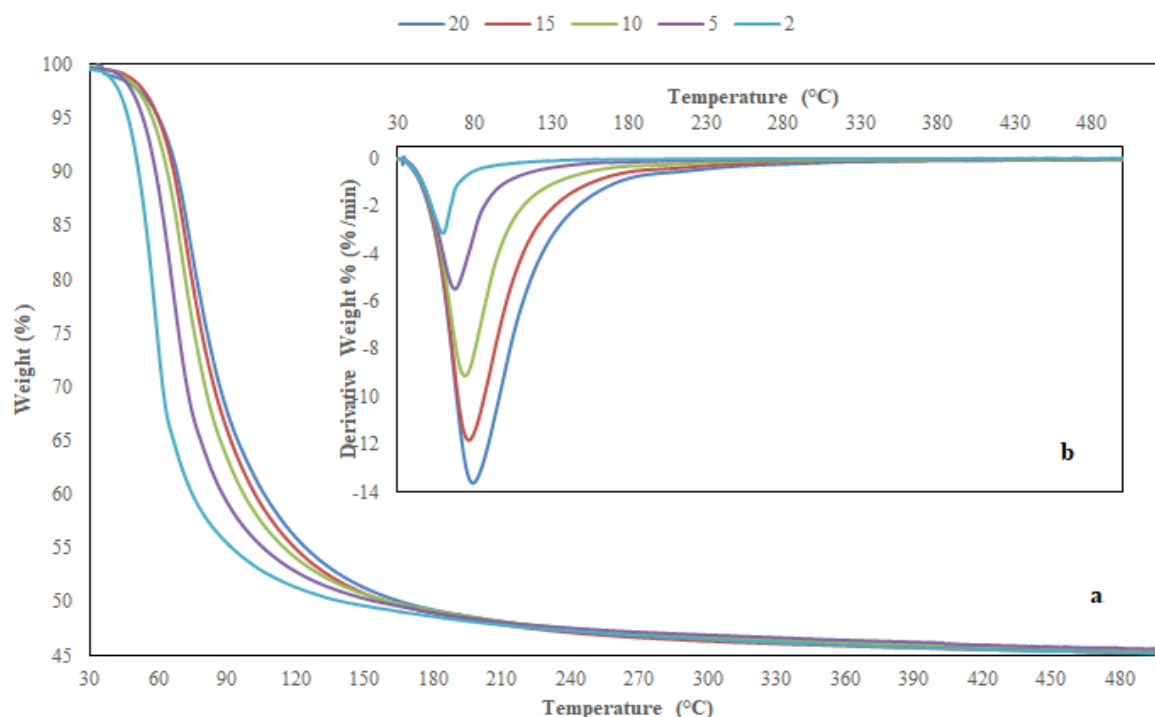
Figure 2. FT-IR spectrum of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$

### Thermal analyses results

Dehydration behaviour of magnesium phosphate hydrate was investigated by using thermal analyses techniques. Thermal analyses result of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  were given Table 2. TG/DTG curves of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$  for different heating rates were given in Figure 3. According to the thermal curves, dehydration process occurred in the temperature range of 40–200°C and mass was determined as approximately %55.5. The peak temperature of DTG curves were seen between 67 and 79°C.

Table 9. Thermal analyses result of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$

$\beta$ (°C/min)	$T_{\text{initial}}$ (°C)	$T_{\text{final}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C) (DTG)	Mass loss (%)
5	46.28	107.76	67.51	55.49
10	48.51	120.12	73.79	55.59
15	50.97	137.56	76.49	55.60
20	52.16	144.98	79.16	55.73



**Figure 3.** TG/DTG curves of  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$  a. TG and b. DTG

### Thermal kinetic results

Coast Redfern non-isothermal kinetic method was applied for the calculation of thermal kinetic parameters of  $E_a$  and  $A$ . Mechanisms of chemical reaction order (F1, F2 and F3), diffusion (F4 and F5) and phase interfacial reaction (F6 and F7) were used in thermal kinetic modelling. The calculated kinetic parameters at the different heating rates were given Table 3.

Correlation factors ( $R^2$ ) were observed between 0.7882 and 0.9942. The third order of chemical reaction was selected as best fitted mechanism, because of the highest linearity.  $R^2$  values varied between 0.9903 and 0.9942 for reaction model of F3. In this reaction model, the activation energies ( $E_a$ ) were found in the range of 123.01 – 170.97 kJ/mol. Exponential factors ( $A$ ) changed in the range of  $1.24 \times 10^{35}$  -  $3.47 \times 10^{18}$  for the F3 model. Thermal kinetic parameters of  $E_a$  and  $A$  showed a falling tendency with the increasing heating rates, in all models.

**Table 3.** Calculated kinetic parameters for Coast Redfern method

Model Code	$\beta$ (°C/min)	$R^2$	$E_a$ (kJ/mol)	$A$	Model Code	$\beta$ (°C/min)	$R^2$	$E_a$ (kJ/mol)	$A$
F1	5	0.8992	76.04	$7.39 \times 10^{10}$	F5	5	0.8149	119.13	$5.64 \times 10^{16}$
	10	0.9065	68.84	$6.26 \times 10^9$		10	0.8265	109.53	$1.56 \times 10^{15}$
	15	0.8774	57.26	$1.04 \times 10^8$		15	0.7899	90.83	$1.88 \times 10^{12}$
	20	0.8752	54.15	$3.84 \times 10^7$		20	0.7882	86.24	$3.82 \times 10^{11}$
F2	5	0.9804	117.73	$4.66 \times 10^{17}$	F6	5	0.8291	61.28	$1.32 \times 10^8$
	10	0.9827	105.21	$4.67 \times 10^{15}$		10	0.8386	55.87	$2.32 \times 10^7$
	15	0.9716	89.18	$1.44 \times 10^{13}$		15	0.7987	45.93	$7.16 \times 10^5$
F3	20	0.9706	84.41	$2.77 \times 10^{12}$	20	0.7954	43.42	$3.33 \times 10^5$	
	5	0.9942	170.97	$1.80 \times 10^{26}$	F7	5	0.8019	115.41	$9.14 \times 10^{12}$
	10	0.9926	151.54	$1.14 \times 10^{23}$		10	0.8156	107.07	$6.84 \times 10^{10}$
15	0.9911	129.94	$4.19 \times 10^{19}$	15		0.7838	89.77	$5.25 \times 10^7$	
F4	20	0.9903	123.01	$3.47 \times 10^{18}$	20	0.7836	85.59	$3.54 \times 10^6$	
	5	0.8422	136.18	$8.14 \times 10^{12}$					
	10	0.8556	126.03	$1.30 \times 10^9$					
	15	0.8293	107.06	$1.92 \times 10^6$					
	20	0.8287	101.94	$1.85 \times 10^5$					

## Thermodynamic results

Thermodynamic parameters of  $\Delta H$  (kJ/mol),  $\Delta G$  (kJ/mol) and  $\Delta S$  (kJ/mol $\times$ K) were calculated at different heating rates by using the best-fitted kinetic model (F3) as shown in Table 4. Acceptable differences were observed between the estimated thermodynamic parameters varying heating rates.

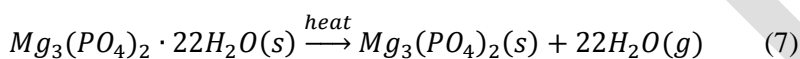
**Table 4.** Calculated thermodynamic parameters for the best-fitted kinetic model

Model Code	$\beta$ ( $^{\circ}$ C/min)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (kJ/mol $\times$ K)
F3	5	168.14	83.56	0.248
	10	148.65	83.80	0.187
	15	127.03	84.69	0.121
	20	120.08	84.74	0.100

$\Delta H$  values were found in the range of 120.08 – 221.55 kJ/mol thermal dehydration of magnesium phosphate hydrate.  $\Delta G$  and  $\Delta S$  values were determined in the range of 82.50 – 84.74 kJ/mol and 0.1 – 0.248 kJ/mol $\times$ K, respectively.

## DISCUSSION

Removal of 22 moles of crystal water was occurred during the dehydration. In the light of XRD and thermal analyses, the probable reaction for the dehydration process were given in Equation 7.



The differences in calculated activation energies can be explained with the low linearity in correlation and lack of the reaction order in other selected models. Due to the lower linearity for the reaction models of diffusion and phase interfacial (F4 – F7), these models were not suitable for the explanation of reaction model. Exponential factor (A) was generally associated with the number of times molecules hit in the orientation necessary to cause a reaction (Naqvi et al., 2018). In general, the low and high factors could be explained with the tight and loose complexes, respectively. The thermal dehydration reaction of  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$  may be classified as loose complex, which corresponds to the removal of crystallization water. These results are compatible with thermal analysis, which confirm that the decomposition product as tri-magnesium phosphate anhydrous  $Mg_3(PO_4)_2$ .

Positive value of  $\Delta H$  indicated the propellant power of temperature increase, which meant the endothermic reaction (Boonchom 2008). Positive value of  $\Delta G$  showed that dehydration process of  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$  was non-spontaneous processes and were necessary to connect with the introduction of heat. The positive value  $\Delta S$  can be interpreted as the decomposition of a malleable complex which means a fast step (Lopez et al., 2015; Naqvi et al., 2018; Boonchom, 2008).

## CONCLUSION

Crystal water of magnesium phosphate hydrate ( $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ ) removed by a single step between the temperatures of 40 and 200 $^{\circ}$ C and the heat-treated product was  $Mg_3(PO_4)_2$ , significant for its optical and electrical applications. Dehydration process was studied using Coats-Redfern non-isothermal kinetic method and activation energies determined for the different mechanism models. Mechanism models of chemical reaction order (1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup>), diffusion (one dimensional and two dimensional) and phase interfacial reaction (shrinkage geometrical column and shrinkage geometrical spherical) were applied. According to the higher linearity in thermal calculations correlation, reaction mechanism can be explained with the 3<sup>rd</sup> order chemical reaction (F3) for the one-step dehydration reaction of  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 22H_2O$ . The thermodynamic functions ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) of the dehydration reaction were calculated by the activated complex theory and found that the process was endothermic, non-spontaneous and fast.

## REFERENCES

- Aramendia MA, Borau V, Jimenez C, Marinas JM, Romero FJ 1999. Synthesis and characterization of magnesium phosphates and their catalytic properties in the conversion of 2-hexanol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 217: 288–298.
- Assaaoudi H, Fang Z, Butler IS, Ryan DH, Kozinski JA 2007. Characterization of a new magnesium hydrogen orthophosphate salt,  $Mg_{3.5}H_2(PO_4)_3$ , synthesized in supercritical water. *Solid State Sciences* 9: 385 – 393.
- Boonchom B 2008. Kinetics and Thermodynamic Properties of the Thermal Decomposition of Manganese Dihydrogenphosphate Dihydrate. *Journal of Chemical Engineering Data*, 53: 1533–1538.
- Boonchom B 2009. Kinetic and thermodynamic studies of  $MgHPO_4 \cdot 3H_2O$  by non-isothermal decomposition data. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 98: 863–871.
- Boonchom B, Danvirutai C 2008. A simple synthesis and thermal decomposition kinetics of  $MnHPO_4 \cdot H_2O$  rod-like microparticles obtained by spontaneous precipitation route. *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, 10(3): 492 – 499.
- Boonchom B, Puttawong S 2010. Thermodynamics and kinetics of the dehydration reaction of  $FePO_4 \cdot 2H_2O$ , *Physica B*, 405: 2350–2355.
- Debnath S, Saxena SK, Nagabhatla V 2016. Facile synthesis of crystalline nanoporous  $Mg_3(PO_4)_2$  and its application to aerobic oxidation of alcohols. *Catalysis Communications* 84: 129–133.
- Gopinath P, Ramalingam V, Breslow R 2015. Magnesium pyrophosphates in enzyme mimics of nucleotide synthases and kinases and in their prebiotic chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 112(39): 12011–12014.
- Kanazawa T, Umegaki T, Shimizu M 1979. The synthesis of  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$  and its polymorphism. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 52(12): 3713–3717.
- Kongshaug KO, Fjellvag H, Lillerud 2001. The synthesis and crystal structure of a hydrated magnesium phosphate  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ . *Solid State Sciences*, 3: 353–360.
- Lopez FA, Tayibi H, Diaz IG, Alguacil FJ 2015. Thermal dehydration kinetics of phosphogypsum. *Materiales de Construction*, 65(319): 1-14.
- Lu X, Chen B 2016. Experimental study of magnesium phosphate cements modified by metakaolin. *Construction and Building Materials*, 123: 719–726.
- Mousa S 2010. Study on synthesis of magnesium phosphate materials. *Phosphorus Research Bulletin*, 24: 16 – 21.
- Naqvi SR, Tariq R, Hameed Z, Ali I, Naqvi M, Chen WH, Ceylan S, Rashid H, Ahmad J, Taqvi SA, Shahbaz M 2018. Pyrolysis of high ash sewage sludge: kinetics and thermodynamic analysis using Coats-Redfern method, *Renewable Energy*, (*In Press*) doi: 10.1016/j.renene.2018.07.094
- Pokorny P, Tej P, Szlag P 2016. Discussion about magnesium phosphating. *Metalurgija*, 55(3): 507–510.
- Qiao F, Chau CK, Li Z 2010. Property evaluation of magnesium phosphate cement mortar as patch repair material. *Construction and Building Materials*, 24: 695–700.
- Rouzić M, Chaussadent T, Platret G, Stefan L 2017. Mechanisms of k-struvite formation in magnesium phosphate cements. *Cement and Concrete Research*, 91: 117–122.
- Sadiq M, Abdennouri M, Barka N, Baalala M, Lamonier C, Bensitel M 2015. Influence of the Crystal Phase of Magnesium Phosphates Catalysts on the Skeletal Isomerization of 3,3-dimethylbut-1-ene. *Canadian Chemical Transactions*, 3(2): 225–233.
- Sadiq M, Bensitel M, Lamonier C, Leglise J 2008. Influence of the nature of precipitating basic agent on the synthesis of catalytic magnesium phosphate materials. *Solid State Sciences*, 10: 434–437.
- Sronsri C, Boonchom B 2018. Determination of thermokinetic parameters and thermodynamic functions from thermoforming of  $LiMnPO_4$ . *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 134(3): 1575 – 1587.
- Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C 2008. Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4: 1873–1884.
- Yang Q, Zhu B, Wu X 2000. Characteristics and durability test of magnesium phosphate cement-based material for rapid repair of concrete. *Materials and Structures*, 33: 229–234.
- Yu C, Wu Q, Yang J 2017. Effect of seawater for mixing on properties of potassium magnesium phosphate cement paste. *Construction and Building Materials*, 155: 217–227.
- Yu X, Jiang J 2018. Mineralization and cementing properties of bio-carbonate cement, bio-phosphate cement, and bio-carbonate/phosphate cement: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 21483–21497.
- Yu XN, Qian CX, Sun LZ 2016. Chemosynthesis of nano-magnesium phosphates and its characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 11(4): 1099–1103.

- Zhang S, Li L, Lv X 2016. Synthesis and characterization of a novel  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  ceramic with low dielectric constant. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, DOI: 10.1007/s10854-016-5703-y
- Zhang Z, Tang W 2015. Tunable Blue–Red Emission and Energy-Transfer Properties of  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2:\text{Eu}^{2+},\text{Mn}^{2+}$  Phosphors. *Euroopen Journal of Inorganic Chemistry*, 2015: 3940–3948.
- Zhou H, Luchini TJF, Bhaduri SB 2012. Microwave assisted synthesis of amorphous magnesium phosphate nanospheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23:2831–2837.

DRAFT

## Gamet ve Embriyo Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Başak Büyük<sup>1\*</sup>, Hüseyin Avni Eroğlu<sup>2</sup>, Cemre Aydeğer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: drbasakbuyuk@hotmail.com

### Özet

İnsan oositlerinin, zigotların, bölünme aşamasındaki embriyoların ve blastokistlerin dondurularak saklanması, insan in vitro fertilizasyonu-embriyo transferi (IVF-ET) programının tamamlayıcı bir bölümü haline gelmiştir. Bu işlem oositler, sperm ve döllenmiş embriyolar üzerinde uygulanabilmekte ve tüm bu sayılan yapıların başarılı bir şekilde uzun süreler boyunca saklanmasını sağlayabilmektedir. Kriyoprezervasyonda, kriyoprotektanlar denen bir grup bileşik kullanılmaktadır. Bunlar farklı içerikleri olan maddelerdir ve görevleri dondurma, saklama ve çözme esnasında hücreyi soğuk şok hasarından korumaktır. Oosit, sperm ve embriyo gibi farklı yapıların kriyoprezervasyonunda birbirinden farklı kriyoprotektanlar kullanılmakta olup, hangisinin tercih edileceği dondurulmak istenen yapının özelliklerine bağlıdır. Kriyoprotektanlar; alkoller (etanol, propanol, metanol, 1,2 propanediol ve gliserol), dimetilsülfoksit (DMSO) ve şekerler (glikoz, laktoz, sükröz ve nişasta) olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilirler. Kriyoprotektanlar intrasellüler ve ekstrasellüler ajanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. İntrasellüler ajanlar kutuplaşma ve lipofilik özellikleri hücre içine geçiş hızlarını etkileyen küçük moleküllerdir. Bu ajanlar ile hücre, solüsyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. Ekstrasellüler ajanlar olarak monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritler sayılabilir. Tek başlarına kullanılmamakla birlikte ozmotik farklılıklarının oluşturacağı zarara karşı koruyucudurlar. Bu çalışmanın amacı, IVF laboratuvarlarında uygulanan kriyoprezervasyon işleminin sperm, oosit ve embriyo üzerinde uygulanma yollarının ve kullanılan kriyoprotektanların özelliklerinin ortaya konması, bu şekilde embriyoloji laboratuvarlarında uygulama basamaklarına ve yöntem seçimlerine ışık tutmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** kriyoprezervasyon, embriyo, oosit, sperm, kriyoprotektan

### Gamete and Embryo Cryopreservation Methods

#### Abstract

Freezing storage of human oocytes, zygotes, cleavage embryos, and blastocysts has become an integral part of the human in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) program. This process can be performed on oocytes, sperm and fertilized embryos, and it is possible to successfully store all these counted structures for long periods of time. In cryopreservation, a group of compounds called cryoprotectants are used. These are substances with different contents and their function is to protect the cell from cold shock damage during freezing, storage and thawing. Different cryoprotectants are used in the cryopreservation of different structures such as oocytes, sperm and embryos, which will be preferred depends on the characteristics of the structure to be frozen. Cryoprotectants; alcohols (ethanol, propanol, methanol, 1,2 propanediol and glycerol), dimethylsulfoxide (DMSO) and sugars (glucose, lactose, sucrose and starch). Cryoprotectants are divided into intracellular and extracellular agents. Intracellular agents are small molecules whose polarization and lipophilic properties affect their rate of passage into cells. With these agents, the cell can be protected from the detrimental effects of solutions. Extracellular agents include monosaccharides, disaccharides and trisaccharides. Although not used alone, they are protective against the harm caused by osmotic differences. The aim of this study is to reveal the ways of applying the cryopreservation process in IVF laboratories on sperm, oocyte and embryo and the properties of the cryoprotectants used, thus shedding light on the application steps and method selection in embryology laboratories.

**Keywords:** Cryopreservation, embryo, oocyte, sperm, cryoprotectan

### GİRİŞ

Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonu, in vitro fertilizasyon (IVF) ünitelerinde, dünya çapında giderek artan sayıda doğumun gerçekleşmesini sağlayan kilit bir yardımcı prosedürdür. Kriyoprezervasyon kümülatif canlı doğum oranını artırır ve hasta senkronizasyonuna ve tıbbi risklerin daha iyi yönetilmesine olanak tanıyan donör bankaların oluşturulmasını teşvik eder. Ayrıca kanser, otoimmün hastalıklar, yumurtalık yetmezliğine neden olan tıbbi durumlar ve hematopoetik kök hücre nakli gibi tıbbi nedenlerle yumurtaları dondurmak isteyen kadınlarda en etkin teknik olarak kabul edilmektedir. Kadınlarda üreme özerkliğine olanak tanıyan ve yaşa bağlı doğurganlık düşüşünün bilincinde olan ancak gebelik için hazır olmayan kadınlarda elektif doğurganlık korunması için kullanılabilen bir yöntemdir (Iussig ve ark., 2019).

Kriyoprezervasyon ilk kez İtalya'da 1776 yılında hayvan spermelerinin yavaş dondurulması yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 1938 yılında dondurulan spermelerde hareketlilik tespit edildiği yayınlanmıştır. İnsanlarda ise IVF sonrası dondurulup çözülen embriyolarda ilk gebelik 1983 yılında elde edilmiş ve ilk doğum 1984 yılında gerçekleşmiştir. Bunu 1996 yılında matür ve 1999 yılında immatür oositlerin kriyoprezervasyonunu takiben mikroenjeksiyon uygulamasıyla gerçekleşen gebelikler izlemiştir (Argyle ve ark., 2016).

İnsan oositlerinin kriyoprezervasyonu embriyo dondurma işlemlerine alternatif olarak; doğabilecek etik ve legal sorunların çözümü için geliştirilmiştir. Buna ek olarak prematür over yetmezliği, pelvik hastalıklar, ameliyat ve kemoterapi/radyoterapi uygulamaları nedeniyle üreme kapasitesini kaybetme riski olan kadınlarda tek çözüm olarak önerilmektedir.

### **KRİYOPREZERVASYON PROSEDÜRÜ**

Kriyoprezervasyon prosedüründe beş önemli aşama vardır. Bunlar:

- i) su kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla ilk etkileşim,
- ii) sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma,
- iii) saklama,
- iv) çözme,
- v) dilüsyon,
- vi) kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması,
- vii) fizyolojik mikro çevreye geri dönüş
- viii) ileri gelişim olarak sıralanabilir (Delibaşı, 2008).

### **KRİYOPROTEKTAN MADDELER**

Kriyoprotektanlar farklı içerikleri olan maddelerdir. Görevleri dondurma, saklama ve çözme esnasında hücreyi soğuk şok hasarından korumaktır. Yüksek oranda hidrojen bağlama yeteneğine sahiptirler. Membran geçirgenliğine bağlı olarak hücre içine, suya göre daha yavaş geçerler. En sık kullanılan kriyoprotektanlar; alkoller (etanol, propanol, metanol, 1,2 propanediol ve gliserol), dimetilsülfoksit (DMSO) ve şekerler (glikoz, laktoz, sükroz ve nişasta) olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilirler (Baust ve ark., 2017).

Kriyoprotektanlar intrasellüler ve ekstrasellüler ajanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. İntrasellüler ajanlar kutuplaşma ve lipofilik özellikleri hücre içine geçiş hızlarını etkileyen küçük moleküllerdir. Bu ajanlar ile hücre, solüsyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. Ekstrasellüler ajanlar olarak monosakkaritler, disakkaritler ve trisakkaritler düşünülmektedir. Tek başlarına kullanılmamakla birlikte ozmotik farklılıklarının oluşturacağı zarara karşı koruyucudurlar (Delibaşı, 2008).

DMSO molekül ağırlığı düşük bir maddedir. Toksikitesi diğer kriyoprotektanlara göre daha fazla olup bu etki, ısının düşürülmesi ile azaltılamaz.

Gliserol ve 1,2 propanediol da düşük ağırlıklı kriyoprotektanlardır. Toksikiteleri ısıya bağımlıdır ve ısının düşmesi ile azalır. Viskoziteleri yüksektir. İnsan ve diğer türlerde bölünme dönemindeki embriyo ve blastosistlerin dondurulmasında en çok kullanılan kriyoprotektanlardır. Oosit canlılığı açısından da daha iyi sonuçlar elde edilmesini sağlarlar.

Sükroz diğer kriyoprotektanlar ile birlikte kullanılabilen bir kriyoprotektandır. Dilüsyon ve ani çözme fazında hücre kendini tekrar toparlayıp hidrate olurken koruyucu etki gösterir. Geçirgen kriyoprotektanları ortamdan uzaklaştırmak için kullanılabilir.

Kriyoprotektanların etkinlikleri kültür solüsyonuna eklendikleri ısı ile direkt olarak bağlantılıdır. Döllenmeyi engellemek için kriyoprotektanların solüsyonların içine 10<sup>0</sup>C'dan düşük bir ısıda eklenmesi gerekmektedir.

### **OOSİT KRİYOPREZERVASYONU**

Oosit kriyoprezervasyonunda hücre canlılığı için en kritik aşamalar; başlangıç fazından düşük sıcaklıklara iniş dönemi ve fizyolojik ortama dönüşür. Düşük sıcaklıklara ulaşıldıktan sonra (sıvı nitrojenin ısısı -196<sup>0</sup>C) bu ısıda geçen sürenin canlılık üzerine etkisi yoktur. Hücre içi buz oluşumu hücre büyüklüğüne bağlı olduğu için, hücre büyüklüğü canlılığı etkileyen en önemli değişkenlerden biridir. Yapılan çalışmalar, oosite ait sitoplazmik özelliklerin başarıyı etkileyebildiğini göstermiştir. Oositlerin kumulus ooforus ile birlikte dondurulup dondurulamayacağı konusu ise halen tartışmalı olup, yapılan araştırmaların sonuçları da çelişkilidir. Kumulus hücrelerinin olmaması halinde kriyoprotektanların oosit sitoplazmasına daha kolay ve çabuk penetre olduğu savunulmuş ve ilk gebelikler kumulus içermeyen oositlerin kriyoprezervasyonu ile elde edilmiştir. Oositler, hCG (human Chorionic Gonadotrophin) enjeksiyonundan 36-40 saat sonra toplanarak hemen ardından dondurulmalıdır. Bildirilen gebeliklerin çoğu metafaz II aşamasındaki oositlerin kriyoprezervasyonu ile elde edilmiştir (Argyle ve ark., 2016).

Oosit kriyoprezervasyonunda kullanılan kriyoprotektanlar, bunların konsantrasyonları ve oositlerin bu konsantrasyonlarda bulunma süreleri dışında başarıyı etkileyen diğer teknik değişkenler de; dondurma yöntemleri, soğutma hızı ve seedingdir. Günümüzde kriyoprezervasyonda hücre yapısının korunması



amacıyla, hücrelerin düşük hızda su kaybetmeleri için yavaş dondurma yöntemi kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar bu yöntemin olumsuz yönlerini de göstermiştir. İmmatür oositlerin donma kapasitelerinin düşük olmasından dolayı dondurma işlemi çoğunlukla metafaz II üzerinde yoğunlaşmıştır (Konc ve ark., 2014). Bundan dolayı yavaş dondurma yönteminin yerini virtifikasyon (hızlı dondurma) almıştır. Virtifikasyon yönteminde kriyoprotektanlar yüksek konsantrasyonlarda kullanılırlar ki, bu da oda ısısında toksiktir. Dolayısıyla oositler 0°C'de kriyoprotektanlara maruz kaldıklarında toksik etkileri de azaltılacaktır. Bu yöntemde yavaş dondurmada kullanılan kriyoprotektanlar kullanılmaktadır (Baust ve ark., 2017).

Dondurma sırasında aşırı soğuma (supercooling) olmadan bir an önce buz kristallerinin oluşturulması gerekmektedir ve hücrenin dehidrate olması sağlanmalıdır. Bunu sağlamak için, kriyosolüsyonların donma ısısına yakın bir noktada buz kristalleri oluşumunu başlatma işlemine **seeding** denir. Seeding ile solüsyonların hipertonic hale geçmesi sağlanır ve devam eden soğutma işlemi süresince hücrenin dehidrate olmasını kolaylaştırmaktadır.

Dondurma ve çözme işlemleri sırasında hücresel yapılarda kriyoprotektanlardan kaynaklan hasarlar meydana gelebilir ve bunlar oosite ait yapılarda gözlenir. İkinci mayoz iğciğini oluşturan mikrotübüllerin dondurma işlemi sırasında herhangi bir şekilde kaybı kromozomları ayırarak anöploidiye yol açabilir. Buz kristallerinden ya da oolemma altındaki aktin mikrofilamentleri üzerindeki kriyoprotektanlardan kaynaklanan kortikal granüllerin prematür ekzositozu görülebilmektedir. Zona pellusida memeli oositlerinde oolemma dışında bulunan, glikoproteinden meydana gelmiş bir tabakadır. Burada hasarın dondurma esnasında hücreyi hapsedip delebilecek buz içinde klivaj alanlarının ya da büyük kristallerin oluşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kriyoprezervasyon solüsyonlarına fetal sığır serumu ya da bovin serum albumini ilave edilmesinin zonayı koruyabileceği savunulmaktadır. DMSO'nun yüksek konsantrasyonda kullanılması oosit mikrofilamentlerinde hasara yol açtığı gösterilmiş ve sıfır dereceye yakın bir sıcaklıkta kullanılmasının bu etkiyi ortadan kaldıracabileceği görülmüştür. Kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen termal şokun oosit üzerinde partenogenetik aktivasyona neden olabileceği düşünülmektedir. Virtifikasyon yönteminde partenogenetik aktivasyona rastlanmamıştır.

Dondurma işlemi sırasında sıcaklığın düşmesiyle hücrede ve hücrenin içinde bulunduğu solüsyonlarda da bazı değişiklikler gerçekleşmektedir; erimiş gazların çözünürlüğü azalır, meydana gelen buz kristalleri hücre membranında majör lezyonlar oluşturabilir, dondurma solüsyonu içerisindeki tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte hücre ozmotik hale geçerek su kaybeder ve pasif dehidratasyon ve büzüşme başlar (Delibaşı, 2008). Kriyoprezervasyonda başarıyı etkileyebilecek etkenler; dondurma ve çözme hızlarının kontrolü, kullanılacak kriyoprotektan, aşırı soğumanın (supercooling) önlenmesidir.

## EMBRİYO KRİYOPREZERVASYONU

Embriyo kriyoprezervasyonu üç aşamada uygulanabilir;

1. pronukleus döneminde,
2. erken bölünme döneminde,
3. blastosist evresinde.

Zigotlarda dondurma işlemi pronukleusların halen ayrık olduğu dönemde inseminasyondan 20-22 saat sonra yapılmalıdır.

Embriyo kriyoprezervasyon protokolleri üç şekildedir. İlk yöntem olan yavaş dondurma; günümüzde insanlarda kriyoprezervasyonda yavaş yöntem alternatif dondurma protokolleri hızla geliştirilmekle beraber halen yavaş dondurma yöntemi en çok tercih edilen yöntemdir. İlk kullanılan ajan olan DMSO özellikle 3. gün embriyolarının dondurulmasında sıkça tercih edilmektedir. Embriyolar oda ısısından düşük sıcaklıklara soğutulur bu sırada aşırı soğumayı engellemek için seeding yapılır. Daha sonra hızlı bir şekilde -196°C'ye kadar düşürülür.

İkinci yöntem şok dondurma yöntemidir. İlk olarak Trounson ve Sjoblom tarafından uygulanan yöntemde embriyolar 2-3 dakika DMSO ve sükröz ile inkübe edilir. Gebelik oluşmasına ve pratik olmasına rağmen canlı doğum gerçekleşmemiştir.

Üçüncü ve son yöntem ise virtifikasyon yöntemidir. Yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanların kullanılması ile embriyoların direkt -196°C'lik sıvı nitrojene maruz bırakılmasıyla yapılır. Bu yöntemde, hücre içi suyun bir kısmının buz kristalleri şeklinde kalma ihtimali dikkate alınarak çözme işlemi de hızlı yapılmalıdır. Bu yöntemle bölünme dönemindeki embriyolarla canlılık oranları düşük olmakla birlikte, morula ve blastosistlerle daha yüksek canlılık oranları, gebelik ve doğumlar bildirilmiştir (Delibaşı, 2008).

Yavaş dondurma yapıldığında seeding büyük önem kazanmaktadır. Kurallara uygun olarak dondurma yapıldığında saklanan embriyoların 8-10 yıla kadar canlılıklarını koruyarak gebelik oluşturabildikleri

saptanmıştır. Bunun yanında embriyoyu meydana getiren blastomerlerin en az %50'sinin ve tüm embriyoların en az %65'nin canlılıklarını koruyup gelişimlerini devam ettirmeleri gerekmektedir (Edgar ve Gook, 2012). Dondurmanın yapılacağı aşamalara göre de farklı yöntemler kullanılmaktadır. Zigot dondurmada pronukleus aşamasındaki oositler genellikle PROH ve süroz kullanılarak dondurulur ve başarıyı belirleyen en önemli etken kriyoprezervasyon yapıldığı dönemdeki pronukleer gelişim evresidir. En yüksek canlılık oranları, zigotların inseminasyondan 20-22 saat sonra dondurulduğunda elde edilmektedir. Erken bölünme aşamasında embriyo dondurma IVF merkezlerinin birçoğunda kriyoprezervasyonun yapıldığı aşamadır. Bu aşamada yapılan dondurma işleminde en yüksek gebelik oranları 3. günde 8 hücreli ve 2. günde 4 hücreli aşamaya ulaşabilmiş embriyolarla elde edilmektedir. Blastosist dondurmada, blastosist aşamasındaki embriyonun erken bölünme aşamasındaki bir embriyoya göre fazla sayıda hücre içermesi nedeniyle çözme sonrasında bazı blastomerlerin canlılığını yitirmesi durumunda bile, genel canlılığını yüksek düzeyde koruyabildiği savunulmaktadır. Blastosist gelişiminde Vero-cell-ko-kültürlerinin kullanımı canlılık oranlarını yükseltmektedir. Dondurulacak embriyo sayısının elde olmayan nedenlerle çok azalması nedeniyle blastosist kriyoprezervasyonu birçok IVF merkezinde uygulanmamaktadır. Erken dönem embriyo hücre grubunda ve blastosistlerde yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanların kullanılması ve virtifikasyon tekniğinin uygulanması canlılıklarını daha iyi koruyabilmelerini sağlamaktadır. Kısaca özetlenirse; embriyo kriyoprezervasyonunun temel amacı, taze embriyoların transfer edildiği siklusa hastaya ikinci bir gebelik şansı verebilmektedir. Embriyo kriyoprezervasyonunun hangi gelişim evresinde yapılması gerektiği halen tartışmalıdır (Delibaşı, 2008).

### **SPERM KRİYOPREZERVASYONU**

Sperm kriyoprezervasyonuna bakıldığında, ilk canlı doğumun 1953 yılında yayınlanmış olduğu görülmektedir. 1980'li yıllardan itibaren semen kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesi ile yöntem, in vitro fertilizasyon uygulamalarında daha yoğun olarak kullanılmaya başlanmış, dondurulmuş spermle taze spermle kullanımına benzer fertilitite oranları bildirilmiştir. Sperm kriyoprezervasyonu donör inseminasyonlarının yanı sıra kanser tedavisinde fertilitenin korunmasında da kullanılmaktadır.

Sperm kriyoprezervasyonunda kriyoprotektan olarak ilk dönemlerde gliserol kullanılmış, sonrasında diğer bazı kriyoprotektif özellikli kimyasallar da sperm dondurma amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu kimyasallar geçirgen ve geçirgen olmayan olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İnsan sperminde en iyi sonuçlar etilen glikol ile elde edilmektedir. Çözme sonrasında canlılık oranlarını arttırmak için glisin, zwitteryon, sitrat ve yumurta sarısı gibi ek kriyoprotektan ajanların eklendiği daha kompleks solüsyonlar kullanılmaktadır.

Sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan yöntemler;

1. Manuel yöntemde semen örnekleri ejakülasyondan sonraki 1-2 saat içerisinde dondurulmalıdır. Testiküler sperm ve doku kriyoprezervasyonunda gebelik şansı artmakta ve erkeğin her denemede testis biyopsisi yaptırma gereği de ortadan kalkmaktadır.
2. Testiküler doku kriyoprezervasyonunda alınan parça bütün olarak ya da seminifer tübüllerin ayrılması sonrasında da dondurulabilir. Bu yöntem gliserol içerisinde klasik dondurma protokolleri ile gerçekleştirilebilir (Delibaşı, 2008).

### **OVER DOKUSU KRİYOPREZERVASYONU**

İlk olarak hayvanlar üzerinde yapılan over dokusu kriyoprezervasyonu ve ovaryan doku transplantasyonu çalışmaları başarıyla sonuçlanmış ve insanlarda uygulanmaya başlanmıştır. Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonuna göre bir takım avantajları bulunmaktadır. Bunlar;

1. Daha fazla primordial folikül toplanıp saklanabilmektedir.
2. Over dokusu toplanırken hormonal tedaviye ihtiyaç yoktur.
3. Kadınlarda her yaşta ve zamanda over dokusu alınıp saklanabilmektedir.

Over dokusu kriyoprezervasyonunda başarıyı etkileyebilecek bazı değişkenler; yaş, doku koleksiyonu, ideal doku büyüklüğü ve kriyoprotektan seçimidir. Yapılan araştırmalarda 35 yaşın üzerindeki kadınlardan dondurulup çözülen over dokusunda follikül oluşumunun azaldığı gözlenmiştir. Doku koleksiyonu için ise en uygun zaman erken folliküler faz olarak belirlenmiş, doku koleksiyonlarında da çok küçük parçalar halinde dondurulmaması önerilmiştir.

Kriyoprotektan seçiminde propandiol, etilen, glikol ya da DMSO ile sağlıklı sonuçlar elde edildiği kanıtlanmıştır. Günümüzde ovaryan doku kriyoprezervasyonunun gerekli olduğu düşünülen hasta gruplarında başarılı bir yöntemle uygulanması yeni noninvaziv tekniklerle mümkün olacaktır (Delibaşı, 2008).

### **SONUÇ**

Oosit, embriyo, sperm ve over dokusu kriyoprezervasyonu günümüzde kullanılan ve çeşitli nedenlerle infertilite teşhisi konmuş kişilerde bebek sahibi olmayı kolaylaştıran yöntemlerdir. Kriyoprezervasyon, farklı yöntemler ve kriyoprotektanlarla farklı evrelerde yapılabilmekle birlikte her birinin farklı bir avantajı

görülmektedir. İnfertilite açısından noninvaziv işlem uygulanması açısından da avantajlı olduğu görülmektedir. Bütün bunların sonucunda bu yöntemlerin geliştirilmesinin ve yaygınlaştırılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz.

#### **KAYNAKLAR**

- Argyle CE, Harper JC, Davies MC. 2016. Oocyte cryopreservation: where are we now?. Human reproduction update, 22(4), 440-449.
- Baust JM, Campbell LH, Harbell, JW. 2017. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 53(10), 855-871.
- Delibaşı L, 2008. "In Vitro Fertilizasyon Labortuvar Yöntemleri", Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, pp 229-250.
- Edgar DH, Gook DA. 2012. A critical appraisal of cryopreservation (slowcoolingversusvitrification) of human oocytes and embryos. Human reproductionupdate, 18(5), 536-554.
- Iussig B, Maggiulli R, Fabozzi G, Bertelle S, Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi, L. 2019. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. Actaobstetricia et gynecologica Scandinavica.
- Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S. 2014. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. BioMed research international.

## Speedy/RINGO as a neuroprotector in spinal cord injury-based neurodegeneration

Aysegul Yildiz

Mugla Sitki Kocman University, Faculty of Science, Molecular Biology and Genetics Department, Mugla, Turkey.

Corresponding author e-mail: aysegulunal@mu.edu.tr

### Abstract

Endogenous or exogenous insults can cause spinal cord injury (SCI), often resulting in the loss of motor, autonomic, sensory and reflex functions. The pathogenesis of SCI comprises two stages. The primary injury stage occurs at the moment of trauma and is characterized by hemorrhage and rapid cell death. The secondary injury stage occurs due to progression of primary damage and is characterized by tissue loss and functional disorder. One of the most important cellular mechanisms underlying secondary injury is glutamate excitotoxicity, which overactivates the calpain protease via excessive Ca<sup>2+</sup> influx and induces neuronal apoptosis via p53 induction. Furthermore, Ca<sup>2+</sup> influx elicits apoptosis by inducing p53, thus negatively affecting two pathways: the mitogenic extracellular signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase (ERK/MAPK) pathway and the survival phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway. Speedy/rapid inducer of G2/M progression in oocytes (Speedy/RINGO) is a cell cycle regulatory protein that increases survival of p53-positive mitotic cells by inhibiting the apoptotic machinery. Moreover, this protein elicits p53-dependent anti-apoptotic effects on calpain-induced degeneration of primary hippocampal neurons, amyotrophic lateral sclerosis motor neurons, and astrocytes and microglia in spinal cord lesions. The pathophysiology of SCI has not been fully elucidated and this hinders the development of powerful therapeutic strategies. This paper focuses on the cellular mechanisms underlying the anti-apoptotic effects of Speedy/RINGO and discusses how this protective function can possibly be exploited to facilitate recovery from SCI. Particular attention is paid to reversal of the negative effects on the ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways via induction of p53.

**Keywords:** Speedy/RINGO, calpain, p53, ERK/MAPK, PI3K/AKT, spinal cord injury

### INTRODUCTION

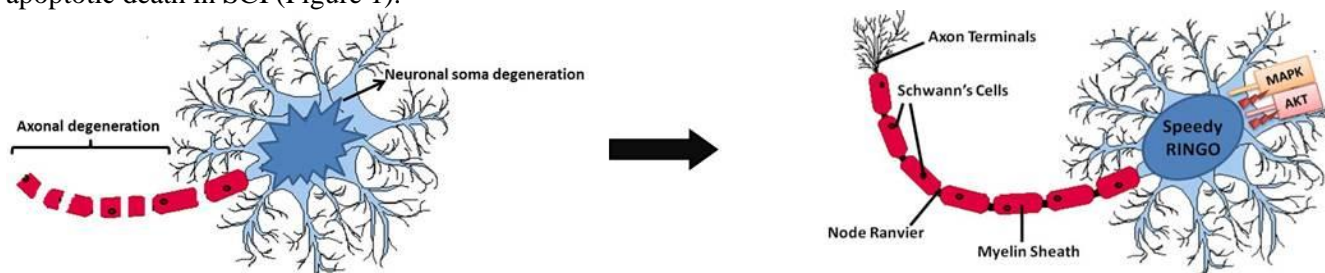
Spinal cord injury (SCI) can be defined as an endogenous or exogenous trauma resulting in the loss of motor, autonomic, sensory and/or reflex functions. SCI is a major cause of permanent disability. Researchers estimate that 230,000 people in the United States are living with an SCI, and that 10,000 new patients are diagnosed each year (Woodruff et al., 1994; Bracken et al., 1987)

The pathology of human spinal cord injury is the result of two main mechanisms known as “primary” and “secondary” injury. Primary injury begins at the moment of trauma and is characterized by hemorrhage and rapid cell death. Secondary injury is an extension of the original injury and occurs when vascular and biochemical effects cause tissue loss and functional disorders (Rossignol et al., 2007; Ray et al, 2003). It is important to state that primary injury always serves as the nidus of secondary injury. Secondary injury mechanisms primarily involve neurogenic shock, vascular damage, ischemia and hemorrhage, immunologic secondary injury, glutamate excitotoxicity and subsequent apoptosis.

Among all, the most destructive cellular mechanism underlying secondary injury is glutamate excitotoxicity, which overactivates calpain protease via excessive Ca<sup>2+</sup> influx and induces neuronal apoptosis via p53 induction (Huang et al., 2017). Furthermore, intracellular Ca<sup>2+</sup> influx has an apoptotic effect, particularly through p53 induction on mitogenic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) and survival phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathways (Xu et al., 2011). Therefore, a primary goal of SCI treatment could involve the prevention p53-induced apoptosis caused by glutamate excitotoxicity.

Speedy/rapid inducer of G2/M progression in oocytes (Speedy/RINGO) is a cell cycle regulatory protein that increases survival of p53-positive mitotic cells by inhibiting the apoptotic machinery (McAndrew et al., 2009). Moreover, this protein elicits p53-dependent anti-apoptotic effects on calpain-induced degenerating primary hippocampal neurons (Yildiz Ünal et al., 2012), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) motor neurons (Wang et

al., 2019) and in astrocytes and microglia in spinal cord lesions (Huang et al., 2009). In addition, evidence from breast and testis cancer studies strongly implicates the direct or indirect interaction of Speedy/RINGO as a p53-dependent anti-apoptotic factor for ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways (Liu et al., 2010; Golipour et al., 2008). These findings strongly suggest a role for Speedy/RINGO as a shield against p53-mediated apoptotic death in SCI (Figure 1).



**Figure 1.** A schematic diagram for the proposed mechanism of anti-apoptotic action of Speedy/rapid inducer of G2/M progression in oocytes (Speedy/RINGO) on mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (AKT) signaling cascades in degenerating neurons.

As yet, there is not any proven treatment regimen for SCI probably due to its lesser known pathophysiology. Revealing cellular mechanisms of SCI and correlating them with the clinical symptoms are of primary importance for developing effective SCI recovery treatments. In this regard, this paper focuses on the underlying molecular mechanisms of Speedy/RINGO's anti-apoptotic function by correlating these mechanisms with the complex pathophysiology of SCI. Furthermore, this paper discusses how this protective function could possibly be exploited to facilitate recovery from SCI. Particular attention is paid to reversal of the negative effects on the ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways via induction of p53. This new approach may assist in identifying the most promising molecular targets for effective treatment modalities and may also uncover the molecular basis of SCI.

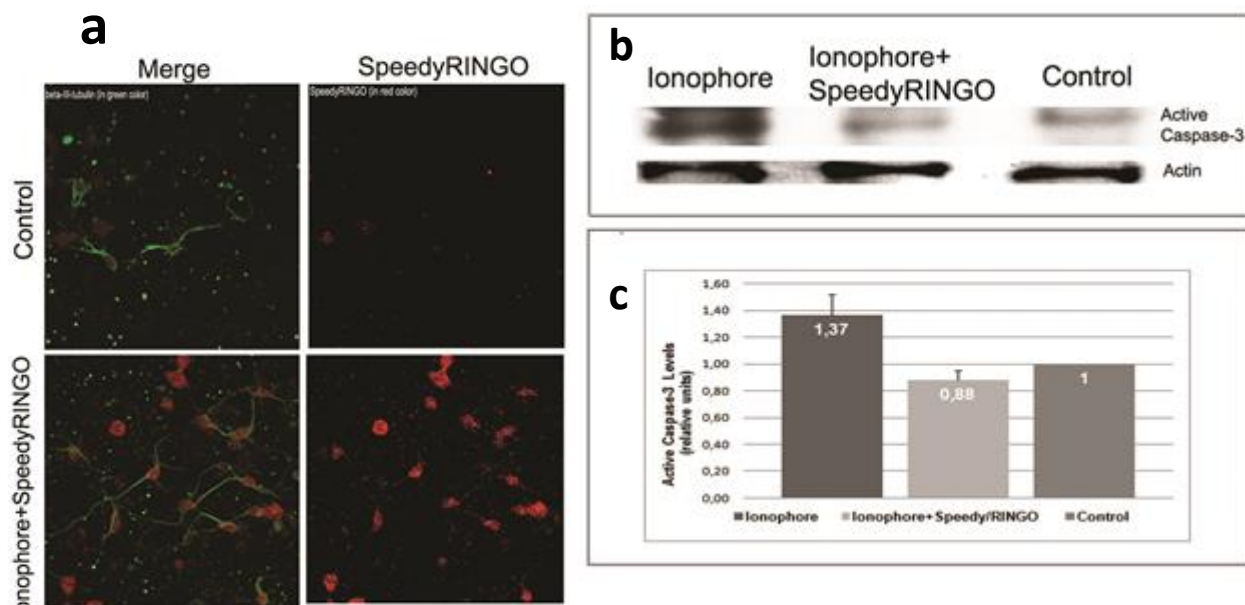
## MATERIALS AND METHODS

In order to prevent p53 mediated apoptosis in degenerating neurons, one possible way would be to transfect non-mitotic neurons with Speedy/RINGO. For this aim, our laboratory designed *in vitro* experiments utilizing primary hippocampal neurons from post-natal (PN0) Sprague-Dawley rats. These neurons were transfected with Speedy/RINGO by electroporation. After transfection, calpain was induced using calcium ionophore A23187, facilitating extracellular Ca<sup>2+</sup> transport into the neurons (Yıldız Ünal et al., 2012).

Furthermore, in order to reveal exact mechanism for this protective role of Speedy/RINGO in p53-mediated apoptosis, our laboratory is currently investigating the function of Speedy/RINGO on the ERK/MAPK and PI3K/ AKT pathways which are the most potent downstream targets, using undifferentiated p53- and Speedy/RINGO-expressing neuronal-like neuroblastoma cells. For this purpose, ERK/MAPK signaling cascade was inhibited in SH-SY5Y neuroblastoma cells by U0126 selective inhibitor and downstream effects of this inhibition on Speedy/RINGO expression and PI3K/AKT phosphorylation levels were evaluated by Western blotting. In addition, Speedy/RINGO was silenced using siRNA gene silencing method to be able to see the effect of this silencing on ERK/MAPK and PI3K/AKT signaling cascades. Results were evaluated by Western blotting using appropriate antibodies. For all experimental conditions, cell survival rates were measured by MTS cell viability test.

## RESULTS

Results of our study with primary hippocampal neurons showed for the first time that Speedy/RINGO, a mitotic cell-specific protein, is protective against p53-mediated apoptosis in non-mitotic neurons. Calpain induction by A23187 was shown to drive neurons into apoptosis by increasing p53 expression and activating caspase-3, which is a typical characteristic of caspase-dependent apoptosis. However, overexpression of Speedy/RINGO in calpain-induced neurons prevented caspase-3 activation in a p53-dependent manner (Figure 2) (Yıldız Ünal et al., 2012).



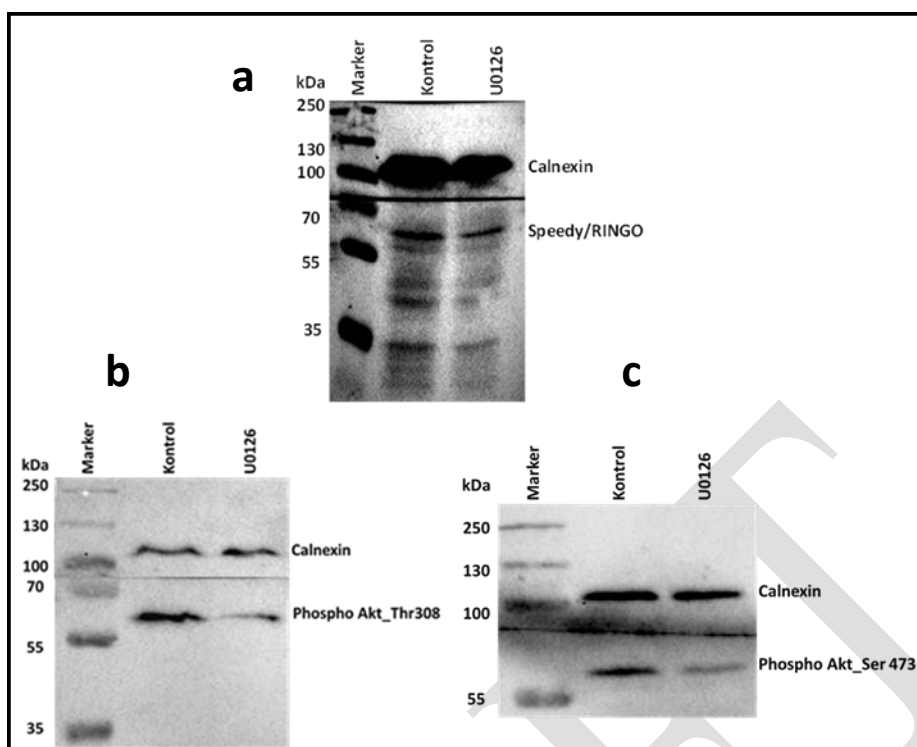
**Figure 2. a)** Successful expression of SpeedyRINGO in transfected neurons. Beta- III-Tubulin and

Speedy/RINGO expression in control (upper panel), SpeedyRINGO expressing ionophore-treated (lower panel) neurons. b) Results of western blotting for active caspase-3. Change in active caspase-3 protein level in SpeedyRINGO expressing neurons. c) Graph indicating quantitative analysis of signals in Panel A. Results were represented as fold change. Bar represents mean values  $\pm$  SD. (Yildiz-Ünal et al., 2012).

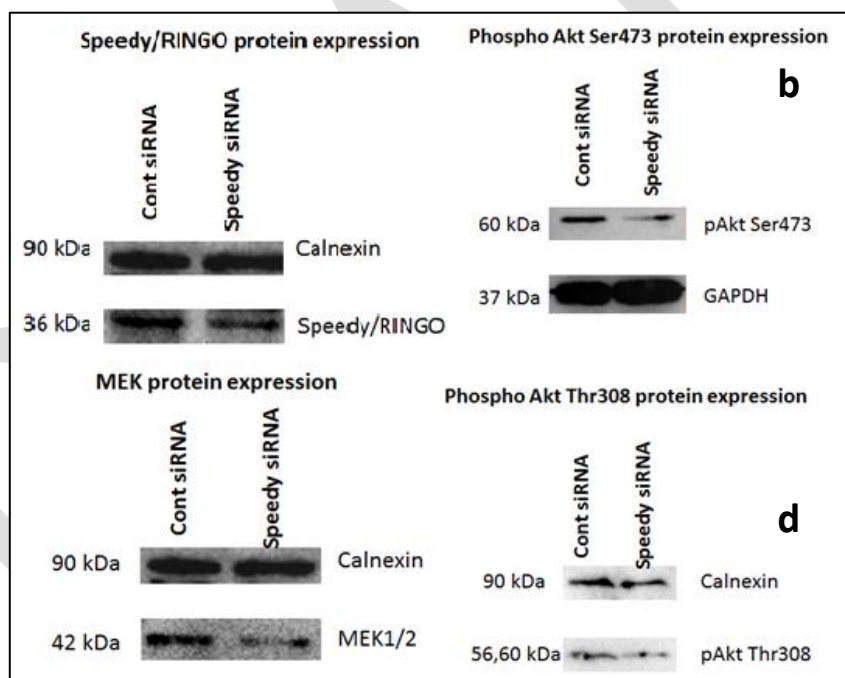
Even though the exact mechanism for the protective role of Speedy/RINGO in p53-mediated apoptosis requires further analysis, the effects are not due to the direct inhibition of calpain activity or p53 induction, as calpain-mediated p53 induction was maintained even in the presence of Speedy/RINGO (Yıldız Ünal et al., 2012). The mechanism may instead occur downstream from the p53 activation. In addition to the aforementioned studies on degenerating primary neurons, results of carcinogenic (Liu et al., 2010; Golipour et al., 2008) and astrocytic (Huang et al., 2009; Ito et al., 2009) proliferation studies point out that, among the downstream targets of p53, ERK/MAPK and PI3K/AKT, signaling cascades are the most potent in terms of clarifying the p53-dependent anti-apoptotic mechanism of Speedy/RINGO.

In order to investigate the function of Speedy/RINGO on the ERK/MAPK and PI3K/ AKT pathways, undifferentiated p53- and Speedy/RINGO-expressing neuronal-like neuroblastoma cells were utilized. Preliminary data give remarkable clues indicating that Speedy/RINGO plays an essential role on the regulation of ERK/MAPK and PI3K/AKT signaling pathways that directly affect the apoptotic state and survival rate of neuroblastoma cells. More precisely, inhibiting ERK/MAPK signaling cascade by U0126 altered Speedy/RINGO expression and AKT phosphorylation levels (Figure 3).

Moreover, downregulating Speedy/RINGO gene significantly alters expression levels and phosphorylation states of certain members of the ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways (Figure 4). This, in turn, leads to apoptotic death of neuroblastoma cells, likely due to the absence of Speedy/ RINGO's regulatory function on these two pathways.



**Figure 3.** Results of western blotting for Speedy/RINGO (a), Phospho-AKT\_Thr308 (b) and Phospho-AKT\_Ser 473 (c) protein levels after U0126 treatment (17/023 BAP AR-GE, unpublished data).



**Figure 4.** Results of western blotting for Speedy/RINGO (a), Phospho-AKT\_Ser 473 (b), MEK1/2 (c), Phospho-AKT\_Thr308 (d) protein levels after siRNA silencing of Speedy/RINGO (17/023 BAP AR-GE, unpublished data).

## DISCUSSION

The goal of our laboratory is to elucidate and prevent the pro-apoptotic intracellular Ca<sup>2+</sup> deregulation in neurons. We are therefore optimistic about Speedy/RINGO, a novel cell cycle regulatory protein proven to have a p53-dependent anti-apoptotic function in different cell types, including U2OS osteosarcoma cells (McAndrew et al., 2009) as well as calpain-induced degenerating primary hippocampal neurons (Yıldız Ünal et al., 2012). These findings indicate that Speedy/RINGO plays a protective role in both ALS motor neurons and in degenerating primary hippocampal neurons. This implies a potential therapeutic role for oncogenic proteins in neurodegenerative conditions such as SCI.

Although the mechanism of Speedy/RINGO's anti-apoptotic function in degenerating neurons is not yet known, Speedy/RINGO most probably exhibits its protective function on downstream targets of p53, rather than on p53 levels directly (Yıldız Ünal et al., 2012). ERK/MAPK and PI3K/AKT survival pathways are the most important downstream targets of p53 in cases of neurodegeneration, and Speedy/RINGO has been shown to act on both pathways by studies conducted in our laboratory. By exploring this interaction and revealing the possible regulatory function of Speedy/RINGO on these pathways, our ultimate aim is to help to someday reverse the p53-induced apoptotic effect observed in SCI.

## CONCLUSION

Overexpressing Speedy/RINGO in *in vitro* and *in vivo* SCI models and exploring its effects will provide important insights about underlying molecular mechanisms of secondary injury. One goal is to study the abnormal regulation of ERK/MAPK and PI3K/AKT pathways by transcription factor p53, one of the primary initiators of secondary injury.

As described, we believe that Speedy/RINGO is likely to exhibit anti-apoptotic activity in the neuron and glia cells of areas affected by SCI, making this protein a strong potential candidate for therapeutic treatment of SCI patients. In order to confirm the presumed anti-apoptotic function of Speedy/RINGO in SCI, further studies should be performed with both *in vivo* and *in vitro* SCI models.

The pathophysiology of SCI has not yet been fully elucidated, making it difficult to develop effective treatment methods. Overcoming this problem will require collaboration between basic and clinical researchers. Basic research must take place to gain a clear understanding of the basic neuronal and glial mechanisms seen in SCI before these mechanisms can be linked to clinical SCI symptoms and recovery. Versatile molecules like Speedy/RINGO are an excellent tool for increasing our understanding of the molecular mechanisms of SCI with the goal of developing effective treatment strategies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Studies mentioned here that were performed in our laboratory were supported by grants to Ayşegül Yıldız from Mugla Sitki Kocman University Scientific Research Project Office, Research and Development Projects (17/023), to Arzu Karabay from The Turkish Academy of Sciences Distinguished Young Scientist Award (TÜBA-GEBIP), and The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK), The Basic Sciences Research Group (TBAG) (108T811).

We sincerely thank Prof. Arzu Karabay for her invaluable contributions as an advisor to our studies on primary hippocampal neurons. We are grateful to Prof. Daniel J. Donoghue for his generous gift of myc-tagged Speedy A-pCS3 construct for neuronal transfection studies.

## REFERENCES

- Bracken MB, Freeman DH, Hellenbrand K 1981. Incidence of acute traumatic spinal cord injury in the United States, 1970-1977. *Am J Epidemiol*, 113:615-22.
- Golipour A, Myers D, Seagroves T, Murphy D, Evan GI, et al. 2008. The Spy1/RINGO family represents a novel mechanism regulating mammary growth and tumorigenesis. *Cancer Res*, 68:3591-600.
- Huang Y, Liu Y, Chen Y, Yu X, Yang J, et al. 2009. Peripheral nerve lesion induces an up-regulation of Spy1 in rat spinal cord. *Cell Mol Neurobiol*, 29:403-11.
- Huang H, Liu H, Yan R, Hu M 2017. PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following, rat facial nerve axotomy. *Neurochem Res*, 42:3515-24.
- Ito M, Natsume A, Takeuchi H, Shimato S, Ohno M, et al. 2009. Type I interferon inhibits astrocytic gliosis and promotes functional recovery after spinal cord injury by deactivation of the MEK/ERK pathway. *J*



Neurotrauma, 26:41-53.

Liu ML, Cheng YM, Jia MC 2010. LM23 is essential for spermatogenesis in *Rattus norvegicus*. *Front Biosci*, 2:187-94.

McAndrew CW, Gastwirt RF, Donoghue DJ 2009. The atypical CDK activator Spyl regulates the intrinsic DNA

damage response and is dependent upon p53 to inhibit apoptosis. *Cell Cycle*, 8:66-75.

Ray SK, Hogan EL, Banik NL 2003. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: Neuroprotection with calpain inhibitors, *Brain Res Rev*, 42:169-85.

Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings G 2007. Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci*, 27:11782-92.

Wang XD, Zhu MW, Shan D, Wang SY, Yin X, et al. 2019. Spyl, a unique cell cycle regulator, alters viability in ALS motor neurons and cell lines in response to mutant SOD1-induced DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 74:51-62.

Woodruff BA, Baron RCA 1994. Description of nonfatal spinal cord injury using a hospital-based registry. *Am J Prev Med*, 10:10-4.

Xu B, Chen S, Luo Y, Chen Z, Liu L, et al. 2011. Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One*, 6:e19052.

Yıldız Ünal A, Korulu Ş, Karabay A 2012. SpeedyRINGO inhibits calpain-directed apoptosis in neurons, *J Alzheimers Dis*, 31:779-91.

## Environmental effects of micropollutans

Sakine Ugurlu Karaağaç

Karabuk University, Engineering Faculty, Environmental Engineering Department,  
Karabuk, TURKEY

Corresponding author e-mail: sakineugurlu@karabuk.edu.tr

### Abstract

Population of the world is growing rapidly. In order to feed and accommodate this increasing population, industry is also growing. Growing industry has caused chemicals to enter our lives. However, this has, on the one hand made life easier for people, while on the other hand, it has costed our health and cost an expensive life. Today's, one of these problems is mikropollutans. The source of micropollutans are different. Micropollutans consist of pharmaceuticals, personal care products, steroid hormones, industrial chemicals, pesticides, polyaromatic hydrocarbons and other recently seen compounds. These contaminants are commonly found in very low concentration in different water bodies ranging from a few ng/l to several  $\mu\text{g} / \text{l}$ . Micropollutans, also called as emerging contaminants arise from natural substances and increasing variety of anthropogenic events. Drug or its metabolites are excreted out of the body with urine or feces. These are particularly effective for living organisms, because they are biologically active compounds. There are great number of micropollutans whose effects on living organisms are still unknown, besides the known negative effects of micropollutans. That's why, removing of these compounds is very important both to protect environmental ecosystem and human health. The occurrence of micropollutans with a significant levels in aquatic environments disrupt the aquatic ecosystems with a number of adverse effects including short-term and long-term toxicity such as endocrine disrupting effects. Considering that the conventional methods are insufficient for removing the micropollutans other alternative treatment methods including coagulation, flocculation, activated carbon adsorption, advanced oxidation processes (AOPs), membrane processes and membrane bioreactor can be applied for better removal. In recent years, Advanced Oxidation Processes (AOPs) have been frequently used for the treatment of xenobiotic residual pharmaceuticals which cannot be treated by conventional treatment methods. AOPs can easily degrade various micropollutans which resist to biological degradation and increase the biological treatment capacity of wastewater. AOPs includes some processes such as sonolysis, ozonation and membran filtration. As a result, removing these compounds is of a great importance both to protect environmental ecosystem and human health.

**Keywords:** Micropollutans, environmental effect, health effect, removal

### INTRODUCTION

Growing industry has caused chemicals to enter our lives. However, this has, on the one hand, made life easier for people, while on the other hand, it has costed our health and cost an expensive life. The first reports on pharmaceuticals in wastewater effluents and surface waters were published in the United States in the 1970s (Kim and Zoh, 2016). It is now well established that pharmaceuticals and human hormones are common contaminants of wastewater effluents. General definition of pollutant is molecule whose presence in the environment causes problems. Today's, one of these problems is mikropollutans. Micropollutans is a molecule whose concentration is very weak in water, soil or air. The source of micropollutans are different. Micropollutans consist of pharmaceuticals, personal care products, steroid hormones, industrial chemicals, pesticides, poly aromatic hydrocarbons and other recently seen compounds. These contaminants are commonly found in very low concentration in different water bodies ranging from a few ng/l to several  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Micropollutans, also called as emerging contaminants arise from natural substances and increasing variety of anthropogenic events. Drug or its metabolites are excreted out of the body with urine or feces. These are particularly effective for living organisms, because they are biologically active compounds. Besides the known negative effects of micropollutans, there are great number of micropollutans whose effects on living organisms are still unknown.

## SOURCES OF MICROPOLLUTANTS

Micropollutants are released from products that are used daily, such as pharmaceuticals, personal care products, steroid hormones, industrial chemicals, dyes and microplastics from textiles, pesticides, polyaromatic hydrocarbons, hormones and other recently seen compounds. Pharmaceuticals and personal hygiene products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) are among the most frequently detected anthropogenic contaminants in water. These contaminants are commonly found in very low concentration in different water bodies ranging from a few ng/l to several µg/l. Residue from such products appear in almost all water bodies.

Hazardous micropollutant, formed during domestic usage of electronics, hygiene and cosmetic products, textiles and pharmaceuticals, normally reach the wastewater treatment plants. Various other sources of these micropollutants are surface run-off from agricultural areas, industrial discharge and stormwater run-off from the cities.

Investigations have attributed 70% of the pharmaceutical residue found in the wastewater to household use; another 20% is attributed to livestock farming. Of the remaining 10%, 5% is attributed to hospital effluent, and the other 5% is due to runoff from non-specific sources. However, these figures could vary highly in different parts of various countries.

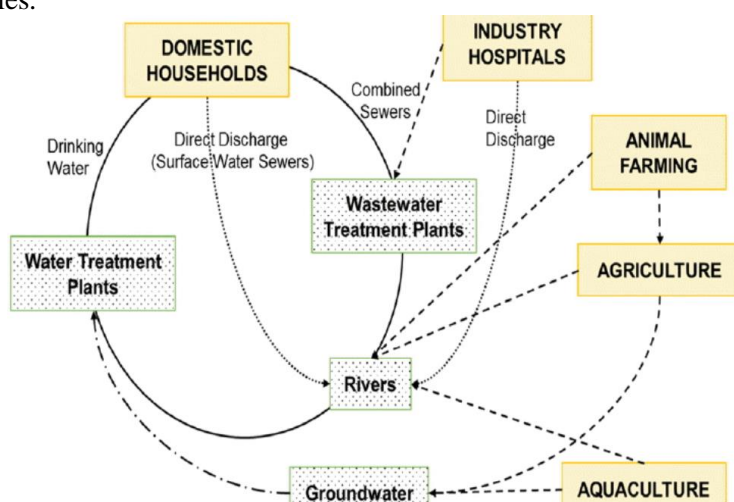


Figure 1. Sources and pathways pharmaceuticals and personal hygiene products in the urban water cycle (Ellis, 2016) .

Whatever the source of these micropollutants, they reach the water resources as they are persistent and non-biodegradable, which means that when released into the nature, these contaminants pass through the soil and ultimately reach the groundwater. When they reach the wastewater treatment plants, a major portion of these micropollutants are released along with wastewater effluents and reach the surface water. Figure 1 shows the sources and pathways of pharmaceuticals and personal hygiene products in the urban water cycle (Ellis, 2016).

## IMPACTS OF MICROPOLLUTANTS ON THE ENVIRONMENT

The environmental impact of the micropollutants depends on their concentrations, persistence and accumulation tendency in living organisms. The impact can be chronic or acute and is to be expected on individual organisms or community and ecosystem level. In general, chronic effects occur at lower concentrations than acute effects.

The effects of micropollutants in aquatic ecosystem are not very well known yet. However, there are clear indications for their significant impact potential, particularly considering the long-term impacts. Reasons for this are (1) their potential to accumulate into aquatic organisms and human bodies (bioaccumulation), (2) their toxicity and (3) their resistance to degradation in the environment (persistence). Regulations on their emission and discharge are thus decisive for improving the aquatic environment and surface water quality (Antakyali and Morgenschweis, 2015). Regarding the known effects of micropollutants and the expected future developments such as increased consumption of the chemicals associated with the demographic rise of countries, intensified actions will be taken towards minimising the release of micropollutants into surface water bodies (ARGE KOM-M.NRW, 2015).

In recent years, pharmaceuticals in water have received growing attention from environmental and health agencies all over the world and have become one of the emerging pollutants due to their frequent detection in the water environment (Kumar et al., 2010). Table 1 gives an overview on the known effects of Micropollutants.

Table 1. Overview on the impact of selected micropollutant groups on living organisms (Antakyalı and Morgenschweis, 2015)

Group	Class	Examples of specific effects
Pharmaceuticals	Antibiotics	- Inhibition of growth of certain (micro)algae in 72 and 96 h experiments starting at 6 µg/L (Santos <i>et al.</i> , 2010; Kümmerer, 2009) - Effects on nitrification activity (at 9 mg/L) (Klaver and Matthews, 1994) - Effects on reproduction, hatching and viability of juvenile stages of crustaceans (e.g. water fleas) at conc. < 1 mg/L (Kümmerer, 2009) - Secondary effects in crustaceans by alteration of associated microbiota due to effects of antibiotics (Kümmerer, 2009)
	Antihistamines	- Effects on activity and behavior (reduced fleeing response) of damselfly larvae starting at concentrations of 0.4 µg/L, due to neurotransmitter-like behavior of antihistamines (Jonsson <i>et al.</i> , 2014)
	Antidepressants and anti-anxiety medication Anti-inflammatory drugs	- Behavioral changes in fish at environmentally relevant concentrations: e.g. aggressive behavior and increased activity in perch exposed to 1.8 µg oxazepam/L; impact on mating behavior of fathead minnows starting at conc. of 1 µg Prozac/L (Brodin <i>et al.</i> , 2013; Weinberger and Klaper, 2014) - Cell damage in trouts after 3-week exposure to concentrations >0.5 µg diclofenac/L (Mehinto <i>et al.</i> , 2010)
Endocrine disrupting compounds	(Synthetic) hormones	- The threshold value for endocrine disrupting effects is ~ 0.5 ng 17a-ethinylestradiol/L. Effects range from lower egg production in female fish, to growth reduction, increased liver size, feminisation of young male fish to overall disruption of the natural hormonal balance. Similar effects occur in molluscs (ICPR, 2011; STOWA, 2015; Jobling and Tyler, 2003)
	Synthetic musk fragrances	- Larval development in certain crustaceans (copepods) is affected at concentrations of 20 µg HHCB/L; at concentrations of 200 µg/L, proteins involved in excretion of xenobiotic compounds are inhibited (Walters <i>et al.</i> , 2005; Peck and Hornbuckle, 2006).
	Antifoulants Plasticizers	- Development of male sex organs in female sea snails (imposex) at concentrations of 1 ng TBT/l and total reproductive failure in sea snails at concentrations of 6-8 ng TBT/l (Sumpter, 2002). - Effects of bisphenol-A on egg production in aquatic snails starting at 8 ng/l; effects on reproduction in daphnids starting at 3 to 30 µg DEHP/l (Jobling <i>et al.</i> , 2004; OEHHA, 2009)
Biocides	Desinfectants	Triclosan and triclocarban affect the growth of algae and fresh water crustaceans from concentrations <0.1 µg/l; decreased aggression (nest protection behavior) in Fathead minnows at concentrations of 1.6 µg triclosan/L (STOWA, 2015; Brausch and Rand, 2011)
	Pesticides	Very wide range of effects on target and non-target species, including acute (e.g., mortality) and chronic effects (reduced reproduction, behavioral changes, growth inhibition, endocrine disruption). Also higher food chain effects may occur: decline of farmlandbird populations in the vicinity of surface waters with imidacloprid concentrations >20 µg/L has been observed in a long-term study (Hallmann <i>et al.</i> , 2014).
	Antifoulants	- Development of male sex organs in female sea snails (imposex) at concentrations of 1 ng TBT/l and total reproductive failure in sea snails at concentrations of 6-8 ng TBT/l (Sumpter, 2002).

The current biological WWTPs are not designed to eliminate the micropollutants, discharges from these WWTPs are a major point source of these chemicals in the environment. The prevalence and continuous input of these organic micropollutants into water resources, inclusive of groundwater, is an ever-expanding environmental problem. Many of the micropollutants have been determined to be highly hazardous threats to animals, aquatic species, as well as human beings because they are non-biodegradable and bioaccumulative.

The occurrence of micropollutants in the ecosystem can lead to toxic biological effects such as mutagenicity, estrogenicity, and genotoxicity. An evident example is the feminization of male fish, caused due to the fish population being exposed to endocrine disrupting compounds (EDCs). Even when released at low levels, the continuous release of EDCs into the environment may cause reproductive and developmental abnormalities on highly sensitive species. The increase of antibiotic-resistant organisms in the environment is another alarming issue. The vigorous usage of antibiotics to improve the health of animals and humans has resulted in antibiotic-resistant genes in various environmental matrices. As a result of population explosion and higher reliance of modern societies on pharmaceuticals, the release of micropollutants into the ecosystem is anticipated to increase in the future. In addition, exposure to complex mixtures is more serious than single compound because of their possible synergistic effects. The exposure to a single micropollutant may not have an effect on the ecosystem, but the combined exposure to numerous micropollutants at low concentrations may have a negative impact. This may lead to acute effects on the ecosystem, from which populations and communities need to recuperate. However, if this recuperation takes longer than time between incidental discharges, or if the impact is too hard to recuperate from, the negative impacts on the aquatic ecosystem may be long-lasting (EU, 2009; EU, 2012).

### **REMOVAL OF MICROPOLLUTANT**

Removing micropollutants is of a great importance both to protect environmental ecosystem and human health. However, there is no particular treatment process to remove all different micropollutants at once. Some methods can be used together or respectively to remove these compounds from the waste wastewaters (Luo et al., 2014).

Wastewater treatment plants generally employ a primary, a secondary and an optional tertiary treatment process. Tertiary treatment processes are commonly used to produce higher quality of discharged water for certain purposes. Primary treatment processes aims to remove suspended solids that enter WWTPs. Micropollutants are removed mainly by sorption on primary sludge, as distribution of a compound into organic (lipophilic) layer is a predominant way of sorption (Ternes et al., 2004).

In secondary treatment micropollutants are subjected to a range of processes, including dispersion, dilution, partition, biodegradation and abiotic transformation. The total removal during secondary treatment generally refers to the losses of a parent compound contributed by different mechanisms of chemical and physical transformation, biodegradation and sorption to solids. Biodegradation/biotransformation and sorption are the two major removal mechanisms during biological treatment, while volatilisation occurs to a minor degree (Luo et al., 2014).

The fate of micropollutants in WWTPs is under the control or influence of 'internal factors' and 'external factors'. Internal factors are micropollutant-related, including the characteristics of micropollutants (e.g. hydrophobicity, biodegradability, and volatility). In general, polar and non-volatile compounds are more likely to escape wastewater treatment processes. External factors are WWTP-specific, which are linked to the treatment conditions

of wastewater treatment processes, the mixture of micropollutants that can act as competitors and nature of wastewater (pH and temperature) (Luo et al., 2014).

There are some methods practically tested for the removal of micropollutants. The physical methods are based on filtration processes using membrane technology. With respect to the small particle size of micropollutants, nanofiltration and reverse osmosis are the most effective physical techniques using membrane filtration. However, neither nanofiltration nor reverse osmosis offer cost-effective solutions due to high operating pressures and the associated energy demand.

Oxidative processes can generally offer a significant elimination of micropollutants. Advanced Oxidation Process (AOP) combines the UV treatment and oxidation processes using hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or ozone. The AOP is faster than ozonation alone, however, also less cost-efficient. In recent years, Advanced Oxidation Processes (AOPs) have been frequently used for the treatment of xenobiotic residual pharmaceuticals which cannot be treated by conventional treatment methods. This method can easily degrade various micropollutants which resist to biological degradation and increase the biological treatment capacity of wastewater. This method includes some processes such as sonolysis, ozonation and membran filtration.

Adsorptive processes are known from drinking water treatment and can also remove a remarkable portion of micropollutants. Figure 2, shows practically tested techniques for the removal of micropollutants.

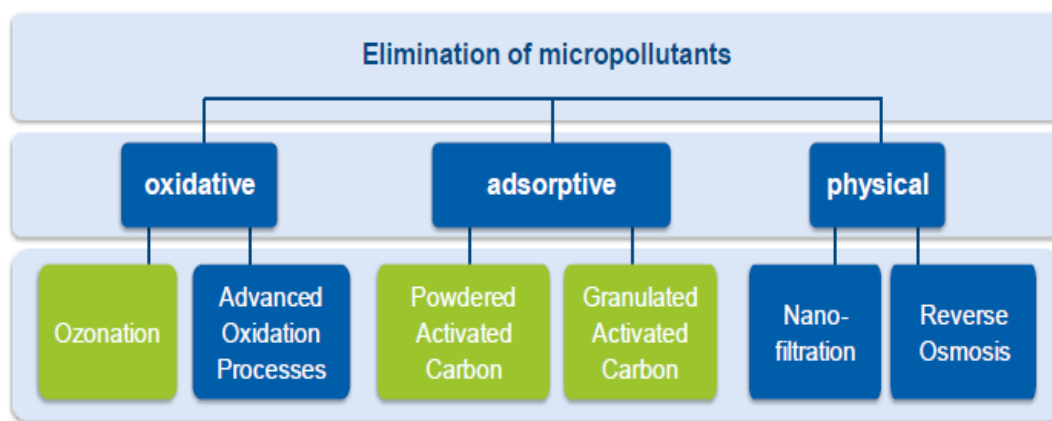


Figure 2. Practically tested techniques for the removal of micropollutants (Antakyalı and Morgenschweis, 2015).

Source control is a long-term procedure, incorporating the prohibition of toxic contaminants and the promotion of green chemistry. In the field of pharmaceuticals, prohibiting effective drugs will lead to an ethical dilemma as humans as well as animals rely upon these drugs for survival. End of pipe solutions, or wastewater treatment, will also be highly important in the future (<https://www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=584>).

## CONCLUSION

Conventional methods are insufficient for removing the micropollutants. Other alternative treatment methods including coagulation–flocculation, activated carbon adsorption, advanced oxidation processes (AOPs), membrane processes and membrane bioreactor can be applied for better removal.

Monitoring wastewater effluent for micropollutants is essential to assess the possible risk to the receiving environment. In order to reduce micropollutants, an additional barrier of advanced water treatment methods should be added to conventional Waste Water Treatment Plants. Chemical analyses will always be needed, but they are most useful if you know what you are looking for. It is necessary to design a monitoring strategy for pollutants.

## REFERENCES

- Antakyalı, D and Morgenschweis, C. (2015). Micropollutants in the aquatic environment and their removal in wastewater treatment works. 9th European Waste Water Management Conference, 12-13 October 2015, Manchester, UK.
- ARGE KOM-M.NRW, (2015). Anleitung zur Planung und Dimensionierung von Anlagen zur Mikroschadstoffelimination Official Journal of the ARGE Kompetenzzentrum Mikroschadstoffe.NRW April 2015.
- Brausch, J.M. and Rand, G.M. (2011). A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, 82, pp. 1518–1532.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder (2013). Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339 (6121), pp. 814-815.
- Ellis, J.B. (2006). Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ Pollut.*, 144:184–189.
- EU, 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity - Final Report. Study contract No. 070307/2007/485103/ETU/D.1.
- EU, 2012. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Report from Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) and Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS).
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., van Turnhout, C.A.M., de Kroon H. and Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511, pp 341–343.
- ICPR, (2011). Evaluation report Estrogens – report No. 186, International Commission for the Protection of the

Rhine.

- Jobling, S. and Tyler, C.R. (2003). Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure Applied Chemistry*, 75, pp. 2219–2234.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., Tyler, C.R. (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66, pp. 207–222.
- Jonsson, A., Fick, J., Klaminder, J., Brodin, T. (2014). Antihistamines and aquatic insects: Bioconcentration and impacts on behavior in damselfly larvae (Zygoptera). *Science of The Total Environment* 472, pp. 108–111.
- Kim, M.K. and Zoh, K.D. (2016). Occurrence and removals of micropollutants in water environment. *Environmental Engineering Research* 2016; 21(4): 319-332.
- Kumar, A., Chang, B. and Xagorarakis, I. (2010). Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in Water: Issues and Challenges Ahead. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Nov; 7(11): 3929–3953. doi: 10.3390/ijerph7113929
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75, pp. 417-434.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. Hao., Nghiem, L. Duc., Hai, F. Ibney., Zhang, J. & Liang, S. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473-474 (March), 619-641.
- Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R. (2010). Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Technology* 44 (2), pp. 2176-2182.
- OEHHA (2009) Toxicological Profile for Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). Report by Integrated Risk Assessment Branch, Office of Environmental Health Hazard Assessment, California Environmental Protection Agency.
- Peck, A.M. and Hornbuckle, K. (2006). Environmental Sources, Occurrence, and Effects of Synthetic Musk Fragrances. *Journal of Environmental Monitoring*, 8, pp. 874-879.
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C. and Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 75, pp. 45-95.
- STOWA , (2015). Microverontreinigen in het water - een overzicht. STOWA-report 2014-45, Amersfoort, The Netherlands.
- Sumpter, J.P. (2002). Chapter 10 - Endocrine Disruption in the Aquatic Environment. In: *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part M, Endocrine Disruptors, Part II*, (ed. by M. Metzler).
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H. (2004). Peer Reviewed: Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environ Sci. Technol.* 38:392A-9A.
- Walters, A., Santillo, D. and Johnston, P. (2005). Environmental and human health concerns relating to synthetic musk compounds. Technical note 07/2005 Department of Biological Sciences, University of Exeter, UK.
- Weinberger, J., Klapper, R. (2014) Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic Toxicology* 151, pp. 77-83.  
[www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=584](http://www.azocleantech.com/article.aspx?ArticleID=584)

## Bitki ekstraktları elde etme yöntemleri ve bu yöntemlerin bitki ekstrakt içeriğine etkisi

Saddam Al Ibrahim, Yavuz Gürbüz

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı,  
Kahramanmaraş, TURKIYE

Corresponding author e-mail: yavuz@ksu.edu.tr

### Özet

Tıbbi bitki ekstraktları, kurutulmuş veya taze bitkilerin yapraklarından, meyvelerinden, çiçeklerinden, çekirdeklerinden, reçinelerinden ve odunlarından çeşitli yöntemlerle elde edilen karışımlardır. Bu yöntemlerden en sık kullanılanları, soxhlet, süperkritik akışkan, mikrodalga destekli, ultrason destekli, homojenizatör destekli ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyon yöntemleridir. Bu derlemede bitki ekstraktları elde etmek için kullanılan en önemli yöntemlerden bahsedilmiş ve kullanılan yöntemlerin elde edilen ekstraktın kalitesi ve içeriği üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca, bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları irdelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** ekstrakt, ekstraksiyon, tıbbi bitki, soxhlet, homojenizatör, ultrason destekli ekstraksiyon

### Effect Of These Methods On Content Of The Extract And methods of Obtaining Plant Extracts

#### Abstract

Medicinal plant extracts are blends obtained from leaves, fruits, flowers, seeds, resins and woods of dried or raw plants by various methods. The most commonly studied methods amongs them are soxhlet, supercritical fluid, microwave assisted, ultrasonic assisted, homogenizator assisted and accelerated solvent extraction. In this article the most important methods used to obtain plant extracts have been identified and the effect of these methods on the quality and content of the extract, We also discussed the advantages and disadvantages of these methods

**Keywords:** extract, extraction, medicinal plant, soxhlet, homogenizator, ultrasonic assisted, extraction

### GİRİŞ

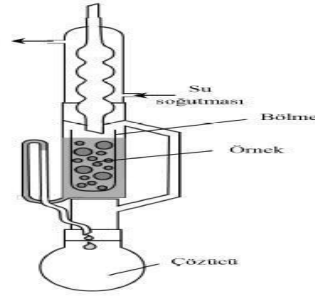
Tıbbi ve aromatik bitkilerin çeşitli yararlarından dolayı geçmişten günümüze gıda sektörü başta olmak üzere çeşitli alanlarda kullanıldığı bilinmektedir. Ekolojik tarımın önem kazandığı günümüzde hayvancılık sektöründe de doğal maddelerden yararlanma ön plana çıkmıştır. Tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen bitkisel ekstraktlar antifungal (Türküsay ve ark., 1996; Hammer ve ark., 1999; Svoboda ve Hampson, 1999; Guynot ve ark., 2005), antibakteriyel, antiviral (Svoboda ve Hampson, 1999; Dorman ve Deans, 2000; Rauha ve ark., 2000; Lambert ve ark., 2001) antioksidan (Svoboda ve Hampson, 1999; Botsoglou ve ark., 2002) ve antilipidemik özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Özkan ve Açıkgöz (2007) Türkiye'de de bol miktarda üretilen kimi tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen esansiyel yağların genel yararlarını; yemin lezzetinin artması, yemde toksin gelişiminin engellenmesi, ağızdan itibaren sindirim sistemi boyunca patojen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi veya öldürülmesi, sindirim enzimlerinin aktivitesindeki artışa bağlı olarak besin maddelerinden daha iyi yararlanma, hayvanların performansında iyileşme, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, sağlıklı ve canlı görünüm, kolesterolü düşük ve kalıntı problemi olmayan güvenilir hayvansal ürünlerin elde edilebilmesi, hayvansal ürünlerde oksidatif stabilitenin iyileşmesi ve raf ömrünün artması şeklinde belirtmektedirler. Ekstraksiyon, katı ya da sıvı fazda bulunan bir veya birden fazla bileşiğin farklı çözünürlük özelliklerinden yararlanılarak diğer bir sıvı faza alınmasını ifade etmektedir (Anonymous, 2013). Ekstraksiyon aşamasında soxhlet, perkolasyon ve buhar destilasyonu gibi klasik ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı oldukça yaygındır (Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M., 1999). Gıda ve tarım analizlerinde ise sıklıkla kullanılan yöntem soxhlet ekstraksiyonudur. Fakat bu yöntemde verimin düşük olabilmesi, analiz süresinin uzun ve çözücü tüketiminin yüksek olması tekniğin kullanımını sınırlandırmaktadır (Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernandez-Mendez, J., 2005). Tüm bu koşullar göz önünde bulundurularak günümüzde yeni ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine hız verilmiştir

### 1. TIBBİ BİTKİLERDEN EKSTRAKT ELDE ETME YÖNTEMLERİ.

**1.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi** Soxhlet ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon performansının seçilen çözücüye bağlı olduğu standart bir ekstrakt elde etme tekniğidir (Halliwell, B., Aruoma, OI., 1991). Soxhlet düzeneği Şekil 1'de gösterilmiştir. Özel bir düzenek ile gerçekleştirilen soxhlet ekstraksiyon yöntemi, katı



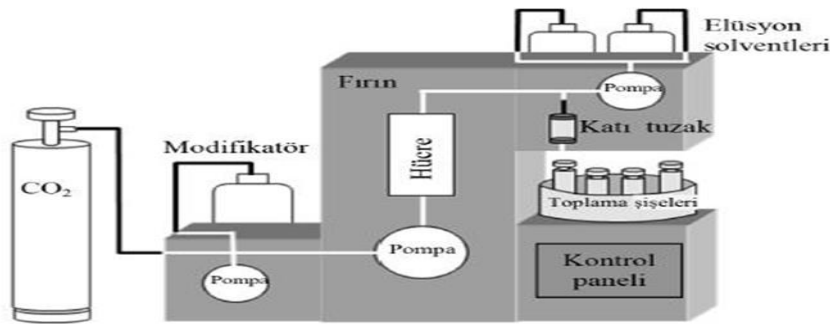
veya yarı katı örneklerin ekstraksiyonu için uygundur. Soxhlet ekstraksiyon yöntemi, hem çevresel analizlerde hem de gıda analizlerinde kullanılan eski bir ekstraksiyon yöntemidir.



Şekil 1: Soxhlet düzeneği

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi, ekstrete edilmek istenen örnek, kartuş olarak adlandırılan parçanın içine konularak düzeneğe yerleştirilir. Alt bölümdeki balon jöjeye çözücü (solvent) doldurulur. Isıtılan çözücünden çıkan buharlar, yoğunlaşmanın gerçekleştiği kondansatöre doğru ilerler ve yoğunlaşır. Yoğunlaşmanın sayesinde örneğin üzerine damlayarak katı veya yarı katı olan örneği ıslatır. Solvent seviyesi sifonun en üst noktasına ulaştığında tüm örnek bölmesi boşalarak solvent şişesine geri damlamaya başlar. Birkaç kez sifon boşalması gerçekleşir. Böylelikle solvent şişesinde, elde etmek istediğimiz ürün oluşmuş olur. Çözücü (solvent) miktarı az olmamalıdır. En az 100-500 mL kadar solvent gereklidir. Soxhlet ekstraksiyon yöntemi, maliyeti çok düşük bir yöntemdir. Uygulama esnasında karşılaşılan problemlerin çoğu düzeneğin iyi temizlenmemiş olmasından kaynaklıdır. Bu nedenle kullanmadan önce uygun, temiz bir solventle ekstrete ederek temizlemekte fayda vardır. Ekstraksiyon süresinin uzun olması da dezavantajlarından biridir (Şen, M., 2011).

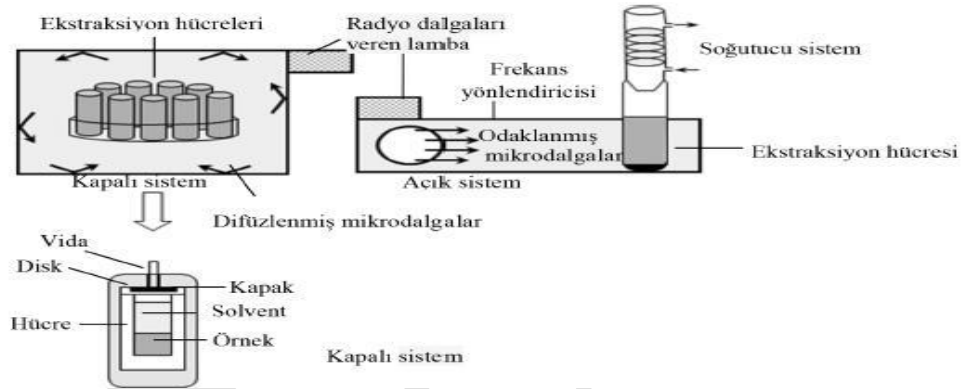
**1.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi** Klasik çözücü ekstraksiyonu, kullanılan çözücülerin ve sıvı karışımlarının özelliklerinin anlaşılması ile zaman içerisinde geliştirilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ise bu geliştirilen yöntemlerden biridir. Çözücü olarak genellikle CO<sub>2</sub> kullanılır. Kullanılan çözücünün kritik üstü koşullarda üstün çözme yeteneğinin olması gerekmektedir. Şekil 2’de standart bir süperkritik akışkan ekstraksiyon düzeneği gösterilmiştir. 1970’li yılların sonlarından beri, süperkritik akışkanlar, doğal ürünleri ayırmak için kullanılmıştır. Fakat uzun süre, sadece birkaç adet ürün üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Günümüzde, prosesin ve ekipmanlarının geliştirilmesi için daha çok çaba sarfedilmekte ve endüstri, süperkritik tekniklerle daha çok ilgilenmektedir. Bunun yansıması olarak, son yıllarda çok sayıda süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemine dair çalışmalar yapılmaktadır (Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A., Pegg, R., 2010)



Şekil 2: Süperkritik akışkan düzeneği

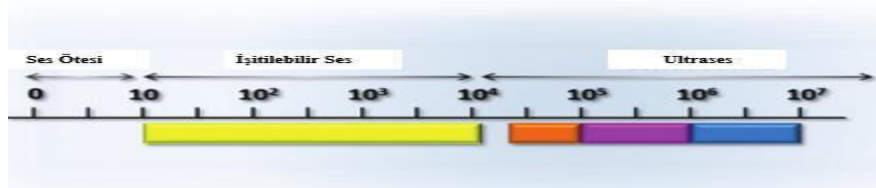
Süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminin geniş bir kullanım alanı vardır; çevre, farmasötik kimya, polimer analiz, gıda analizi gibi. Gıda endüstrisinde ham sebze yağları sıkça kullanılır. Ancak istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için yağların tüketilmeden önce mutlaka rafine edilmesi gerekmektedir. Önemli bir nokta ise saflaştırma prosesi esnasında, yağın içerisindeki faydalı bileşikler de kaybolabilir (Şen, M., 2019). Süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminin uygulama mantığı şu şekildedir; Sıvı CO<sub>2</sub>, bir pompa ile istenilen basınç değerine getirilir. Buradan ısıtıcıya gönderilen akışkan, istenilen sıcaklık değerine getirilir. Bu şekilde akışkan, süperkritik basınç ve sıcaklık değerlerine getirilmiş olur. Bu akışkan, sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gelir. Buradaki bir madde ile temas neticesinde, süperkritik CO<sub>2</sub>'de çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basınç düşürülür. Basıncın düşürülmesi ile çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. CO<sub>2</sub> gazının tekrar kazanımı için soğutucuda sıcaklığı düşürülür. Elde edilen ürünler, ayırıcının altındaki bölümden toplanır (Şahin, S., 201).

**1.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi** Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi, özellikle flavonoid ekstraksiyonunda ve analitik ölçümünde rol oynayan en gelişmiş yöntemlerdendir. Mikrodalga, elektromanyetik spektrum içerisindeki infrared ve radyo frekansı arasında yer alan, iyonize olmayan elektromanyetik dalgalardır. Elektromanyetik radyasyonları 0.3 - 300 GHz aralığında değişmektedir (Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S., Levine, M., 2003). Isı iletimini temas ile sağlayan diğer klasik yöntemlerin aksine, mikrodalgalar örneğin tamamını ısıtmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraktörlerin 2 türü vardır; açık ve kapalı. Açık olanlarda atmosferik basınçta çalışma yürütülür, Şekil 3'te gösterilen kapalılarda ise yüksek basınç ve sıcaklıkta çalışma yürütülür. Bu ekstraksiyon türünde, partikül boyutunun büyük önemi vardır. Küçük boyutlu partiküllerin yüzey alanı fazla olduğundan, bitki matrisi ile çözücünün etkileşimini artırır. Çözücü seçimi de son derece önemlidir. Çözücünün dielektrik sabitinin yüksek olması ve mikrodalga enerjisini iyi absorplaması gerekir. Polaritesi açısından uygun çözücülere örnek olarak etanol, su, metanol verilebilir. Düşük dielektrik sabitli hekzan, tolüen gibi apolar çözücüler, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi için uygun değildir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ürünün filtreden geçirilmesi veya santrifüjlenmesi ihtiyacı, bu yöntemin ek bir işlem gerektirmesi nedeniyle dezavantajlarından (Rietjens, I., Boersma, M., Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H., Cnubben, N., Zanden, J., Woude, H., Alink, G., Koeman, J., 2002



**Şekil 3:** Kapalı sistem mikrodalga destekli ekstraksiyon düzeneği

Ultrasonik ekstraksiyon olarak da adlandırılır. Şekil 4'te frekans aralığı gösterilen ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi, 20 kHz'den büyük frekanslarda akustik titreşimlerin uygulanması ile çalışır. Bu titreşimlerin sıvının içinden geçmesiyle boşluk oluşumu meydana gelir. Bu boşluğun oluşmasına neden olan şey ultrasonik enerjidir. Bu boşluklar sıvı ortamda kabarcıkların oluşmasını sağlar ve kabarcıklar da katı parçaların sarsılarak kopmasına neden olur. Böylece çözücünün istenen ekstrakta difüzyonu kolaylaşır. UDE'nin avantajları; basit, ucuz, kısa süreli ve etkili olmasıdır. Düşük sıcaklıklarda da etkili bir performans göstermektedir. Kısa süreli olmasının nedeni, ultrason yapılan bitkinin hücre duvarları hasar görerek dokunun içerisindeki solute dışarı çıkar. Bitkiden çözücüye doğru gerçekleşen bu kütle transferi artmasıyla ekstraksiyonun süresi kısalmıştır. Dikkatli olunması gereken durum ise proses esnasında sıcaklık artışı olacaktır. Ürünün kalitesinin zarar görmemesi için sıcaklık devamlı olarak kontrol edilerek gerekirse soğutucu desteği ile gerçekleştirilmelidir (Şahin, S., 2011/ Şen, M., 2011/ Vural, T., 2011).



**Şekil 4:** Ultrason frekans aralığı

**1.5. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi** Basınç altında yürütülen bir ekstraksiyon yöntemidir. Basınç altında olmasının nedeni ise yüksek sıcaklıktaki solventin sıvı formunu korumaktır. Çalışılan sıcaklık değerleri 50 – 200 °C, basınç değerleri ise 10 – 15 MPa'dır (Şahin, S., 2011). Yüksek sıcaklık ve basınçta gerçekleştirilen bu ekstraksiyon yönteminin pestisitler gıdaya kadar geniş bir kullanım alanı vardır. Son derece hızlı, fakat maliyetli bir yöntemdir (Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S. Corpe, C. Dutta, A., Dutta, S., Levine, M., 2003).

**1.6. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon Yöntemi** Homojenizatör, hem karıştırma hem de ekstrakte etme amacı ile kullanılabilen bir cihazdır. Katı örnek ve solventin yerleştirildiği Homojenizatör cihazı, belirli bir rpm hızına ayarlanır. Süre tutularak ekstraksiyon prosesi gerçekleştirilir. Ekstra bir filtreleme işlemi gerektirir. Hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S., 2004)

## **2. EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİ VE ETKİLERİ**

**2.1. Sıcaklık ve Basınç** Sıcaklık, basınçlı çözgen ekstraksiyonunu etkileyen en önemli parametredir. Ekstraksiyon süresince yüksek sıcaklıkta çalışmak, kullanılan çözgenin özelliklerini değiştirmektedir. Difüzyon oranı ve kapasitesinin artmasıyla analitin çözünürliğini artırmaktadır. Analit ile matrisdeki diğer bileşenler arasındaki interaksiyon zayıflamakta ve viskozite ile yüzey gerilimi azalmaktadır. Yüksek basınç etkisiyle çözgen kaynama noktası üzerindeki sıcaklıklar da bile sıvı formda tutulabilmektedir (Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A., 2012). Yüksek sıcaklık ve basıncın etkisiyle ekstraksiyon veriminde artış sağlanırken, seçicilik azalmaktadır. Fakat sıcaklık artışıyla birlikte bileşiklerin degradasyonunda ve hidroliz, oksidasyon gibi reaksiyonların görülme sıklığında artış meydana gelmektedir (Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A., 2012, Moreno, E., Reza, J., Trejo, A., 2007, Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M.L., 2007). Organik bileşikler genellikle yüksek sıcaklıkta hızlı bir biçimde dekompoze olmakta ve ekstraksiyonun geri kazanım değerlerinde düşüşler meydana gelmektedir (Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M.L., 2007)

**2.2.Çözgen Cinsi, Hacmi ve Akış Hızı** Çözgen seçiminde hedef, arzu edilen bileşiği çözebilecek, uygun polarite de çözgen kullanılmaktadır. Bu amaçla gıda ve yemlerde gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda su, metanol, toluen, diklorometan, etil asetat ve asetonitril gibi çok farklı çözgenler kullanılabilir. Bazı durumlarda polar ve apolar çözgenlerin karışımının ekstraksiyonda kullanılmasıyla daha yüksek geri kazanım değerleri elde edilmektedir. Özellikle farklı hacimlerde metanolla karıştırılan çözgenlerin kullanılmasıyla analitlerde maksimum geri kazanım değerlerine ulaşıldığı literatürde belirtilmektedir (Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A., 2012). Dinamik moda çözgenin akış hızı, statik moda da çözgen hacmi optimize edilmelidir. Gereğinden fazla çözgen kullanımı ekstraktın konsantrasyon edilmesine ya da uygulanacak konsantrasyon aşamasının zorlaşmasına sebep olacaktır.

**2.3. Ekstraksiyon Süresi** Ekstraksiyon süresi ile ekstraksiyon sıcaklığı, matris ve analitin yapısı doğrudan bağlantılıdır (Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M.L., 2007). Rovio ve ark. Sparring, S., Björklund, E., 2004) BÇE tekniği ile 125°C sıcaklıkta 80 dakika sonunda karanfilden elde ettiği öjenol ve öjenol asetatın geri kazanım değerlerini %100 olarak saptarken, aynı sonuçları elde etmek için 250 ve 300°C'lik sıcaklıkta çalışılması durumunda 15 dakikalık ekstraksiyon süresinin yeterli olacağını gözlemlemişlerdir [Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M.L., 2007, Sparring, S., Björklund, E., 2004).

**2.4. Döngü Sayısı** Ekstraksiyonun %100 verimle gerçekleştirilmesi için sonsuz sayıda döngüye ihtiyaç vardır. ASE cihazında maksimum 5 döngüye izin verilmektedir. İlk döngüde beş döngüde alınan miktarın %81.8'i, ilk iki döngüde % 91.1'i, dört döngüde ise % 99'dan fazlası alınabilmektedir. Bu sebeple amaca uygun döngü sayısı seçilmelidir (Çam, M., Hışıl, Y., 2010). Bu parametrelerin dışında BÇE tekniğinin çalışma modu (statik ya da dinamik), ekstraksiyon sonunda sistemin taze çözgen ve azot ile temizlenmesi, örneğin cinsi (yaş ya da kuru) gibi faktörlerde ekstraksiyon verimini etkilemektedir.

## **SONUÇ**

Ekstraksiyon işleminin yönetilmesinde çeşitli faktörler vardır. Ekstraksiyonda sıcaklığın; çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi gibi önemli olaylar üzerine etkisi vardır. Ekstraksiyon boyunca yüksek sıcaklık ve basıncın kullanılması sadece ekstraksiyon verimini artırmakla kalmayıp, ekstraksiyon süresini ve çözgen tüketimini de azaltmaktadır. Basınçlı çözgen ekstraksiyonu sistemi oksijene ve ışığa duyarlı bileşikler korumaktadır. Fakat ısıya dayanıksız bileşiklerle çalışırken dikkatli olunmalıdır. Ayrıca klasik ekstraksiyon uygulamaları büyük miktarlarda solvent tüketir. Böylece kendi çevresel ve mesleki tehlikelerini yaratırlar ve genellikle çok düşük seçicilik sağlarlar. Örneğin, farklı matrislerde yarıçözücü bileşikler, katı örnekler için Soxhlet ekstraksiyonu, sulu matrisler için sıvı-sıvı ekstraksiyonu gibi geleneksel yaklaşımlar kullanılarak analiz edildiğinde, toksik kimyasal yönetimi ve imhası gereklidir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, katı-faz mikroekstraksiyon, mikrodalga destekli sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu gibi yeni teknolojilerin gelişimi solvent kullanımını azaltmıştır. Bu yeni tekniklere artan bir talep olmuştur, çünkü bu teknikler otomasyona uygundur, çok daha hızlıdır ve çevre dostu tekniklerdir.

## KAYNAKLAR

- Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., Kosinska, A., Pegg, R., 2010, Free radical scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil, *Food Chemistry*, 121 (3), 705-711.
- Anonymous, 2013. Extraction (chemistry).<http://en.wikipedia.org/wiki/Extraction> chemistry) (Access online: 28.06.2013).
- Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M., 1999. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 837: 211-219.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernandez-Mendez, J., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A* 1089:1-17.
- Çam, M., Hışıl, Y., 2010. Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry* 123: 878-885.
- Dorman, H.J., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal Applied Microbiology* 88: 308-316
- Guynot, M, E., Marin, S., Seto, L., Sanchis, V., Ramos, A, J. 2005. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science Technology International* 11(1): 25-32.
- Halliwell, B., Aruoma, OI., 1991, DNA damage by oxygen-derived species:its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett*, 281 (1-2), 9-19.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. *Journal Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Kronholm, J., Hartonen, K., Riekkola, M.L., 2007. Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *Trends in Analytical Chemistry* 26(5): 396-
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P. N., Coote, P.J., Nychas, G.-J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91: 453-462
- Macdonald-Wicks, L., Wood, L., Garg, M., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review, *Science of Food and Agriculture*, 86 (13), 2046-2056.
- Moreno, E., Reza, J., Trejo, A., 2007. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds* 27: 239-260.
- Özkan, K., Açıkgöz, Z., 2007. Kanatlı kümes hayvanlarının beslenmesi. 1.Baskı, Hasad Yayıncılık, İstanbul.
- Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S., Levine, M., 2003, Vitamin C is an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention, *American College of Nutrition*, 22 (1), 18-35.
- Rietjens, I., Boersma, M., Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H., Cnubben, N., Zanden, J., Woude, H., Alink, G.,Koeman, J., 2002, The pro-oxidant chemisrty of the natural antioxidants, vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11 (3-4), 321-333
- Rovio, S., Hartonen,K., Holm, Y., Hiltunen, R., Riekkola, M.L., 1999. Extraction of clove using pressurized hot water. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 399-404
- Şahin, S., 2011, *Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik-CO2 ile Ekstrakt Eldesi ve Bileşimindeki Oleuropin Miktarının İncelenmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Şen, M., 2011, *Üvez Meyvalarının Antioksidan Aktivitesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sporring, S., Björklund, E., 2004. Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat containing food and feed samples: influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume. *Journal of Chromatography A* 1040: 155-161.
- Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A., 2012. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A* 1237: 1-23
- Svoboda, P, K., Hampson, B, J. 1999. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Aromatopia* 35: 50-54.
- Türküsay, H., Onoğur, E. 1996. Bazı bitki ekstraktlarının antifungal etkileri üzerine araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 22: 267-271.
- Vural, T., 2011, *Üzüm Çeşitlerinin Antioksidan Kapasiteleri ve Bileşenleri Açısından Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

## Hayvan Beslemede Antibiyotik ve Antiparazitlere Alternatif Olarak Kullanılan Bitkisel Ekstraktlar

Emre Ekici<sup>1</sup> Yavuz Gürbüz<sup>1</sup>

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı,  
Kahramanmaraş, TÜRKİYE

Corresponding author e-mail: [yavuz@ksu.edu.tr](mailto:yavuz@ksu.edu.tr)

### ÖZET

Hayvan beslemede büyümeyi teşvik için antibiyotiklerin kullanılmasının yasaklanması araştırmacıları alternatif katkı maddeleri aramaya zorlamıştır. Antibiyotiklerin üstlendiği misyonu yerine getirmek için probiyotikler, organik asitler, bitki ekstraktları ve çeşitli bitkiler kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklere alternatif bitkisel orijinli katkı maddelerinin bir kısmı antiparaziter özellik göstermektedir. Parazitler hayvancılıkta yemden yararlanma ve verimi engelleyen ciddi bir sorun olarak devam etmektedir. Bu sorunun çözümü için bitkisel orijinli katkı maddelerine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu derlemede bitki ekstraktları ve etkileri hakkında bilgi verilecektir.

**Anahtar kelime:** hayvan besleme, yem katkı maddeleri, bitki ekstraktları

### GİRİŞ

Hayvan beslemede büyüme uyarıcısı olarak antibiyotiklerin kullanılması antibiyotik Hdirenci denilen bir sorunu ortaya çıkarmaktadır (Çetin, 2008; Buğdaycı, 2008). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) antibiyotiklerin hatalı kullanımı ile mikroorganizmanın spesifik antibiyotiklere zamanla bağışıklık kazandığını ve insan sağlığını korumada etkili olamadıklarını belirtmiştir. Bu nedenle AB ülkelerinde antibiyotiklerin hayvansal üretimde kullanılması yasaklanmış ve 2006 yılına kadar sadece dört antibiyotiğin (avilamisin, salinomisin, monensin, flavofosfolipol) kullanılmasına izin verilmiştir. Bunun sonucunda araştırmacılar antibiyotiklere alternatif olabilecek büyüme faktörleri arayışına başlamışlardır. Bu amaçla tıbbi ve aromatik bitkiler ve bunlardan elde edilen esansiyel yağlar yoğun çalışılmış, yeme ve suya ilave edilen bitki ekstraktları ile yem tüketimi, yemden yararlanma ve karkas kalitesinde ilerlemeler sağlanmıştır (Güler ve Dalkılıç, 2005 a; Adıyaman ve Ayhan, 2010). Gelişmiş ülkelerde organik bitkisel üretimi müteakip organik hayvancılığa geçilmiştir. Organik hayvancılık kontrollü ve sertifikalı olarak gerçekleştirilen bir üretim faaliyetidir. Hayvan beslemede uygulanan entansif besleme programları ile hayvanlarda kısa sürede hızlı canlı ağırlık artışı beklendiğinden rasyonun besin madde içeriği artırıldığı gibi rasyona gelişmeyi arttırıcı büyüme faktörleri de ilave edilmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık % 75-80'i sıradan ilaçlar yerine bitkisel (doğal) kaynaklara güvenmektedir. Bilim dünyası 30-40 yıldan beri tedavi edici ajan olarak bitki ekstraktları ile ilgilenmektedir. Bitkisel ilaçlar uzun zamandan beri bilinmesine rağmen hangi bitkinin insan fizyolojisini nasıl etkilediği bilinmemektedir (Bora ve Sharma, 2010 a; Griggs ve Jacobi, 2005).

### TÜRKİYE'DEKİ AROMATİK BİTKİ VE EKSTRAKTLAR

Ülkemiz florası uçucu yağları ihtiva eden bitkilerin çokluğu ve çeşitliliği yönünden önem taşımaktadır. Türkiye'nin coğrafik konumu ve iklim çeşitliliğine ilave olarak 3 önemli floristik bölgenin kesişme noktasında yer alması diğer cins ve türlerde olduğu gibi aromatik bitkilerde de çeşitliliğin artmasına sebep olmuştur. Türkiye florasına kayıtlı 10.000'e yakın türün 1/3'nü aromatik bitkilerin oluşturduğu bilinmektedir. Dünya'da yıllık tıbbi ve aromatik bitkiler dışalımını 1991- 2000 yılları arası ortalama verilerine göre, 400.000 ton ve değeri ise 1.3 milyar ABD doları civarındadır. Bu miktarın % 80'i, en fazla dışsattım yapan 12 ülke (Çin, Hindistan, ABD, Almanya, Meksika, Mısır, Şili, Bulgaristan, Singapur, Fas, Pakistan, Türkiye) tarafından karşılanmıştır. Türkiye dışsattım yapan ülkeler arasında % 5'lik pay ile 12. sırada yer almaktadır. Türkiye dünya'daki en büyük kimyon (% 26) ihracatçılarından birisidir. Önceleri İç Anadolu'da (Ankara, Konya, Kırşehir, Karaman, Niğde, Afyon) küçük çapta üretim yapılırken, dışsattım miktarının artması sonucu, GAP bölgesinde de kimyon yetiştirilmeye başlanmış ve üretim alanı genişletilmiştir. Ülkemizden en fazla dış satımı yapılan bitkiler içersinde kekik % 18 ile ikinci sırayı almaktadır. Türkiye yıllara göre değişmekle birlikte, 7-8 bin ton dışsattım miktarı ve bundan elde edilen 13-16 milyon Amerikan doları geliri ile dünyada en fazla kekik ihraç eden ülke konumundadır. Diğer önemli iki dışsattım ürünümüz ise doğadan toplanan keçiboynuzu ve defne yaprağıdır. Dünyada en önemli kaliteli defne ihracatçısı ülke olan Türkiye, defne yaprağı dışsattımı yapan birkaç ülkeden birisidir. Anason ülkemizde uzun yıllardan beri tarımı yapılan bir bitki olup, ülke içinde tüketimi yanında dışsattımı yapılan bitkilerin başında gelmektedir. Anason üretiminin hemen hemen tamamı Ege Bölgesi ile Orta Anadolu Bölgesi arasında kalan geçit bölgesinde yapılmaktadır. Türkiye, anason üretim ve dışsattımında dünyada iyi bir yere sahip ve önde gelen ülkelerdendir. Anason ve anason uçucu yağı başta içki endüstrisi olmak üzere, gıda endüstrisinde aroma ve katkı maddesi olarak, ayrıca

ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Türkiye, çok önemli bir tıbbi bitki ve aynı zamanda yağ bitkisi olan haşhaşın geleneksel üreticisi olarak bilinmektedir. Türkiye Bulgaristan'la birlikte dünyanın en büyük gülyağı üreticisidir. Türkiye son yıllarda gülyağı yanında artan miktarlarda diğer uçucu yağların da dışsattımını yapmaya başlamış ve bu duruma bağlı olarak, gülyağı dışındaki uçucu yağ üretim tesislerinin sayısında da artış meydana gelmiştir. Diğer uçucu yağlar ise; defne yapraklarından yılda ortalama 1 ton defne uçucu yağı üretilmekte ve bunun önemli bir kısmı ihraç 38 edilmektedir. Son yıllarda ihraç edilen uçucu yağlardan biri de kekik yağıdır. Ayrıca, son zamanlarda Akdeniz ve ege bölgelerinde küçük çapta nane, mersin, rezene, anason, kimyon, adaçayı, ardıç, biberiye, oğulotu ve hayıt uçucu yağları da üretilmeye başlanmıştır. Uçucu yağ ihracatımızın büyük bir kısmı başta Fransa, Almanya, İsviçre olmak üzere AB ülkeleri ve ABD'ye yöneliktir. Bu dört ülke Türkiye kökenli uçucu yağların % 94'ünü satın alan ülkeler konumundadır.

**Tablo1.**Bazı aromatik bitkilerin etkili bölümü, aktif bileşeni, temel etkinlikleri Uçucu yağ miktarı

Aromatik bitki	Bitki bölümü	Aktif bileşeni	Temel özellikleri
Kekik ( <i>Thyme</i> )	Tümü	Thymol	Sindirimi uyarıcı, antiseptik, antioksidant
Anason ( <i>Anise</i> )	Meyva	Anethol	Sindirimi uyarıcı
Biber ( <i>Capsicum</i> )	Meyva	Capsaicin	Antidieratik, anti-inflamatuar, sindirimi uyarıcı
Nane ( <i>Peppermint</i> )	Yaprak	Menthol	Lezzetlendirici, sindirimi uyarıcı, antiseptik
Sarımsak ( <i>Garlic</i> )	Soğan	Allicin	Sindirimi uyarıcı ve antiseptik
Biberiye ( <i>Rosemary</i> )	Yaprak	Cineol	Sindirimi uyarıcı, antiseptik, antioksidan
Karanfil ( <i>Clove</i> )	Karanfil	Eugenol	Sindirimi uyarıcı, antiseptik, lezzetlendirici
Tarçın ( <i>Cinnamon</i> )	Kabuk	Aldehit	Sindirimi uyarıcı, antiseptik, lezzetlendirici
Kimyon ( <i>Cumin</i> )	Tohum	Cineol	Sindirimi uyarıcı ve karminatif
Maydanoz ( <i>Parsley</i> )	Yaprak	Apiol	Lezzetlendirici, sindirimi uyarıcı, antiseptik
Defne ( <i>Bay laurel</i> )	Yaprak	Cineol	Lezzetlendirici, sindirimi uyarıcı, antiseptik
Hindistan cevizi ( <i>Nutmeg</i> )	Tohum	Sabinene	Sindirimi uyarıcı ve ishal önleyici

Aromatik bitki	Uçucu yağ miktarı (%)	Aromatik bitki	Uçucu yağ miktarı (%)
Adaçayı	1.0 - 3.0	Kekik	0.5 - 3.0
Anason	1.5 - 6.0	Kimyon	2.5 - 6.0
Biberiye	0.5 - 2.0	Nane	0.1 - 1.0
Defne	0.5 - 2.0	Rezene	2.0 - 6.0
Derecotu	0.2 - 4.0	Sarımsak	0.1 - 0.3
Hardal	0.1 - 1.0	Tarçın	0.5 - 3.0

## FİTOBİYOTİKLERİN HAYVAN BESLEMEDE KULLANIMI

Kanatlılarda kullanımı Kanatlı karmalarında hastalıklarından koruyucu ve yemden yararlanmayı artırıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç oluşturma riskinden dolayı doğal, yan etkisi olmayan ve kalıntı bırakmayan yeni katkı maddeleri arayışı içersine girilmiştir. Son zamanlarda etlik piliç yetiştiriciliğinde antibiyotiklere alternatif olabilecek doğal ve güvenli madde arayışı içersinde olan bilim adamlarının dikkatini aromatik bitki ve ekstraktlar çekmiş ve bu maddelerin organizma üzerinde etkilerini belirlemeye yönelik araştırmalar yapılmaya başlanılmıştır. Kanatlı rasyonlarına bu katkıların ilave edilmesiyle yem tüketiminin, yemden yararlanmanın ve karkas kalitesinin iyileştiği, ayrıca ölüm oranının azaldığı bildirilmektedir11,8. Bitkisel ekstraktlar içersinde antimikrobiyel etkisi sebebiyle en fazla kullanılan ve en çok bilinen ekstrakt kekik uçucu yağıdır. Yapılan bir çalışmada bıldırcın rasyonlarına ilave edilen virginamisin (25 ppm) ve kekik uçucu yağının (100 ppm) canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma katsayısına olan etkisi belirlenmiştir20. Araştırma sonunda kekik uçucu yağı içeren rasyonla beslenen bıldırcınlarda canlı ağırlık ve yem tüketiminin daha yüksek olduğu, virginamisin içeren grupta ise yemden yararlanmada iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre bıldırcınlarda kekik uçucu yağının büyütme faktörü olarak Virginamisine alternatif olabileceği söylenebilir. Bu parametrelerle ilgili bir çok örnek çalışma bulunmaktadır. Hertrampf (2001) broyler rasyonlarına antibiyotik yerine kekik uçucu yağı ilavesinin canlı ağırlık artışı'nı önemli seviyede artırdığını10, Jamroz ve Kamel (2002) baharat ekstraktı kullanımının broylerde günlük canlı ağırlık artışı'nı artırdığını, aynı şekilde Sirvydis ve ark. (2003) flavomisin ve dehidre edilmiş bitki ekstraktı kullanarak broylerde yürüttükleri bir çalışmada, bitki ekstraktı içeren rasyonla beslenen grupta en yüksek canlı ağırlık artışı ve en düşük yemden yararlanma oranı belirlemişlerdir22. Basmacıoğlu ve ark. (2004) iki farklı

uçucu yağın (kekik ve biberiye) tek başlarına ve 37 karışımlarının sentetik bir antioksidanla kıyaslama yaptıkları araştırmalarında performans parametreleri ile broyler etinin lipid oksidasyonunu incelemiştir. Araştırma sonucunda yem tüketiminde, yemden yararlanma oranında ve mortalitede deneme grupları arasında önemli bir farklılığın oluşmadığını, dolayısıyla rasyona ilave edilen uçucu yağların broylerin performans parametrelerinde önemli bir farklılık oluşturmadığını ortaya koymuşlardır<sup>5</sup>. Fakat rasyona ilave edilen uçucu yağların broyler etinin lipid oksidasyonunda önemli değişimlere neden olduğunu belirlemiştir. Özellikle kekik ve biberiye uçucu yağ kombinasyonunun sentetik antioksidana göre etin lipid oksidasyonunu önlemede daha etkili olduğu belirlenmiştir.

#### **RUMİNANLARDAKİ KULLANIMI**

Bilindiği üzere ruminantlarda rumen içi fizyolojik koşullar yani rumen sıvısının pH değeri ve bakteriler, protozoa gibi mikroorganizma türlerindeki değişimler verim ve kaliteyi etkilemektedir<sup>14</sup>. Katkı maddelerinin kullanımındaki amaç rumen fermantasyon olaylarının nitelik ve nicelik olarak değiştirilmesiyle, besin maddelerinden yararlanmanın iyileştirilmesidir. Aromatik bitkilerin ve bunlardan elde edilen ekstraktların yapısında bulunan uçucu yağların rumen mikroorganizmaları üzerine etkilerini tanımlamak oldukça yeni bir konudur. Fakat bu konu ile ilgili çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Uçucu yağların temel etki mekanizması aminoasitlerden amonyak üretiminin inhibisyonudur. Bu etki uçucu yağların yüksek oranda amonyak üreten bakteriler üzerine etkileri aracılığıyla oluşmaktadır<sup>17</sup>. Amonyak üretim oranında küçük bir azalma bile besleme açısından yararlı olabilmektedir<sup>24</sup>. Uçucu yağların ruminal fermantasyon ve ruminal mikroorganizmalar üzerine etkilerini tanımlamak için Wallace ve ark'nın (2002) yürüttüğü çalışmada, rumen uçucu yağ asitleri (UYA), amonyak (NH<sub>3</sub>) konsantrasyonları, protozoa sayıları ve mikrobiyel protein akışının uçucu yağlardan etkilendiği saptanmıştır.

Sonuç olarak aromatik bitki ve ekstraktlarının rumen fermantasyonu üzerine etkileri ile etki mekanizmaları konusunda araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

#### **KAYNAKLAR**

- Basmacıoğlu, H., Tokuşoğlu, Ö. and Ergül, M. 2004. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFAs in broilers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34: 197-210.
- Bora, K. S., Sharma, A. 2010a. Phytochemical and Pharmacological Potential of *Artemisia Absinthium* Linn. and *Artemisia Asiatica* Nakai. A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (2): 325- 328.
- Bora, K.S., Sharma, A. 2010b. Neuroprotective Effect of *Artemisia Absinthium* L. on Focal Ischemia and Reperfusion-Induced Cerebral Injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3): 403-409.
- Çetin, T. 2008. Eterik Yağların Broylerde Besi Performansı, Bazı Kan Parametreleri ile Newcastle Hastalığı ve Enfeksiyöz Bronşit Antikor Seviyeleri Üzerine Etkisi. *AÜ. Sağlık Bil. Ens. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD. Doktora Tezi*, 86 s. (Bora ve Sharma, 2010 a; Griggs ve Jacobi, 2005). 2012 Hayvan Beslemede Antibiyotik ve Antiparazitlere Alternatif Olarak Bitkisel Ekstraktlar ve Pelinotu'nun (*Artemisia absinthium*) Kullanılması *KSÜ Doğa Bil. Derg.*
- Güler, T., Dalkılıç, B. 2005a. Aromatik Bitkilerin Organik (Ekolojik) Hayvancılıkta Kullanım İmkânı (Derleme). *DAUM, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırma ve Uygulama Merkezi*, 3(2) : 13-20.
- Güler, T., Ertaş, O.N., Çiftçi, M., Dalkılıç, B. 2005b. The Effect of Coriander Seed (*Coriandrum Sativum* L.) as Diet Ingredient on The Performance of Japanese Quail. *South African Journal of Animal Science*, 35(4): 260-266.
- Hertrampf (2001), E.Demir , Şenay Sarıca , M.A.Özcan ve M Suiçmez The use of natural feed additives as alternative to an antibiotic growth promoter in broiler diets *Arch Geflügelk.*, 69 (3).S.110-116, 2005 Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- HERTRAMPF, J.W. , 2001: Alternative antibacterial performance promoters. *Poult. Int.*40,50- 52
- Sirvydis V H, Bobiniene R, Priudokiene V, Venicus D (2003). Probiotics Add Value to Broiler Feed. *World Poult*, 19, 16-17.
- JAMROZ, D. and C. KAMEL, 2002: Plant extracts enhance broiler performance. *Poult. Sci. Assoc. 91st Annu. Meeting*, 11-14 Aug., 2002, Newark,

## ***Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* bitkisinin *in vitro* yara iyileştirici aktivitesinin değerlendirilmesi**

Büşra Karpuz<sup>1</sup>, Mert İlhan<sup>2</sup>, Fatma Ayaz<sup>3</sup>, Esra Küpeli Akkol<sup>1</sup>, Bilge Şener<sup>1</sup>, İhsan Çalış<sup>4</sup>, Nurgün Küçükboyacı<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Van, Türkiye

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

<sup>4</sup>Yakın Doğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

\*Sorumlu yazar e-mail: nurgunkucukboyaci@gmail.com

### **Özet**

Başlıca Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren *Sideritis* L. cinsi (Lamiaceae) Türkiye’de genellikle “Dağ çayı, Yayla çayı, Alanya adaçayı ve Balbaşı” isimleriyle bilinmektedir. *Sideritis* türleri halk arasında uzun zamanlardan beri anti-enflamatuvar, antiülserojenik, antimikrobiyal, analjezik, sindirimi kolaylaştırıcı ve yara iyileştirici aktiviteleri için kullanılmaktadır. *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana*, Kuzey ve Orta Anadolu’da yayılış gösteren, çok yıllık endemik bir türdür. Anadolu’da “Dağ Çayı” olarak bilinen bu bitki, geleneksel olarak soğuk algınlığı semptomlarını gidermek için kullanılmaktadır. Dermal dokuların devamlılığının sağlanmasında görev alan kolajen, elastin ve hyaluronik asit gibi bileşenlerin yıkımına neden olan kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz gibi metalloproteinaz enzimlerinin inhibe edilmesi yara iyileşmesi sürecinde yararlı olabilmektedir. Bu çalışmada, *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin metanol, *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol ve kalan H<sub>2</sub>O ekstraktlarının yara iyileşmesinde kilit rol oynayan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki potansiyel inhibitör etkilerinin *in vitro* değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlarımıza göre, MeOH ekstresi, *n*-hekzan ve CHCl<sub>3</sub> alt ekstraktları elastaz enzime karşı sırasıyla, % 24.92, 21.08, 28.51, kolajenaz enzime karşı sırasıyla % 27.29, 15.41, 23.70 anlamlı inhibisyonlar göstermiştir. Buna karşın, ekstraktların hiçbirinde hyaluronidaz enzimi üzerinde inhibe edici etki gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin yara iyileşici aktivitesi bakımından *in vitro* enzim inhibisyonu değerlendirmesi ilk defa ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Sideritis germanicopolitana*, Lamiaceae, yara iyileştirici, elastaz, kolajenaz, hyaluronidaz

### ***In vitro* wound healing assessment of *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana***

#### **Abstract**

The genus *Sideritis* L. (Lamiaceae) is mainly distributed in Mediterranean region and commonly known as “Dağ çayı, Yayla çayı, Alanya adaçayı and Balbaşı” in Turkey. *Sideritis* genus has long been used for their anti-inflammatory, antiulcerogenic, antimicrobial, analgesic, digestive and wound healing properties in folk medicine. Amongst them, *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* is an endemic perennial plant mainly distributed in North and Central Anatolia. It is consumed as “Dağ çayı”, and traditionally used to relief the symptoms of common cold in Anatolia. Inhibition of metalloproteinase enzymes such as collagenase, elastase, and hyaluronidase which causes the destruction of components such as collagen, elastin and hyaluronic acid, which are involved in maintaining the continuity of dermal tissues, may be useful in wound healing process. In this study, it was aimed to evaluate the potential inhibitory effects of the methanol, *n*-hexane, chloroform, *n*-butanol, and remaining H<sub>2</sub>O extracts of *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* on hyaluronidase, collagenase, and elastase enzymes, which play the key role in the wound healing. According to the our results, the methanol extract, *n*-hexane, and chloroform subextracts displayed considerable inhibitions with 24.92, 21.08, 28.51% against elastase enzyme, 27.29, 15.41, 23.70% against collagenase enzyme, respectively. Otherwise, there is no inhibitory effect on hyaluronidase enzyme in none of the extracts. In conclusion, it was firstly revealed *in vitro* the evaluation of enzyme inhibition with regard to the wound healing activity of *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana*.

**Keywords:** *Sideritis germanicopolitana*, Lamiaceae, wound healing, elastase, collagenase, hyaluronidase

#### **GİRİŞ**



Ülkemizde “Dağ çayı, Yayla çayı, Ada çayı veya Balbaşı” gibi yöresel isimlerle bilinen *Sideritis* L. (Lamiaceae) türleri halk tıbbında gastrointestinal hastalıkların tedavisinde, öksürük ile soğuk algınlığında ve idrar söktürücü olarak kullanılmakla beraber, bitki çayı olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır (Güvenç ve Duman 2010). Ülkemizde %80 oranında endemizm gösteren *Sideritis* cinsi 46 tür ile yayılış göstermektedir (Huber-Morath, 1982; Güvenç ve Duman 2010).

*Sideritis*'in kelime kökeni, eski zamanlarda demir silahlarla yaralanmaları iyileştirmesi nedeniyle Yunanca demir anlamına gelen *sideros*'tan gelmektedir. *Sideritis* türlerinde başlıca terpenler, flavonoidler, uçucu yağlar, iridoitler, kumarinler, lignanlar ve steroller gibi sekonder metabolitler bulunmaktadır. Biyolojik aktiviteler bakımından *Sideritis* türleri araştırıldığında, bu türlerin anti-enflamatuvar, antioksidan, antiülser, analjezik, antimikrobiyal, antiproliferatif, antikanser ve insektisit etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (González-Burgos ve ark., 2011).

*Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* Anadolu'da bitki çayı olarak kullanılan çok yıllık endemik bir türdür (Huber-Morath, 1982). Bu bitki türü üzerinde yapılan fitokimyasal ve biyolojik çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Literatürde, bitkinin antioksidan (Tunalier ve ark., 2004) ve antifungal (Bayan ve Akşit, 2016) aktiviteleri üzerinde çalışmalar bulunmaktadır. Bitkinin iki alt türünün, *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* ve *S. germanicopolitana* subsp. *viridis*, uçucu yağ bileşenlerinin incelendiği bir çalışma mevcuttur (Kirimer ve ark., 1992). Kırmızıbekmez ve ark. (2019)'nın yaptıkları bir çalışmada *S. germanicopolitana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından feniletanoit glikozitleri, flavonoidler, lignan glikozitleri ve iridoit türevi glikozitler izole edilmiş ve bileşiklerin asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz ve lipoksijenaz enzimleri üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır.

Yara iyileşmesi birbirini takip eden ve iç içe geçen enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme fazı olmak üzere 3 aşamadan oluşan karmaşık bir süreçtir. Hücreleri destekleyen, esneklik veren ve canlılığının devamını sağlayan kolajen, elastin ve hyaluronik asit gibi ekstraselüler matriks bileşenleri yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunmaktadır (Yazar ve Karaca, 2016). Matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri dermal bağ dokusunda bulunan ekstraselüler matriks bileşenlerinin yıkımında rol oynayan ana proteolitik enzim grubudur. Kronik yaralara neden olan en önemli faktörlerden biri de kolajenaz, elastaz ve hyaluronidaz gibi MMP enzimlerinin fazla aktivasyonudur. Bu nedenle bu enzimlerin inhibe edilmesi yara iyileşmesi sürecinde yararlı olabilmektedir (Krishnaswamy ve ark., 2017).

Bu çalışmamızda, *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin metanol ekstresi ve bu ektreden hazırlanan *n*-hekzan, kloroform, *n*-butanol ve kalan H<sub>2</sub>O alt ekstralarının yara iyileşmesinde kilit rol oynayan hyaluronidaz, kolajenaz ve elastaz enzimleri üzerindeki potansiyel inhibitör etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

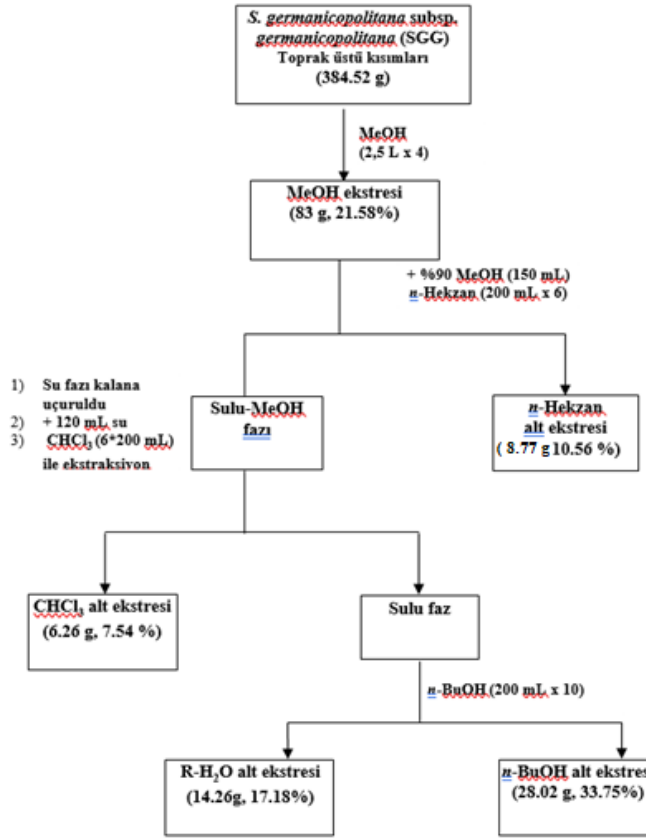
## **MATERYAL VE METOT**

### ***Bitki Materyali***

*S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin topraküstü kısımları çiçeklenme döneminde, Temmuz, 2017'de Bilecik, Söğüt'ten toplanmıştır. Toplanan bitkiler Prof. Dr. Hayri Duman tarafından teşhis edilmiştir. Herbaryum örneği (NK 9) Gazi Üniversitesi Herbaryumu'nda (GAZI) saklanmaktadır.

### ***Ekstraksiyon***

Bitkinin kurutulmuş ve toz edilmiş topraküstü kısımlarından (384.52 g) metanol (MeOH) (4x2.5 L) ile maserasyon yardımıyla ham metanol ekstresi hazırlanmıştır. Süzme işleminden sonra MeOH ekstresi vakum altında 40 °C'de kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kuru MeOH ekstresi (83 g), 250 mL MeOH içinde süspansiyon edildikten sonra sırasıyla *n*-hekzan (6x200 mL), kloroform (6x200 mL) ve *n*-butanol (10x200 mL) ile ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Geriye kalan H<sub>2</sub>O fazı dahil tüm alt ekstratlar vakum altında kuruluğa kadar uçurulmuş, bu işlemin sonunda *n*-hekzan (8.77 g), CHCl<sub>3</sub> (6.26), *n*-BuOH (28.02 g) ve kalan H<sub>2</sub>O (14.26) alt ekstratları elde edilmiştir. Ekstraksiyon şeması aşağıda verilmiştir (**Şekil 1**).



Şekil 1. *S. germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolitana* bitkisi üzerinde ekstraksiyon işlemi

### *In vitro* Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

#### *Hyaluronidaz Enzimini İnhibe Edici Aktivite*

Hyaluronidaz enzim inhibisyonu *N*-asetilglukozamin miktarı ölçülerek belirlenmiştir. 50 µL sığır hyaluronidazı (7900 ünite/mL) 0.1 M asetat tamponunda (pH 3.6) çözülmüştür. Daha sonra bu karışıma 50 µL %5 DMSO'da çözülmüş 3 farklı konsantrasyonda ekstre eklenmiştir. Kontrol grubu olarak ekstre yerine 50 µL %5 DMSO ile çalışılmıştır. 37°C'de 20 dk inkübasyondan sonra 50 µL kalsiyum klorür (12.5 mM) ilave edilip karıştırılmış ve tekrar 37°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. 250 µL sodyum hyaluronat (1.2 mg/mL) eklenmiş ve 37°C'de 40 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışıma 50 µL 0.4 M NaOH ve 100 µL 0.2 M sodyum borat ilave edilmiş ve kaynar su banyosunda 3 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 1.5 mL *p*-dimetilaminobenzaldehit çözeltisi ilave edilerek, renk oluşumu için 37°C'de 20 dk daha inkübe edilmiştir. Çözeltinin absorbansı spektrometrik olarak 585 nm'de ölçülmüştür (Sahasrabudhe ve Deodhar, 2010). Referans madde olarak 100 µg/mL konsantrasyonda tannik asit kullanılmıştır.

#### *Kolajenaz Enzimini İnhibe Edici Aktivite*

*Clostridium histolyticum* kolajenaz enzimi (ChC), 50 mM tris tampon (pH 7.5) içerisinde çözülmüştür. Sonra 2 mM *N*-[3-(2-Furil)akrilolil]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) çözeltisi tris tampon içerisinde hazırlanmıştır. 25 µL tampon, 25 µL DMSO'da çözülmüş örnek çözeltisi ile 25 µL enzim her kuyucuğa eklenerek 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. 50 µL substrat eklendikten sonra absorbans ölçümü 340 nm'de gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için üç tekrar yapılmıştır. Referans madde olarak 100 µg/mL konsantrasyonda epigallokateşin gallat kullanılmıştır (Barrantes and Guinea, 2003).

## Elastaz Enzimini İnhibe Edici Aktivite

İnsan nötrofil elastaz enzimi (17 mU/mL) ile örnek çözeltiler 0.1 M Tris-HCl tamponunda (pH 7.5) karıştırılmış ve 25°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma, *N*-Metoksisuksinil-Ala-Ala-Pro-Val *p*-nitroanilit (MAAPVN) eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Soya tripsin inhibitörü (1 mg/mL) reaksiyonu durdurmak için karışıma eklenmiş ve *p*-nitroanilin oluşumuna bağlı olarak absorbans ölçümü 405 nm'de gerçekleştirilmiştir. Referans madde olarak 100 µg/mL konsantrasyonda epigallokateşin gallat kullanılmıştır (Melzig et al., 2001; Tumen et al., 2017).

## İstatistiksel Analiz

*In vitro* enzim inhibisyon deneylerinden elde edilen veriler ve standart sapma değerleri, referans ve test materyali grupları arasındaki istatistiksel farklar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Endemik *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinden MeOH ekstresi (83 g) ve bu ekstreten sırasıyla *n*-hekzan (8.77 g), CHCl<sub>3</sub> (6.26), *n*-BuOH (28.02 g) ve kalan H<sub>2</sub>O (14.26) alt ekstreleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MeOH ekstresi, *n*-hekzan ve CHCl<sub>3</sub> alt ekstreleri elastaz enzimine karşı sırasıyla % 24.92, 21.08, 28.51 inhibisyon, kolajenaz enzimine karşı sırasıyla % 27.29, 15.41, 23.70, değerlerinde anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. Ekstrelerin hiçbirinde hyaluronidaz enzimi üzerinde inhibe edici aktivite gözlenmemiştir (**Tablo 1**)

**Tablo 1.** *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinden elde edilen ekstre ve alt ekstrelerin enzim inhibisyonu sonuçları

		Hyaluronidaz Enzim İnhibisyonu	Elastaz Enzim İnhibisyonu	Kolajenaz Enzim İnhibisyonu
	Konsantrasyon (µg/mL)	% İnhibisyon±O.S.H.	% İnhibisyon±O.S.H.	% İnhibisyon±O.S.H.
MeOH ekstresi	100	9.92 ± 1.7	24.92 ± 1.97*	27.29 ± 1.13**
<i>n</i> -hekzan alt ekstresi		8.54 ± 1.31	21.08 ± 1.15*	15.41 ± 1.28
CHCl <sub>3</sub> alt ekstresi		9.23 ± 1.86	28.51 ± 1.53*	23.70 ± 1.01**
<i>n</i> -BuOH alt ekstresi		14.81 ± 2.14	9.37 ± 1.29	9.86 ± 0.88
Kalan H <sub>2</sub> O alt ekstresi		18.66 ± 2.61	5.98 ± 1.04	10.50 ± 1.06
Tannik asit		65.87 ± 3.58***	-	-
EGCG		-	78.92 ± 1.48***	55.46 ± 1.99***

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

O.S.H.: Ortalama Standart Hata

## TARTIŞMA

*S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisi ile ilgili literatürde sınırlı sayıda fitokimyasal ve biyolojik çalışma mevcuttur. Kirimer ve ark. (1992) bitkinin iki alt türünün (subsp. *germanicopolitana* ve subsp. *viridis*) uçucu yağ bileşenlerini araştırmış, *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* uçucu yağının majör bileşenlerini mirsen ve sabinen olarak tespit etmiştir. Bitkinin antioksidan (Tunalier ve ark., 2004) ve antifungal (Bayan ve Akşit, 2016) aktiviteleri üzerinde çalışmalar bulunmaktadır.

Kırmızıbekmez ve ark. (2019) *S. germanicopolitana* bitkisinden izole ettikleri bileşiklerin, Alzheimer ve enfeksiyon hastalıklarında kilit rol oynayan asetilkolinesteraz, bütirikolinesteraz ve lipoksijenaz enzimleri üzerine inhibitör etkilerini araştırmış ve düşük ile orta düzeyde inhibisyon gözlenmiştir. Diğer *Sideritis* türleri üzerine yapılan daha önceki çalışmalar üreaz, tirozinaz, amilaz, glukozidaz gibi enzimler üzerindeki inhibitör

aktiviteyi ortaya koymuştur (Deveci ve ark., 2017; Zengin ve ark., 2019). Genel olarak, bu çalışmaların çoğunda aktivite ile fenolik profil arasında bir korelasyon gözlenmiştir (Celep ve ark. 2019).

Yaptığımız çalışmada özellikle ana MeOH ekstresi ve CHCl<sub>3</sub> alt ekstresi kolajenaz ve elastaz üzerine inhibitör aktivite göstermiştir. Bu bulgulara göre, MeOH ekstresinde aktivite görmemizi sağlayan etkili bileşiğin sıvı-sıvı fraksiyonlama işlemi sırasında CHCl<sub>3</sub> alt ekstresine geçtiği yorumunda bulunulabilir. Buna karşın, ekstrelerin hiçbirinde hyaluronidaz enzimi üzerinde inhibe edici etki gözlenmemiştir. Çalışmamız *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin *in vitro* yara iyileştirici aktivitesinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

## SONUÇ

Sonuç olarak *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin MeOH ekstresi, *n*-hekzan ve CHCl<sub>3</sub> alt ekstreleri elastaz enzimi üzerine, MeOH ekstresi ve CHCl<sub>3</sub> alt ekstresi ise kolajenaz üzerine anlamlı düzeyde enzim inhibitör aktivite göstermiştir. *S. germanicopolitana* subsp. *germanicopolitana* bitkisinin yara iyileştirici potansiyeli *in vitro* deney modelleriyle ilk kez taranmıştır. Biyoaktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmaları, yara iyi edici etkiye sahip olan doğal kaynaklı yeni bileşiklerin keşfedilmesi bakımından önem taşımaktadır Bu bakımdan etkili bulunan alt ekstrelerden aktiviteden sorumlu bileşiklerin izolasyon ve yapı tayini çalışmaları tarafımızca yürütülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 02/2018-09).

## KAYNAKLAR

- Barrantes E, Guinea M 2003. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Science*, 72: 843-850.
- Bayan Y, Akşit H 2016. Antifungal activity of essential oils and plant extracts from *Sideritis germanicopolitana* Bornm. growing in Turkey. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2): 333-337.
- Celep E, Seven M, Akyüz S, İnan Y, Yesilada E 2019. Influence of extraction method on enzyme inhibition, phenolic profile and antioxidant capacity of *Sideritis trojana* Bornm. *South African Journal of Botany* 121, 360–365.
- Deveci E, Tel-Çayan G, Yıldırım H, Duru M E 2017. Chemical composition, antioxidant, anticholinesterase and anti-urease activities of *Sideritis pisidica* Boiss. & Heldr. Endemic to Turkey. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21, 898–905.
- González-Burgos, E, Carretero M E, Gómez-Serranillos M P. et al. ( 2011). *Sideritis* spp.: Uses, chemical composition and pharmacological activities-A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 209-25.
- Güvenç A, Duman H 2010. Morphological and anatomical studies of annual taxa of *Sideritis* L. (Lamiaceae), with notes on chorology in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 34, 83-104.
- Huber-Morath 1982. *Sideritis* L. In: Davis PH, editor. Flora of Turkey and the east Aegean Islands. Vol. 7. Edinburgh: University Press; p.178-199.
- Kirimer N, Koca F, Başer KHC, Özek T, Tanrıverdi H, Kaya A 1992. Composition of the essential oils of two subspecies of *Sideritis germanicopolitana* Bornm. *J Essent Oil Res* 4: 533-534.
- Kırmızıbekmez H, Erdoğan M, Kúsz N, Karaca N, Erdem U, Demirci F, Hohmann J 2019. Secondary metabolites from the aerial parts of *Sideritis germanicopolitana* and their *in vitro* enzyme inhibitory activities. *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2019.1586700
- Krishnaswamy V R, Mintz D, Sagi I 2017. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim. Biophys. Acta*, 1864 (11 Pt B), 2220–2227.
- Melzig M F, Loser B, Ciesielski S 2001. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie*. 56, 967-70.
- Sahasrabudhe A, Deodhar M 2010. Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *Int J Bot.* 6, 299-303.
- Tumen I, Guragac F T, Keles H, Reunanen M, Kupeli Akkol E 2017. Characterization and Wound Repair Potential of Essential Oil *Eucalyptus globulus* Labill., *Fresenius Envir. Bull.* 26 (11), 6390-6399.
- Tunalier Z., Kosar M., Ozturk N, Baser K H C 2004. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* Species, *Chemistry of Natural Compounds* 40(3), 177–180.

- Yazar H, Karaca İ R 2016. Yumuşak Dokuda Yara İyileşmesi, Etkileyen Faktörler Ve Skar Revizyonu. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.* 15, 152-161.
- Zengin G, Uğurlu A, Baloğlu M C, Diuzheva A, Jek"o J, Cziáky Z, Ceylan R, Aktumsek A, Picot-Allain C M N, Mahomoodally MF 2019. Chemical fingerprints, antioxidant, enzyme inhibitory, and cell assays of three extracts obtained from *Sideritis ozturkii* Aytac, & Aksoy: An endemic plant from Turkey. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171, 118–125.

DRAFT

## Bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi

Metin Konuş, Can Yılmaz, Doğan Çetin\*

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van

\*Sorumlu yazar e-mail: dogan.194@hotmail.com

### Özet

Sirke, değişik hammaddeler kullanılarak farklı yöntemlerle elde edilen bir fermantasyon ürünüdür. Gıdalarda koruyucu ve aroma verici madde olarak kullanılan sirke eski zamanlardan bu yana hastalıkların tedavilerinde de kullanılan geleneksel bir üründür. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasını engelleyen ya da radikalleri süpürerek hücrenin hasar görmesini engelleyen ve genellikle yapısında fenolik grup taşıyan moleküllere denmektedir. Bu çalışmada ticari olarak satılan nar, kuşburnu, elma ve üzüm sirkesi olmak üzere dört sirkenin antioksidan özellikleri DPPH ve Galvinoxil antioksidan kapasite yöntemleriyle belirlendi. Kullanılan her iki antioksidan yöntemi de serbest radikal ile antioksidan maddenin tepkimesi sonucu meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Sonuçlar standart madde olarak kullanılan askorbik asit (DPPH yöntemi için) ve troloks (Galvinoxil yöntemi için) ile karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda kullanılan her iki antioksidan kapasite yönteminde (Galvinoxil ve DPPH yöntemi) de test edilen sirkelerin antioksidan kapasiteleri nar sirkesi > kuşburnu sirkesi > üzüm sirkesi > elma sirkesi olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar, Antioksidan kapasite, Serbest radikaller, Sirke

### Abstract

Vinegar is a fermentation product obtained by different methods using different raw materials. Vinegar, which is used as a preservative and a flavoring agent in foods, is a traditional product used in the treatment of diseases since ancient times. Antioxidants, molecules that prevent the formation of free radicals or by blocking the radicals to prevent damage to the cell and the structure is usually called the phenolic group molecules. In this study, antioxidant properties of four vinegar, commercially sold pomegranate, rosehip, apple and grape vinegar, were determined by DPPH and Galvinoxil antioxidant capacity methods. Both antioxidant methods used are based on the principle of spectrophotometric measurement of the color change resulting from the reaction of the free radical and the antioxidant. The results were compared with ascorbic acid (for DPPH method) and trolox (for the Galvinoxil method), which were used as standard substances. At the end of the study, the antioxidant capacities of the vinegars tested in both antioxidant capacity methods (Galvinoxil and DPPH method) were found as pomegranate vinegar> vinegar vinegar> vinegar vinegar> apple cider vinegar.

**Keywords:** Antioxidants, Antioxidant capacity, Free radicals, Vinegar

### GİRİŞ

Serbest radikaller, son yörüngesinde bir ya da birden fazla ortaklanmamış elektron taşıyan yüksek oranda reaktif atom ya da moleküllerdir (Sohal, 1993). Bu ortaklaşmamış elektronlar serbest radikallerin reaktif olmasına neden olmaktadır. Küçük moleküller olan serbest radikaller düşük aktivasyon enerjisine sahip olup kısa ömürlüdürler (Jensen, 2003). Serbest radikaller kararsız moleküller olduklarından dolayı diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunarak kararlı hale geçmeye çalışırlar. Böylece, organizmada indirgeyici ya da yükseltgeyici özellik gösterebilirler (Çaylak, 2011). Serbest radikaller istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına neden olarak organizmada birçok hasara neden olmaktadır. Bunlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitlerdeki bozukluklar, membran bütünlüğünün bozulması, genetik mutasyonlar şeklinde olabilmektedir (Memişoğulları, 2005).

Antioksidanlar moleküller vücut tarafından üretilbilir ya da gıdalar aracılığıyla vücuda alınabilmektedir. Gıdalarda bulunan ve insan vücudunu serbest radikallere karşı koruyan başlıca doğal antioksidanlar vitaminler, karotenoidler, flavonoidler ve polifenollerdir (Yavaşer, 2011).

Sirke içerisinde barındırdığı çeşitli fenolik bileşikler, aminoasitler, vitaminler, organik asitler ve melanoidinler sayesinde antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik ve antikarsinogenik özellikleri ile sağlık üzerinde birçok etkiye sahiptir (Şengün ve Kılıç, 2018).

## MATERYAL VE METOD

### 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

Blois (1958)'un DPPH yöntemi modifiye edilerek sirkelerin radikal süpürme kapasiteleri belirlendi. DPPH, kahverengi şişeler içerisinde konsantrasyonu 400 µM olacak şekilde saf etanol ile çözdürüldü. Tamamen çözünmesi için DPPH ultrasonikatör içerisinde 30 dakika bekletildi. Test edilen sirkeler etanol ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyon hazırlandı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Her konsantrasyon ve kör (blank) için üçer örnek hazırlandı. Her örnek 100 µM DPPH içeren ortamda 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV/VIS spektrofotometrede 517 nm'de referansa (etanol) karşı okundu. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. Tüm ölçümler üçer tekrar olarak gerçekleştirildi. Radikal yakalama aktivitesi (% RSA) aşağıdaki formülde belirtildiği gibi hesaplanarak askorbik asit ile karşılaştırıldı.

$$\% \text{ RSA} = ((\text{KörAbs} - \text{ÖrnekAbs}) / \text{KörAbs}) \times 100$$

### Galvinoksil Yöntemi

Shi ve Niki (1998) galvinoksil metodu optimize edilerek uygulandı. Bu yöntemde 160 µM olacak şekilde galvinoksil solüsyonu etanol ile hazırlandı. Test edilen sirkeler ve standart olarak kullanılan troloks saf etanolde çözülerek beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol ile seyreltmeler yapıldı. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı. Her tüpe farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış maddelerden eklenerek 8 µM galvinoksil çözeltisi içinde 20 dakika karanlık ortamda inkübasyona alındı ve spektrofotometrede 428 nm'de referansa (etanol) karşı okuma yapıldı. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. % Radikal yakalama aktivitesi DPPH yönteminde kullanılan formül ile hesaplanarak örneklerin antioksidan potansiyelleri troloks ile karşılaştırıldı.

## SONUÇ

Tablo 1'de DPPH yöntemi kullanılarak test edilen sirke örneklerinin radikal süpürme aktiviteleri (%RSA) görülmektedir. Seyreltme oranı arttıkça çözeltideki madde miktarı azalacağından dolayı seyreltme oranı arttıkça antioksidan aktivite artacaktır. Nar sirkesinin 250 kat seyreltilmiş hali, üzüm sirkesinin 16,1 kat seyreltilmiş hali, kuşburnu sirkesinin 113,6 kat seyreltilmiş hali ve elma sirkesinin 7,57 kat seyreltilmiş hali DPPH radikalinin %50'sini inhibe ederken, 6,21 µg/ml askorbik asit (C vitamini) benzer etkiyi gösterdi. Buna göre test edilen sirkelerin antioksidan kapasiteleri nar sirkesi > kuşburnu sirkesi > üzüm sirkesi > elma sirkesi şeklindedir.

**Tablo 1.** Farklı derişimlerdeki sirkelerin DPPH radikal süpürme aktiviteleri

Test Edilen Sirke	Seyreltme Faktörü*	%RSA**
Üzüm Sirkesi	170,6	8,7
	85,3	11,3
	42,6	18,4
	21,3	37,4
	10,6	62,29
Nar Sirkesi	1696	14,1
	848	22,3
	424	40,6
	212	65,8
	106	88,3
Kuşburnu Sirkesi	1333,3	11
	666,6	16,1
	333,3	27,5
	166,6	41,2
	83,3	61,5
Elma Sirkesi	63,3	8,03
	26,6	14,87
	13,3	29,15
	6,6	56,4
	3,3	87,69

% RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi

\*: Ticari olarak satılan ürünün seyreltme oranı

\*\* : Tablodaki değerler üç farklı deneme sonucunun ortalamasıdır.

Tablo 2'de galvinoksil yöntemi kullanılarak test edilen sirke örneklerinin radikal süpürme aktiviteleri görülmektedir. Radikal süpürme aktiviteleri sabit tutulduğunda seyreltme oranı arttıkça antioksidan kapasite

artacaktır. Sonuçlara bakıldığında nar sirkesinin 446,4 kat seyreltilmiş hali, üzüm sirkesinin 22,6 kat seyreltilmiş hali, kuşburnu sirkesinin 294 kat seyreltilmiş hali ve elma sirkesinin 10,9 kat seyreltilmiş hali Galvinoxil radikalının %50'sini inhibe ederken, 0,4 µg/ml troloks (E vitamini analogu) benzer etkiyi gösterdiği görülmektedir. Buna göre örneklerin antioksidan kapasiteleri DPPH yönteminde olduğu gibi nar sirkesi > kuşburnu sirkesi > üzüm sirkesi > elma sirkesi olduğu görülmektedir.

**Tablo 2.** Farklı derişimlerdeki sirkelerin galvinoxil radikali süpürme aktiviteleri

Test Edilen Sirke	Seyreltme Faktörü*	%RSA**
Üzüm Sirkesi	280	12,7
	140	18,7
	70	25,6
	35	42,8
	17,5	57,1
Nar Sirkesi	3360	12
	1680	22,9
	840	32,9
	420	51,2
	210	66,3
Kuşburnu Sirkesi	3360	10,6
	1680	14,6
	840	23
	420	37,1
	210	54,4
Elma Sirkesi	83,2	3,4
	41,6	12,3
	20,8	27,3
	10,4	51
	5,2	74,7

% RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi

\*: Ticari olarak satılan ürünün seyreltme oranı

\*\* : Tablodaki değerler üç farklı deneme sonucunun ortalamasıdır.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada DPPH ve Galvinoxil yöntemleriyle ticari olarak satılan nar, üzüm, elma ve kuşburnu sirkelerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar DPPH yöntemi için askorbik asitle (C vitamini), Galvinoxil yöntemi için troloks ile (E vitamini analogu) karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda kullanılan her iki antioksidan kapasite yönteminde (Galvinoxil ve DPPH yöntemi) de test edilen sirkelerin antioksidan kapasiteleri nar sirkesi > kuşburnu sirkesi > üzüm sirkesi > elma sirkesi olarak bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Akbaş, M., & Cabaroğlu, T. (2010). Ülkemizde Üretilen Bazı Üzüm Sirkelerinin Bileşimleri Ve Gıda Mevzuatına Uygunlukları Üzerine Bir Araştırma. *Gıda/The Journal Of Food*, 35(3).
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617): 1199.
- Çaylak, E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Jensen, S. J. K. 2003. Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 666: 387-392.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10): 3954-3962.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
- Shi, H., Niki, E. 1998. Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. *Lipids*, 33 (4): 365.
- Sohal, R. S. 1993. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clinical and Experimental Research*, 5 (1): 3-17.



- Şengün, İ. Y., & Kılıç, G. (2018). Dut Sirkesinin Mikrobiyolojik, Fiziksel, Kimyasal, Antiradikal ve Antimikrobiyal Özellikleri. *Akademik Gıda*, 16(2), 168-175.
- Yavaşer, R. 2011. *Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi) Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Aydın. Türkiye.

DRAFT

## Comparison of aqueous extraction and Bligh and Dyer method on fatty acid profiles of elasmobranch fish liver

Ayşe Özyılmaz

Iskenderun Technical University, Faculty of Marine Science and Technology, Department of Marine Technologies, Iskenderun/Hatay, TURKEY

\*Corresponding author e-mail: ayse.ozyilmaz@iste.edu.tr

### Abstract

Aqueous extraction (AE) and Bligh and Dyer method (B&D) on fatty acid profiles of elasmobranch fish liver were investigated and compared in this current study. Guitarfish liver were chosen and evaluated. The results of fatty acid profiles of guitarfish show that there is no difference in monounsaturated fatty acid (MUFA) content which are almost same in both methods. The levels of saturated fatty acids (SFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) were in higher in Bligh and Dyer method. While there are statistical differences in the fatty acid composition of SFA and PUFA ( $p < 0.05$ ), there wasn't in MUFA ( $p > 0.05$ ) contents. The levels of C14:0, C16:0, C18:0 in SFA, eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3), docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3), n6, n3 in PUFA in B&D method were found to be higher than that of AE. In conclusion, SFA components in AE and PUFA components in B&D method give better results.

**Keywords:** Aqueous extraction (AE), Bligh and Dyer method (B&D), fatty acid profiles

### INTRODUCTION

The common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos* (Linnaeus, 1758) is an elasmobranch of the *Rhinobatidae* family and a cartilaginous fish species which is a by-product. Only the muscle parts of these species are utilized as food. All other parts (head, viscera, and livers) are wasted. Several authors have studied the lipid composition of by-products, especially liver and have revealed that they have high proportion of lipids and that livers contain higher amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially those of the omega-3 series which are mainly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) (Özyılmaz, 2016; Özyılmaz and Öksüz, 2015; Navarro-García et al., 2004; Ould El Kebir et al., 2003).

Intake of these fatty acids is important in human nutrition in order to prevent disease prevention. Total lipid content of fish including cartilaginous fish species is an important issue for that matter. That is why methods for the extraction of lipids from aquatic products are of critical importance for end product prepared for the consumers. There are different extraction techniques were available in literature for lipid extraction e.g., the Soxhlet method (AOAC, 1996), and Folch method (Folch, et al., 1957) and Bligh and Dyer (Bligh & Dyer, 1959) which all require various analytical steps which consume time and cost a lot involve chemicals. On the other hand, aqueous extract involve no chemicals just water and heat. According to Rosenthal et. al., (1996), aqueous process for oil extraction seems to be as an environmentally cleaner alternative technology. The aqueous extraction method (extraction requiring just water as medium) was originally suggested as an alternative to the solvent oil extraction process in the 1950s. It was considered as safer as and cheaper than chemicals involved ones. Additionally, the simultaneous recovery of oil from oil-bearing materials could be possible (Cater, et. al., 1974). The aim of this present study is to find out the difference between the aqueous extraction (AE) and Bligh and Dyer method (B&D) on fatty acid profiles of elasmobranch fish liver.

### MATERIALS AND METHODS

The liver of common guitarfish *Rhinobatos rhinobatos* (Linnaeus, 1758) were chosen for this study. Fish were obtained from north-eastern Mediterranean. All chemicals used in this current study were chosen in analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Lipid extraction were obtained by using aqueous extraction and Bligh and Dyer method

**Lipid Extraction by using aqueous extraction;** chopped liver weight and placed into a glass flask (laboratory beakers, made from uniform thickness, high quality, heat resistant). Water was added on it. Placed on a heating block and stirred until it was boiled. After cooling down top layer was liver oil.

### **Lipid Extraction by using modified Bligh and Dyer method (Hanson and Olley, 1963);**

For each sampling, approximately 10 g of chopped liver weight with a precision close to 0.001 and placed into a homogenisation flask. A total of 6 ml of pure water was added on it. After the addition of 20 ml of chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) and 40 ml of methanol (Merck, Darmstadt, Germany), the mixture was homogenised for 60 second. An additional 20 ml of chloroform was added, and the mixture was homogenised for 30 seconds this time. Following, 20 ml of water was added, and the mixture was homogenised for a further 30 seconds. The homogenate was divided into two centrifuge tubes and centrifuged for 20 minutes at 2000 rpm. After the centrifugation, the aqueous layer was removed by aspiration with a careful handling. A total of 20 ml of the chloroform layer was transferred into a dry pre-weighed round-bottom flask. The chloroform was evaporated using a rotary vacuum evaporator at 45 °C. Final drying was performed in an oven at 105 °C for 30 minutes or if needed more. The flask was allowed to cool to room temperature in desiccators for approximately 30 minutes and weighed. The following equation was used to calculate the lipid content of the samples.

Equation: Percentage of lipid in the fish (Bligh & Dyer Method).

$$\% \text{ Lipid (B \& D)} = \frac{W_L}{W_S} \times \frac{V_1}{V_2} \times 100$$

Where:

$W_L$  = Weight of the lipid extracted (g)

$W_S$  = Weight of the sample (g)

$V_1$  = Total volume of chloroform that used for lipid extraction (mL)

$V_2$  = Volume of chloroform used for evaporation (mL)

**Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) Preparation:** The conversion and separation of FAMES were performed as described in Özyılmaz, 2019.

**Instrument and Column:** Fatty acids were analysed by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)) using a Hewlett Packard GC (model 6890) coupled with a Hewlett Packard model 5972A HP 6890 system MS detector. Fatty acids were separated using an HP-INNOWAX Polyethylene Glycol Capillary Column, Model Number: HP 19091N-133. The oven programme and the identification of individual fatty acids were performed according to Öksüz and Özyılmaz (2015).

### **Statistical analysis**

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and mean comparison was carried out using Duncan's test. Statistical analysis was performed with SPSS 22.0. Significance was established at  $P < 0.05$ . The Aqueous extraction (AE) and Bligh and Dyer method (B&D) on fatty acid profiles of elasmobranch fish liver were compared in this current study.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Fatty acid profiles of guitarfish by applying AE and B&D were shown in Table 1. Each of saturated fatty acids (SFA) components and total SFA were differed from each other and these differentiation were found to be statistically significant ( $p < 0.05$ ). Lamas and Massa (2019) studied fatty acid profiles of two rays (*Zearaja flavirostris* and *Atlantoraja castelnaui*) liver oils obtained by three different methodologies (enzyme extraction, cold extraction, and high-temperature extraction) and found out that both *Zearaja flavirostris* and *Atlantoraja castelnaui* species, the highest percentage of SFA was obtained by solvent extraction method. In this present study, solvent extraction gave the higher results in SFA (Lamas and Massa, 2019). This present study and given previously reported one have similarity regarding solvent extraction giving higher SFA content in fatty acid profiles of liver oil of elasmobranch fish species.

Unlike SFA components and total SFA, mono unsaturated fatty acids (MUFA) components and total MUFA were not differed from each other and as a result these differentiation were found to be statistically insignificant ( $p > 0.05$ ), except erucic acid (C22:4n6). While SFA components and total SFA were affected by the extraction methods, MUFA components and total MUFA were not affected that much.

**Table 10.** Fatty acid profiles of guitarfish by applying Aqueous extraction (AE) and Bligh and Dyer method (B&D)

Methods Fatty Acids	Aqueous Extraction	Bligh and Dyer Method	Mean	P
C14:0	1.70±0.01	2.00±0.03	1.85±0.17	.000
C16:0	25.63±0.02	26.55±0.28	26.09±0.53	.005
C18:0	3.06±0.04	3.73±0.06	3.40±0.37	.000
ΣSFA	30.39±0.06	32.28±0.23	31.34±1.04	.000
C16:1	15.31±0.10	15.31±0.13	15.31±0.10	.974
C18:1n9	22.93±0.20	22.87±0.39	22.90±0.28	.833
C20:1n9	1.69±0.01	1.91±0.39	1.80±0.27	.367
C22:1n9	1.43±0.07	1.83±0.02	1.63±0.23	.001
ΣMUFA	41.36±0.17	41.93±0.38	41.65±0.41	.077
C18:2n6	0.64±0.06	0.95±0.02	0.80±0.18	.001
C20:4n6	2.05±0.04	2.41±0.27	2.23±0.26	.087
C22:5n6	1.29±0.01	1.44±0.11	1.37±0.10	.084
Σn6	3.99±0.03	4.80±0.40	4.39±0.51	.024
C20:5n3	5.19±0.07	5.79±0.16	5.49±0.35	.004
C22:5n3	1.32±0.02	1.61±0.09	1.46±0.17	.006
C22:6n3	12.47±0.10	13.59±0.07	13.03±0.62	.000
Σn3	18.98±0.16	20.99±0.22	19.98±1.11	.000
ΣPUFA	22.96±0.16	25.79±0.50	24.38±1.58	.001

P column in table means significantly different (P<0.05).

Values were presented as mean SD (n=3).

Additionally, polyunsaturated fatty acids (PUFA) components and total PUFA were affected by the extraction methods. There were observed some statistical significant differences in the fatty acid composition of PUFA and PUFA components (p<0.05), except C22:5n6, C20:4n6. All SFA and PUFA components were higher in B&D. The levels of EPA in this study for both methods were found to be higher than that of guitar fish living in north eastern mediterranean (Özyılmaz and Öksüz, 2015). Ozogul et. al., (2018) used four different lipid extraction methods and reported some statistical differences in the some fatty acid contents of fish oil obtained by different extraction method. They found the highest C18:2n6 (linoleic acid) level from Bligh and Dyer method in fish oil (red mullet) (Ozogul et. al., 2018). This present study and given previously reported one are in parallel obtaining higher amount of linoleic acid with solvent extraction method.

Figure 1 and Figure 2 compare the data obtained for each fatty acid components from each extraction methods used in this current study. Figure 1 generalize the higher ones obtain from Bligh and dyer methods. Figure 2 shows the ones which very close to each other and the ones that did not affected by the extraction methods.

## CONCLUSION

While the amounts of monounsaturated fatty acids did not change by the extraction methods (aqueous extraction and Bligh and Dyer method), those of saturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids levels in fish liver oil varied and these variation were found to be with statistically significant (p<0.05). Saturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids were in higher amounts aqueous extraction and Bligh and Dyer methods, respectively.

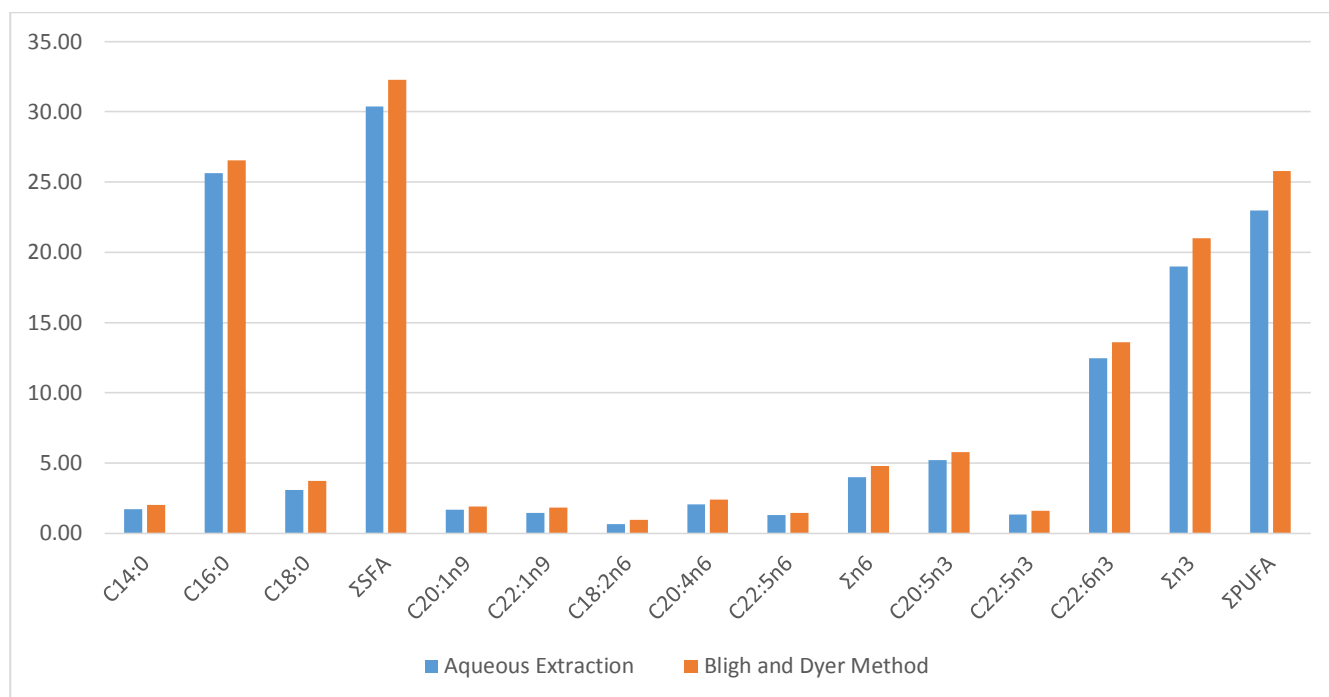


Figure 1. The fatty acids which are higher in Aqueous extraction and Bligh and Dyer method on profiles

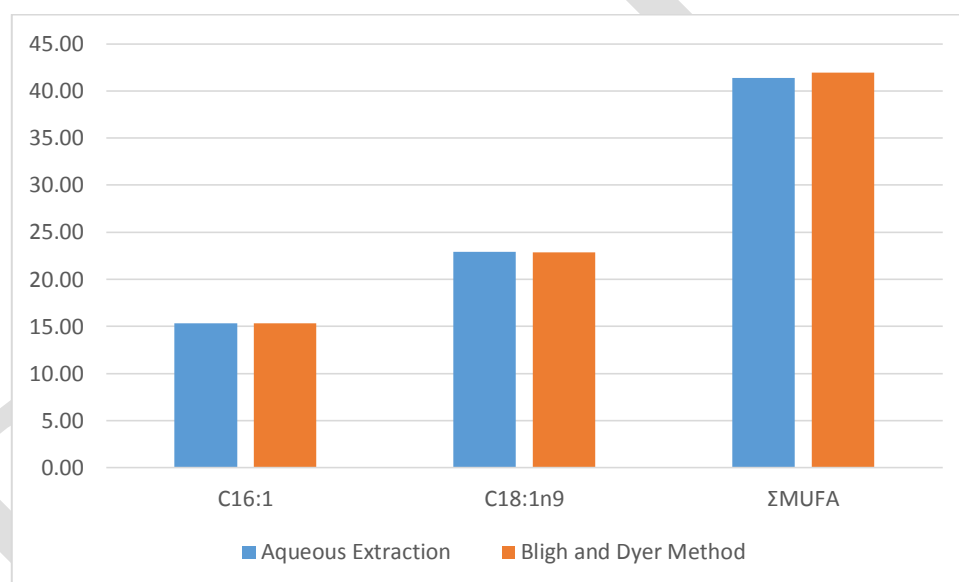


Figure 1. The fatty acids which are almost equal in both Aqueous extraction and Bligh and Dyer method

## REFERENCES

- AOAC, 1996. Official Methods and Recommended Practices, 1996–1997 edn., Am 3–96, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1997.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Cater, C. M., Rhee, K. C., Hagenmaier, R. D., and Mattil. K. F. Aqueous extraction-an alternative oilseed milling. *J. Am. Oil Chem. Sot.* 1974, 51, 137-14.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Lamas, D. L., & Massa, A. E. (2019). Ray Liver Oils Obtained by Different Methodologies: Characterization and Refining. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(5), 555-569.

- Navarro-García, G., Pacheco-Aguilar, R., Bringas-Alvarado, L., & Ortega-García, J. (2004). Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of *Dasyatis brevis* and *Gymnura marmorata* rays. *Food chemistry*, 87(1), 89-96.
- Ould El Kebir, M. V., Barnathan, G., Siau, Y., Miralles, J., & Gaydou, E. M. (2003). Fatty acid distribution in muscle, liver, and gonads of rays (*Dasyatis marmorata*, *Rhinobatos cemiculus*, and *Rhinoptera marginata*) from the East Tropical Atlantic Ocean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(7), 1942-1947.
- Ozogul, Y., Ucar, Y., Takadaş, F., Durmus, M., Köşker, A. R., & Polat, A. (2018). Comparison of Green and Conventional Extraction Methods on Lipid Yield and Fatty Acid Profiles of Fish Species. *European journal of lipid science and technology*, 120(12), 1800107.
- Ozyilmaz, A. (2016). Tocopherol, heavy metals (Cd, Pb, Cu, Fe, Mn, Zn), and fatty acid contents of thornback ray (*Raja clavata* Linnaeus, 1758) liver oil in relation to gender and origin in the Mediterranean and Black seas. *Journal of Applied Ichthyology*, 32(3), 564-568.
- Özyilmaz, A., & Öksüz, A. (2015). Determination of the biochemical properties of liver oil from selected cartilaginous fish living in the northeastern Mediterranean. *J. Anim. Plant Sci*, 25, 160-167.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and microbial technology*, 19(6), 402-420.

## A preliminary Study on Lipid Quality of Three Commercially Important Fish Species from Black Sea

Ayşe Özyılmaz\*

\*Iskenderun Technical University, Faculty of Marine Science and Technology, Department of Marine Technologies, Iskenderun/Hatay, TURKEY

\*Corresponding author e-mail: [ayse.ozyilmaz@iste.edu.tr](mailto:ayse.ozyilmaz@iste.edu.tr)

### Abstract

Lipid quality of three commercially important fish species, anchovy (*Engraulis encrasicolus*; Linnaeus, 1758), horse mackerel (*Trachurus trachurus*; Linnaeus, 1758), and whiting (*Merlangius merlangus*; Linnaeus, 1758), from Black Sea were investigated by measuring its fatty acid profiles. The results showed that the dominant fatty acid in saturated fatty acids (SFA) was C16:0 followed by C14:0 and C18:0. The levels of C16:0 differed in species and this differences were found statistically significant between anchovy and the other two ( $P<0.05$ ). Even though the level of C16:0 in horse mackerel was found to be higher than that of whiting, there were no significant differences between them. The average levels of fatty acid in monounsaturated fatty acid (MUFA) were C18:1n9 with the values of 16.76%, 12.60%, and 11.86% for anchovy, horse mackerel, and whiting, respectfully. The amounts of eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3), docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3) in polyunsaturated fatty acids (PUFA) in whiting were found to be higher than those of horse mackerel and anchovy. In conclusion, all three fish rich in omega 3 fatty acids.

**Keywords:** Lipid quality, fatty acid profiles, anchovy, horse mackerel, whiting

### INTRODUCTION

Anchovy, horse mackerel, and whiting are three fish species in the Black Sea region. Besides their delicious taste and affordable price, these fish have a very different meaning for the people around the region. The fishes are most abundant fish species and caught a lot for years except whiting. According to TURKSTAT (2001-2018) and FAO (2004) reports, anchovy has the majority of the total catch except a few years and anchovy by itself generated 10% of total captured fish in the world, respectively. Anchovy is also important and widely-consumed fish in Turkey followed by horse mackerel and whiting.

There has been a growing interest which starts a few decades ago in healthy diets. Fish is one of the most precious food items due to rich oil contents. According to many health care departments, fish (particularly fatty fish) should be eating in order to maintain healthy diets. For this matter, fish can be considered as a good source healthy lipid containing foods due to fatty acids contents.

Even though previous researches have studied fatty acid compositions of anchovy from the Black Sea region in different time scale (Kocatepe and Turan, 2012; Tufan et al., 2011; Oksuz et al., 2010; Oksuz et al., 2009), especially nutrition quality of anchovy should be studied more than any other fish species because of its economical importance. On the other hand, fatty acid compositions of horse mackerel and whiting did not studied as much as that of anchovy. There are a few studies about horse mackerel and whiting especially from Black sea region in Turkey (Tufan and Köse, 2014; Özyılmaz, 2015; Tufan, et al., 2016; Koral et al., 2016). There are also some other studies from other part of Turkey (Celik, 2008; Özyılmaz, 2014). Therefore, the objective of this present study is to investigate fatty acid contents of anchovy, horse mackerel and whiting due to their high variability.

### MATERIALS AND METHODS

The anchovy (*Engraulis encrasicolus*; Linnaeus, 1758), horse mackerel (*Trachurus trachurus*; Linnaeus, 1758), and whiting (*Merlangius merlangus*; Linnaeus, 1758) used in this current study were bought in fish markets in Trabzon in 2016. All chemicals used in this current study were chosen in analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lipid extraction were obtained by using Bligh and Dyer method.

### **Lipid Extraction by using modified Bligh and Dyer method (Hanson and Olley, 1963);**

For each sampling, approximately 10 g of edible part of fish muscle were weight with a precision close to 0.001 and placed into a homogenisation flask. A total of 8 ml of pure water was added on it. After the addition of 40 ml of chloroform (Merck, Darmstadt, Germany) and 40 ml of methanol (Merck, Darmstadt, Germany) were added and homogenate. Following, 20 ml of water was added, and the mixture was homogenised again. The homogenate was centrifuged. After the centrifugation, the aqueous layer was removed by aspiration with a careful handling. A certain amount of chloroform layer was transferred into a dry pre-weighed round-bottom flask. The chloroform was evaporated. Final drying was performed in an oven.

**Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) Preparation:** The conversion and separation of FAMES were performed as described in Özyılmaz, 2016.

**Instrument and Column:** Fatty acids were analysed by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)) using a Hewlett Packard GC (model 6890) coupled with a Hewlett Packard model 5972A HP 6890 system MS detector. Fatty acids were separated using an HP-INNOWAX Polyethylene Glycol Capillary Column, Model Number: HP 19091N-133. The oven programme and the identification of individual fatty acids were performed described in Özyılmaz (2016).

### **Statistical analysis**

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and mean comparison was carried out using Duncan's test. Statistical analysis was performed with SPSS 22.0. Significance was established at  $P < 0.05$  to see the difference among three fish species.

## **RESULTS and DISCUSSION**

Fatty acid profiles of anchovy, horse mackerel, and whiting obtained from Black Sea region (in Trabzon) were shown in Table 1. The results showed that the dominant fatty acid in saturated fatty acids (SFA) was C16:0 (palmitic acid) followed by C14:0 (myristic acid) and C18:0 (stearic acid). The levels of C16:0 differed in species and this differences were found statistically significant between anchovy and the other two ( $P < 0.05$ ). Even though the level of C16:0 in horse mackerel was found to be higher than that of whiting, there were no significant differences between them.

The average level of the SFA in the fish muscle were calculated to be 42.13% for anchovy, 34.91% for horse mackerel, and 27.58 for whiting. The major component of the SFA was calculated to be the palmitic acid for all species used in this current study, followed by stearic acid and myristic acid. The amounts of oleic acid in anchovy, horse mackerel, and whiting constitute majority part of the monounsaturated fatty acids. Approximately 26.20%, 21.65%, and 17.87% monounsaturated fatty acids were calculated to be in muscle of anchovy, horse mackerel, and whiting, respectively.

The Table 1 in column called "Mean" shows the average value of these three fish. If a person consumes a mix of 100 g in equal amount, she/he will get the stated amount of fatty acids which is shown in in Table 1 column called "Mean". The table 1 provides useful information about fatty acid contents of these three fish. In monounsaturated fatty acids (MUFA), oleic acid (C18: 1n9) was highest observed in anchovy, followed by horse mackerel, and whiting.



**Table 11.** Fatty acid profiles of anchovy (*Engraulis encrasicolus*; Linnaeus, 1758), horse mackerel (*Trachurus trachurus*; Linnaeus, 1758), and whiting (*Merlangius merlangus*; Linnaeus, 1758)

	<b>Anchovy</b>	<b>Horse Mackerel</b>	<b>Whiting</b>	<b>Mean</b>	<b>Std.</b>
<b>C14:0</b>	8.80±0.27 <sup>a</sup>	5.80±0.35 <sup>b</sup>	1.85±0.21 <sup>c</sup>	5.48	3.13
<b>C15:0</b>	1.75±0.02 <sup>a</sup>	1.09±0.04 <sup>b</sup>	0.56±0.04 <sup>c</sup>	1.13	0.53
<b>C16:0</b>	25.64±0.37 <sup>a</sup>	20.98±0.86 <sup>b</sup>	18.64±1.13 <sup>b</sup>	21.75	3.25
<b>C16:1n9</b>	1.30±0.02 <sup>a</sup>	0.50±0.04 <sup>b</sup>	2.56±0.18 <sup>c</sup>	1.45	0.94
<b>C16:1n7</b>	5.86±0.06 <sup>a</sup>	6.26±0.06 <sup>b</sup>	0.50±0.04 <sup>c</sup>	4.20	2.87
<b>C18:0</b>	5.64±0.08 <sup>a</sup>	6.65±0.54 <sup>b</sup>	4.78±0.11 <sup>a</sup>	5.69	0.88
<b>C18:1n9</b>	16.76±0.11 <sup>a</sup>	12.60±0.04 <sup>b</sup>	11.86±0.31 <sup>c</sup>	13.74	2.36
<b>C18:1n7</b>	2.30±0.02 <sup>a</sup>	2.31±0.08 <sup>a</sup>	2.95±0.16 <sup>b</sup>	2.52	0.34
<b>C18:2n6</b>	2.24±0.03 <sup>a</sup>	1.55±0.00 <sup>b</sup>	1.91±0.13 <sup>c</sup>	1.90	0.31
<b>C18:3n6</b>	1.18±0.10 <sup>a</sup>	0.86±0.01 <sup>b</sup>	0.63±0.01 <sup>c</sup>	0.89	0.25
<b>C18:3n3</b>	1.26±0.13 <sup>a</sup>	1.05±0.17 <sup>a</sup>	0.59±0.00 <sup>b</sup>	0.97	0.32
<b>C20:2n6</b>	0.58±0.02 <sup>a</sup>	3.92±0.64 <sup>b</sup>	4.45±0.06 <sup>b</sup>	2.98	1.90
<b>C20:3n6</b>	0.21±0.04 <sup>a</sup>	0.31±0.00 <sup>b</sup>	0.18±0.04 <sup>a</sup>	0.23	0.07
<b>C20:4n6</b>	0.95±0.03 <sup>a</sup>	4.06±0.06 <sup>b</sup>	1.76±0.01 <sup>c</sup>	2.26	1.44
<b>C20:3n3</b>	0.33±0.25 <sup>a</sup>	0.29±0.03 <sup>a</sup>	0.37±0.28 <sup>a</sup>	0.33	0.17
<b>C20:5n3</b>	5.93±0.06 <sup>a</sup>	5.01±0.97 <sup>a</sup>	8.53±0.11 <sup>b</sup>	6.49	1.69
<b>C22:0</b>	0.32±0.00 <sup>a</sup>	0.40±0.06 <sup>a</sup>	1.76±0.35 <sup>b</sup>	0.83	0.74
<b>C22:4n6</b>	0.26±0.00 <sup>a</sup>	0.15±0.03 <sup>b</sup>	0.39±0.04 <sup>c</sup>	0.27	0.11
<b>C22:5n6</b>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.58±0.00 <sup>b</sup>	0.60±0.01 <sup>b</sup>	0.56	0.05
<b>C22:5n3</b>	0.79±0.02 <sup>a</sup>	1.28±0.06 <sup>b</sup>	1.42±0.09 <sup>b</sup>	1.16	0.30
<b>C22:6n3</b>	8.17±0.04 <sup>a</sup>	12.80±0.59 <sup>b</sup>	27.28±2.05 <sup>c</sup>	16.08	8.97

(a-b) means in a column with the identical letters are not significantly different (P<0.05).  
Values were presented as mean SD (n=3).

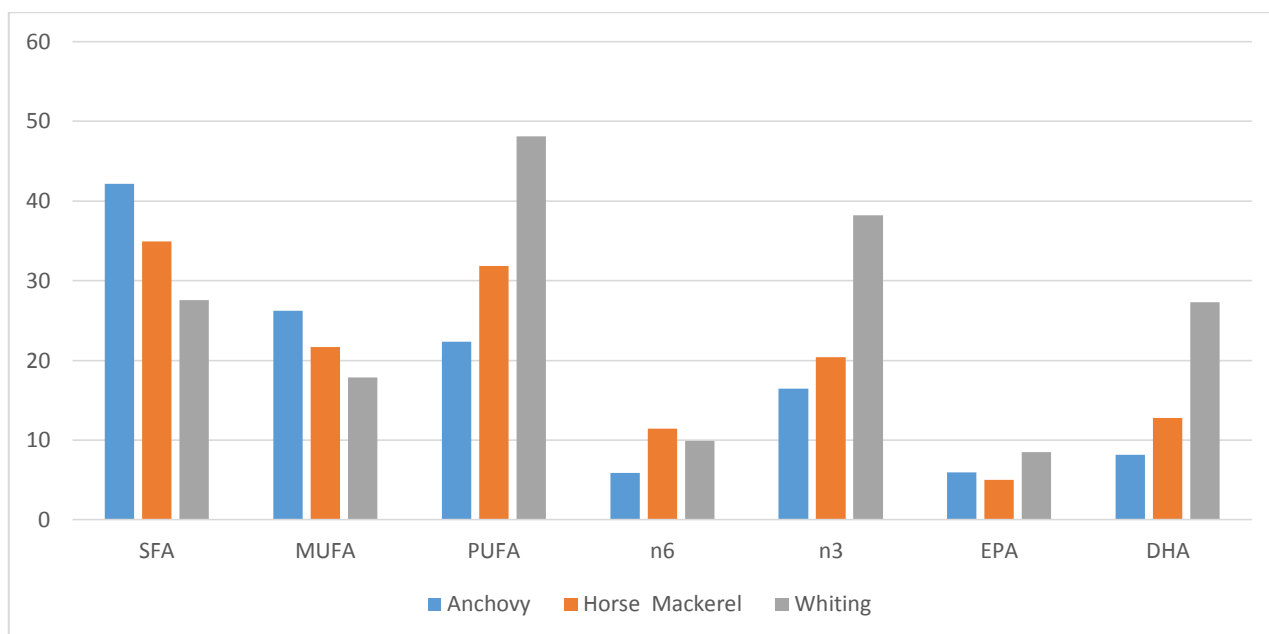


Figure 1. The SFA, MUFA, PUFA, omega 6, omega 3, EPA, and DHA levels of anchovy, horse mackerel, and whiting.

The SFA, MUFA, PUFA, omega 6, omega 3, EPA, and DHA levels of anchovy, horse mackerel, and whiting were shown in Figure 1. The highest PUFA levels belongs to whiting owing it to DHA levels. The average levels of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3), eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3), arachidonic acid (ARA, C20:4n6), and Docosapentaenoic acid (Dpan3, C22:5n3) and were calculated to be 13.95%, 4.32%, and 3.46%, and 2.18%, respectively. The UK department of Health recommends a maximum dietary ratio of n6/n3 of 4.0 (HMSO, 1994 cited in Ozogul et al., 2008). Values higher than the maximum value could be not so good for health and may be reasons of some diseases (Moreira, et al., 2001). The ratio of n6/n3 of anchovy, horse mackerel, and whiting were found to be 0.36, 0.56, and 0.26, respectively. In this study, the ratio of n6/n3 was found to be much lower than 4 which is good for the consumers of these fish.

**Table 2.** Comparing the fatty acid profiles of anchovy in this study with the previously reported ones

	Anchovy	Anchovy Tufan et al., 2011	Anchovy Öksüz and Özyılmaz 2011
<b>C16:0</b>	25.64	18.93-21.18	18.67
<b>C16:1n7</b>	5.86	4.78-5.80	7.61
<b>C18:0</b>	5.64	3.48-4.23	5.05
<b>C18:1n9</b>	16.76	11.31-16.15	17.14
<b>C18:1n7</b>	2.30	-	-
<b>C18:2n6</b>	2.24	1.95-3.12	2.76
<b>C20:5n3</b>	5.93	10.24-14.11	10.40
<b>C22:6n3</b>	8.17	13.01-18.77	15.83
<b>SFA</b>	42.15	29.81-37.58	35.58
<b>MUFA</b>	34.91	18.82-22.49	29.28
<b>PUFA</b>	27.58	31.95-38.52	35.14

Comparing the fatty acid profiles of anchovy in this study with the previously reported ones were demonstrated in Table 2. The ratio of PUFA/SFA of anchovy, horse mackerel, and whiting in this present study were found to be 0.53, 0.91, and 1.74, respectively.

## CONCLUSION

Muscle of the anchovy, horse mackerel, and whiting used in this current study can be considered a good source of fatty acids which include noble fatty acids, especially, eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3) and

docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3). Fish is an important food item to consume and as a source of essential components which particularly crucial to meet required levels. Based on the data of this current study, fish used in this study have great nutritional quality regarding their valuable fatty acid levels.

## REFERENCES

- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Ozyilmaz, A. (2016). Tocopherol, heavy metals (Cd, Pb, Cu, Fe, Mn, Zn), and fatty acid contents of thornback ray (*Raja clavata* Linnaeus, 1758) liver oil in relation to gender and origin in the Mediterranean and Black seas. *Journal of Applied Ichthyology*, 32(3), 564-568.
- Öksüz, A., & Özyilmaz, A. (2010). Changes in fatty acid compositions of Black Sea anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) during catching season. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10(3), 381-385.
- Tufan, B., Koral, S., & Köse, S. (2011). Changes during fishing season in the fat content and fatty acid profile of edible muscle, liver and gonads of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) caught in the Turkish Black Sea. *International journal of food science & technology*, 46(4), 800-810.
- Kocatepe, D., & Turan, H. (2012). Proximate and fatty acid composition of some commercially important fish species from the Sinop Region of the Black Sea. *Lipids*, 47(6), 635-641.
- Ozogul, Y., Duysak, O., Ozogul, F., Özkütük, A. S., & Türeli, C. (2008). Seasonal effects in the nutritional quality of the body structural tissue of cephalopods. *Food Chemistry*, 108(3), 847-852.
- Özyılmaz, A. (2014). İstavrit Bozması (*Caranx crysos*), Sarıkuşuk İstavrit (*Trachurus mediterraneus*) ve Benekli İstavrit (*Caranx rhonchus*) Balıklarının Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması. Doğu Anadolu Bölgesi 5. Su Ürünleri Sempozyumu. 31 Mayıs-2 Haziran 2014 İlbey Hotel ELAZIĞ.
- Özyılmaz A., 2015. Karadeniz Bölgesinde Yakalanan İstavrit Balığı Etinin Yağ Asitleri Bileşenleri. II. Balıklandırma ve Rezervuar Yönetimi Sempozyumu (20-22 Mayıs 2015) Eğirdir/Isparta.
- Tufan, B., Başçınar, N., & Köse, S. (2016). Comparison of proximate composition and fatty acid profile of on-growing and wild Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(8), 1284-1300.
- Koral, S., Tufan, B., Başçınar, N., & Köse, S. (2016). Quality changes and shelf life of cultured and wild hot-smoked mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) at refrigerated (4±1 C) conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(7), 1021-1033.
- Tufan, B., & Köse, S. (2014). Variations in lipid and fatty acid contents in different body parts of Black Sea whiting, *Merlangius merlangus euxinus* (Nordmann, 1840). *International Journal of Food Science & Technology*, 49(2), 373-384.
- Celik, M. (2008). Seasonal changes in the proximate chemical compositions and fatty acids of chub mackerel (*Scomber japonicus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the north eastern Mediterranean Sea. *International journal of food science & technology*, 43(5), 933-938.

## Ağır metal gideriminde sepiyolitinin etkinliğinin araştırılması

Ayşenur Çolak\*, Semra Çoruh

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: aysenrcolak28@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada doğal olarak elde edilen ve ekonomik bir meteryal olan sepiyolit kili adsorbent olarak seçilmiştir. Sepiyolit, sulu çözeltilerden bakır ve çinko metal iyonlarının adsorplama kabiliyetleri karakterize edilmiştir. Çalışmada bakır ve çinko iyonlarının potansiyel adsorpsiyonunun deneysel sonuçlarına Langmuir, Freundlich ve Temkin izoterm modelleri ve kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bakır ve çinko sulu çözeltilerinin sepiyolit ile adsorpsiyonu üzerine ağır metal konsantrasyonu, çözelti pH'sı, adsorbent miktarı, adsorbentin parçacık büyüklüğü ve temas süresinin etkisi incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sepiyolit, Bakır, Çinko, Adsorpsiyon

### Investigation of the effectiveness of sepiolite in heavy metal removal

#### Abstract

In this study, sepiolite clay, which is a naturally obtained and economical material, was selected as adsorbent. The adsorption capabilities of copper and zinc metal ions from sepiolite, aqueous solutions were characterized. In this study, Langmuir, Freundlich and Temkin isotherm models and kinetic studies were carried out on the experimental results of potential adsorption of copper and zinc ions. The effect of heavy metal concentration, solution pH, adsorbent amount, particle size and contact time of adsorbent on the adsorption of copper and zinc aqueous solutions with sepiolite were investigated.

**Keywords:** Sepiolite, Copper, Zinc, Adsorption

### GİRİŞ

Ağır metaller yeryüzünde doğal olarak bulunan, kolay bozulmayan veya yok edilmesi mümkün olmayan genellikle yoğunluğu 5 g/mL'den büyük olan metaller olarak tanımlanmaktadır. Çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiye sahiptirler. Çoğunlukla oksit, silikat, karbonat ve sülfür bileşikleri halinde bulunurlar. Kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, çinko ve nikel olmak üzere 60'tan fazla metal, ağır metaller grubuna dâhil edilmektedir. Ağır metaller sucul ortamdaki yüksek çözünürlüğünden dolayı canlı mikroorganizmalar tarafından adsorbe edilebilmektedirler. Besin zincirine girdikten sonra ağır metallerin fazla konsantrasyonları insan vücuduna birikebilmektedir. Bu durum ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Kahvecioğlu vd.,2017).Bu nedenle alıcı ortama deşarj edilmeden önce ağır metallerle kirlenmiş bu atıksuların arıtılması gerekmektedir. Ağır metallerin atık sularından uzaklaştırılmasında çeşitli ileri arıtım yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar; Kimyasal çöktürme, Kimyasal oksidasyon, İyon değişimi, Filtrasyon, Elektrokimyasal işlemler, Membran teknolojisi, Ters osmoz ve Adsorpsiyondur. Bu çalışmada, pratik ve ekonomik bir yöntem olduğu için yaygın olarak tercih edilen ileri arıtım yöntemlerinden adsorpsiyon ile sepiyolit kullanılarak sulu çözeltilerden ağır metal giderilmesi araştırılmıştır (Selinus vd.,2005;Klaassen, 2009).

### MATERYAL VE METOD

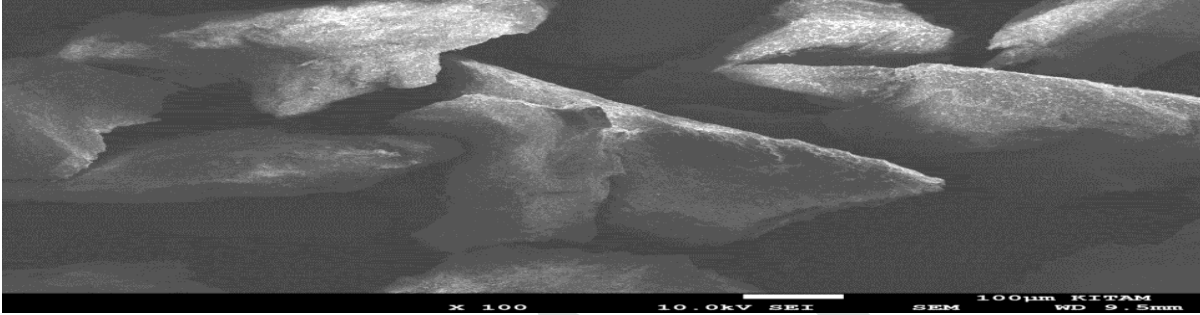
**Tablo 1.** Kullanılan Ağır metaller ve Özellikleri

Ağır Metal	Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı(g/mol)	CAS Numarası
Bakır	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	170.48256	10125-13-0
Çinko	ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	287.56	7446-20-0

#### Sepiyolit

Sepiyolit, diğer endüstriyel kil minerallerine göre dünyadaki kaynakları çok az derecede olan bir hammaddedir. Ekonomik kaynakları sadece Türkiye'de ve İspanya'da bulunmaktadır. Çin'de bulunan sepiyolit yatakları rezerv bakımında çok az olup asbestiform yapıda olduğu için Dünya sağlık örgütü (WHO) standartlarına uygun değildir. Afrika ülkelerindeki rezervler de ise kristalografik farklılıklar gösterdiği için sadece emilim amacıyla kullanılabilir. Ülkemizde sepiyolitik kil,1988 yılında MTA genel müdürlüğü tarafından sedimanter oluşumlu yataklara yönelik bilimsel araştırmalar ile başlamıştır. Genellikle Eskişehir ve

çevresinde çıkarılmaktadır (Anonim,2016). Sepiyolit, fillosilikat grubuna ait doğal bir hidrat magnezyum silikat mineralidir  $[Si_{12}Mg_9O_{30}(OH)_6(OH_2)_4H_2O]$  kimyasal formülüne sahiptir. Lifsi bir yapıda olduğu için talk gibi desenli ve fiber yönünde blok ve tünellerin ardı ardına dizilmesi ile oluşmuştur. Her bir blok tetrahedral slika tabakası arasına gelecek şekilde merkezi bir magnezyum hidroksitten oluşur. Moleküler elek yapısı nedeniyle mükemmel bir adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Fillosilikat grubu kil mineralleri çevre koruma proseslerinde önemli bir yere sahiptirler. Geniş yüzey alanları ve dış yüzeyinin negatif yüklerle çevrili olması bu minerallerin adsorpsiyon işlemleri için kullanılmasını cazip kılmıştır(Can,1992). Deneysel çalışmalarda kullanılan sepiyolitün yüzey alanı yapılan BET analizine göre  $1.904 \text{ m}^2/\text{g}$ 'dir. Ortalama gözenek yarıçapı  $4.51018e+01 \text{ \AA}$  ve toplam gözenek hacmi  $4.295e-03 \text{ cc/g}$  olarak ölçülmüştür. Killerin adsorplama kapasiteleri partiküllerin gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Killer içinde her tür gözenek bulunmaktadır. Özgül yüzey alanı büyük ölçüde mikro gözenek duvarlarından kaynaklanmakta ve bu gözenekler de kil minerallerinin katmanları arasında yer almaktadır. Adsorpsiyon kapasitesi diğer killere oranla oldukça yüksektir. Sepiyolit mineralleri genellikle ince taneli ve toprağımsı bir yapıya sahiptir. Kaygan görünümünün yanı sıra genellikle beyaz, krem, gri veya pembe renklerde olabilmektedir. Çok nadir olarak bazı türlerinde siyahımsı ya da kahverengi de olabilmektedirler (Sabah ve Çelik,2006).



**Şekil 1.** Sepiyolit'e ait SEM iç yapı görüntüsü.

Özgül yüzey alanı ve buna bağlı yüksek adsorpsiyon özelliğinden dolayı sepiyolit, leke çıkartmak amacıyla gaz ve sıvıların temizlenmesinde, Atıksu arıtma sistemlerinde, korozyona ve aşınmaya dayanıklı boya üretiminde, ilaç ve kozmetik sektöründe, deterjan ve temizlik maddelerinde, otomotiv endüstrisinde yakıt temizleme, hafif yapı malzemesi olarak uzay araçları ve füze yalıtımı gibi başlıca kullanım alanlarına sahiptir.

#### **ADSORPSİYON DENEYİ**

Adsorpsiyon deneyleri kesikli çalışan sistemde sabit sıcaklıkta yürütülmüştür. Bakır ve çinko ağır metalleri için  $1000 \text{ mg/L}$  stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiden mezür yardımıyla  $100 \text{ mL}$  alınmış saf su ile  $1000 \text{ ml}'ye$  tamamlanarak  $100 \text{ mg/L}'lik$  standart çözelti elde edilmiştir. Deneysel çalışmalar  $50 \text{ mg/L}'lik$  çözeltiler üzerinden yürütülmüştür. Çözelti hacmi  $50 \text{ mL}$  olarak belirlenmiştir. Adsorbent olarak Sepiyolit kili kullanılmıştır. Deneyler  $100 \text{ ml}'lik$  erlenlerle gerçekleştirilmiştir. Deneyler  $100 \text{ ml}'lik$  erlenlerle gerçekleştirilmiştir. Kesikli adsorpsiyon deneyleri için 8 hazneli İnova 2000 Platform Shaker model bir adet karıştırıcı kullanılmıştır. Karıştırma hızı  $200 \text{ rpm}$  olarak ayarlanmıştır. Numunelerin adsorbent ile temasını sağlamak için 90 dakika boyunca karışması sağlanmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 dakika boyunca çözelti içindeki adsorbentlerin çökmesi beklenmiş ve erlenlerdeki numunelerin üst yüzeyinden bir pipet yardımıyla alınarak santrifüj tüplerine konulmuştur. Bu işlemden sonra numuneler Sigma 3-16p model santrifüjde  $5000 \text{ rpm}$  hızında 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Santrifüjden çıkarılan tüplerin içine birer damla nitrik asit damlatılmıştır. Alevli Adsorpsiyon Spektroskopisinde numune değerleri okutulmuştur. Deneysel çalışmalar iki kopya halinde yürütülmüş ve elde edilen sonuçların ortalama değerleri alınarak deneysel veriler elde edilmiştir.

Hesaplamalar;

Adsorplama kapasiteleri ve giderim verimleri aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$q_e = \frac{V(C_0 - C_e)}{m} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Verim} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

Dengede adsorplanan madde miktarı  $q_e$  (mg/g), Çözeltinin başlangıç ağır metal konsantrasyonu  $C_0$  (mg/L), Adsorpsiyon sonrası çözeltide kalan ağır metal konsantrasyonu  $C_e$  (mg/L), Çözeltinin hacmi  $V$  (L), Adsorbentın ağırlığı  $m$  (g) şeklinde ifade edilmektedir.

#### **SONUÇ**

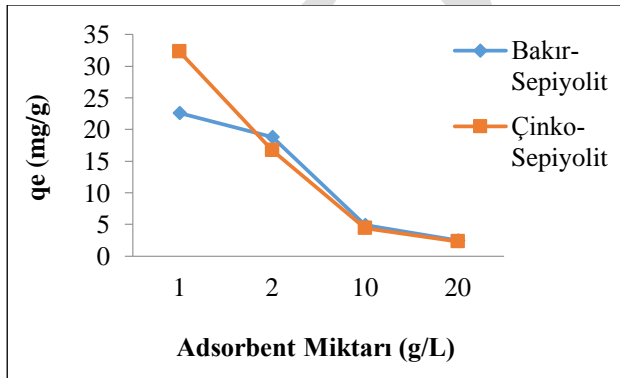
Bu çalışmada doğal bir adsorbent olan sepiyolit kullanılarak bakır ve çinko içeren sulu çözeltilerden ağır metal giderimi yapılmıştır. Sepiyolit için ağır metalleri adsorplama kapasiteleri hesaplanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. Adsorbentın partikül büyüklüğü çalışmasında bakır ve

çinko ağır metalleri için sepiyolit adsorbentinin büyüklüğü -45+65 mesh olarak bulunmuştur. Sepiyolit adsorbenti bakır adsorpsiyonunda %98.94, çinko adsorpsiyonunda % 88.2 verim elde edilmiştir. Optimum partikül büyüklüğü belirlenen sepiyolit ile bakır ve çinko için adsorbentin miktarı analizi yapılmıştır. 1 g/L, 2 g/L, 10 g/L ve 20 g/L adsorbent miktarında yapılan çalışmalar en yüksek 20 g/L için bulunmuştur. Ancak maliyeti azaltmak ve daha az adsorbent kullanılarak daha iyi giderim verimi elde etmek amacıyla optimum adsorbent miktarı 10 g/L seçilmiştir. Bakır için sepiyolit adsorplama kapasitesi 4.878 mg/g, giderim verimi % 97.48, Çinko için sepiyolit adsorplama kapasitesi 4.356 mg/g, giderim verimi % 87.12 olarak elde edilmiştir. Adsorplayıcı madde miktarı belirlendikten sonra optimum temas süreleri belirlenmiştir. 5, 15, 30, 60, 90, 180, 360, 1080 (18 saat) ve 1440 (24 saat) dakika karıştırma süreleri üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Bakır ve çinko için denge süresi 90. dakika olarak bulunmuştur. Bakır için sepiyolit ile giderimde % 95.64, Çinko için ise sepiyolit ile giderimde % 90.05 ile giderimde % 88.16 giderim verimi elde edilmiştir. Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla adsorpsiyon çalışmaları 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Sepiyolit'in adsorbent olarak kullanıldığı konsantrasyon çalışmalarında bakır için 25 mg/L'de % 93.50, 50 mg/L'de % 92.43, çinko için 25 mg/L'de % 97.19 ve 50 mg/L'de % 97.00 verim elde edilmiştir. TiO<sub>2</sub>'nin adsorbent olarak kullanıldığı şartlarda ise bakır için 25 mg/L'de % 85.32, 50 mg/L'de % 80.13 ve çinko için 25 mg/L % 87.76, 50 mg/L'de % 84.98 giderim verimi elde edilmiştir. Bakır ve çinko giderimi için yapılan adsorpsiyon çalışmasında 2, 4, 6 ve 8 pH'da verim incelenmiştir. Sepiyolit adsorbenti ile yapılan çalışmada bakır için için pH 8 için % 97.65 çinko için pH 8' de % 99.56 verim elde edilmiştir. Adsorpsiyon izoterm çalışmalarında Langmuir, Freundlich ve Temkin izotermi üzerine çalışmalar yapılmıştır. En yüksek verim Langmuir izotermine, çinko ile yapılan çalışmalarda sepiyolit ile giderimde en yüksek verim % 98.15, bakır ile yapılan çalışmalarda en yüksek verim % 96.46 olarak elde edilmiştir. Kinetik incelemelerden adsorpsiyonun yalancı ikinci derece kinetik modele uygun olduğu tespit edildi.

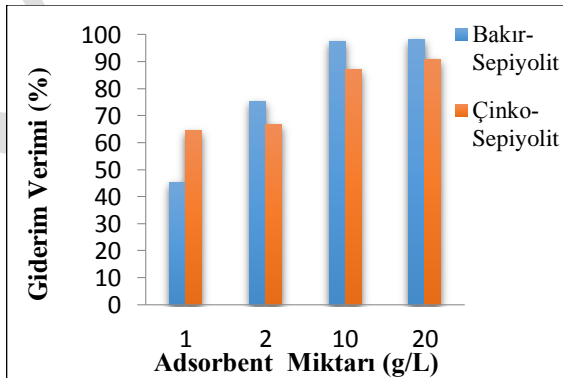
## TARTIŞMA

### Adsorbent Miktarının Etkisi

En etkin adsorplayıcı madde miktarını belirlemek amacıyla 50 mg/L başlangıç ağır metal konsantrasyonunda çalışmalar yürütülmüştür. Her çözeltiliye 1, 2, 10 ve 20 g/L adsorbent ilave edilmiştir. Adsorplayıcı madde miktarı arttıkça adsorplama verimi de artmıştır. Ancak kullanılan adsorbent miktarını çok fazla arttırmak adsorpsiyon veriminde çok büyük artışlar göstermemiştir. Adsorpsiyon verimindeki artışın sabitlenmeye ya da azalmaya başladığı noktada optimum adsorbent miktarı belirlenmiştir.



Şekil 2. Ağır metal giderimine adsorbent madde miktarının etkisi



Şekil 3. Ağır metal giderim verimine adsorbent madde miktarının etkisi

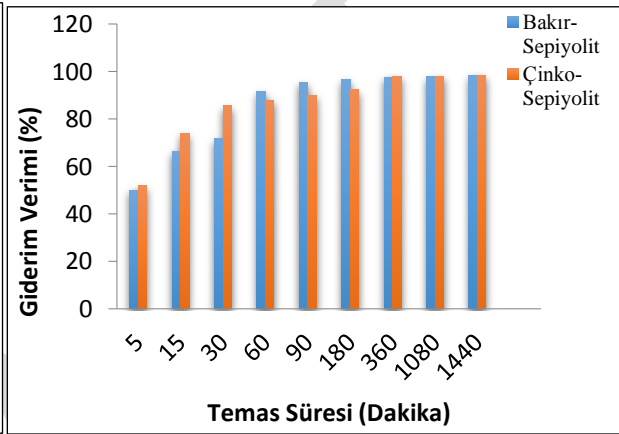
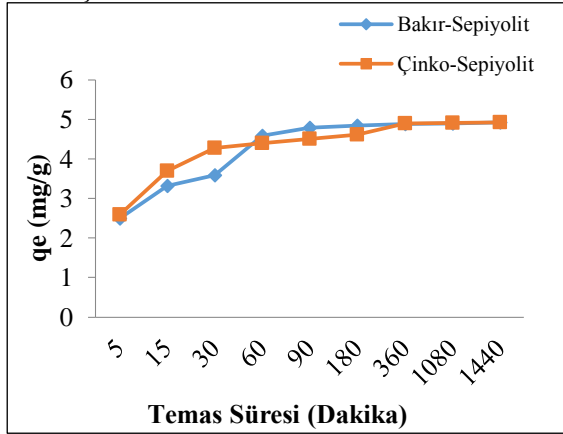
Adsorbent miktarındaki artış ile adsorbentin gramı başına adsorplanan madde miktarının azalması birim adsorpsiyon şeklinde ifade edilebilir. Adsorbent miktarındaki artış ile sulu çözeltilerden ağır metallerin adsorplanma miktarı da artmakta ancak yapılan hesaplamalar sonucu birim adsorbent daha az çıkmaktadır. Maliyeti azaltmak ve daha az adsorbent miktarında daha iyi sonuçlar elde etmek adına optimum adsorbent miktarı 10 g/L seçilmiştir.

**Tablo 2.** Adsorbent madde miktarının ağır metal giderimi üzerine etkisi.

Adsorbent Miktarı (g/L)	Bakır $q_e$ (mg/g)	Çinko $q_e$ (mg/g)	Bakır % Verim	Çinko % Verim
1	22.640	32.276	45.28	64.55
2	18.820	16.684	75.28	66.73
10	4.874	4.356	97.48	87.12
20	2.457	2.273	98.30	90.92

### Temas Süresinin Etkisi

Sulu çözeltilerden bakır ve çinko giderimi için sepiyolit adsorbent olarak kullanıldığı deneysel çalışmalarda temas süresinin adsorplama kapasitesine ve adsorpsiyon verimi üzerine etkinliği araştırılmıştır. Temas süresine bağlı adsorpsiyon davranışları 5, 15, 30, 60, 90, 180, 360, 1080 (18 saat) ve 1440 (24 saat) dakika olmak üzere izlenmiştir. Başlangıç ağır metal konsantrasyonu 50 mg/L olarak belirlenmiştir. 10 g/L sepiyolit ilave edilmiştir.



**Şekil 4.** Ağır metal giderimine adsorbentlerin temas süresinin etkisi

**Şekil 5.** Ağır metal giderim verimi adsorbentlerin temas süresinin etkisi

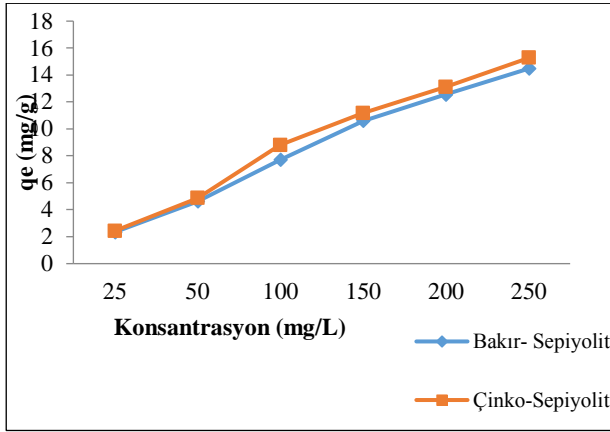
**Tablo 3.** Sepiyolit temas süresinin ağır metal giderimi üzerine etkisi.

Temas Süresi (Dakika)	Bakır $q_e$ (mg/g)	Çinko $q_e$ (mg/g)	Bakır % Verim	Çinko % Verim
5	2.492	2.589	49.84	51.78
15	3.313	3.692	66.26	73.85
30	3.587	4.278	71.74	85.57
60	4.588	4.395	91.77	87.90
90	4.782	4.502	95.64	90.05
180	4.843	4.617	96.86	92.34
360	4.878	4.897	97.56	97.95
1080	4.891	4.907	97.82	98.15
1440	4.929	4.929	98.59	98.59

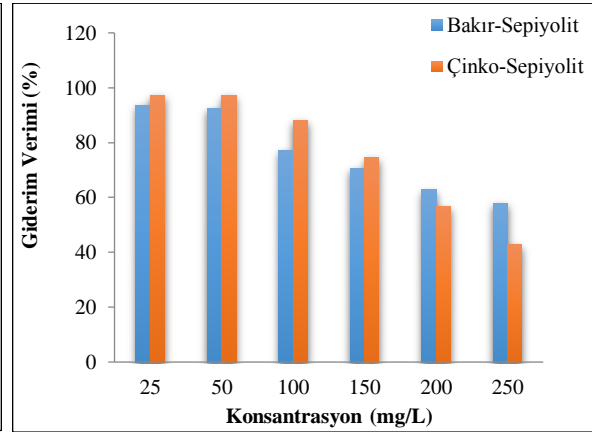
Sepiyolit adsorbentinin bakır ve çinko ile temasında 90. dakikadan sonra sabitlenmeye başladığı ancak adsorpsiyon işleminin devam ettiği gözlenmiştir.

### Başlangıç Ağır Metal Konsantrasyonunun Etkisi

Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun adsorpsiyon çalışmasında etkililiğini incelemek için 1000 mg/L'lik stok bakır çözeltisi saf su ile seyreltilerek 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Her adsorbent için optimum başlangıç ağır metal konsantrasyonu 50 mg/L ve adsorbent miktarı 10 g/L olarak seçilmiştir. Ağır metal konsantrasyonunun artmasıyla adsorbent yüzeyindeki adsorpsiyona elverişli yerleri daha fazla ağır metal iyonu sarmış olacak ve bu nedenle de ağır metal iyonları adsorbent tarafından daha fazla adsorplanacaklardır. Başlangıç ağır metal konsantrasyonu arttıkça birim adsorbent kapasitesinin arttığı ancak giderim veriminin azaldığı görülmektedir. Bu durum adsorbent miktarının yeterli olmadığını yüksek konsantrasyonlar için daha fazla adsorbent madde ihtiyacı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 6.** Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun sepiyolit ile ağır metal giderimine



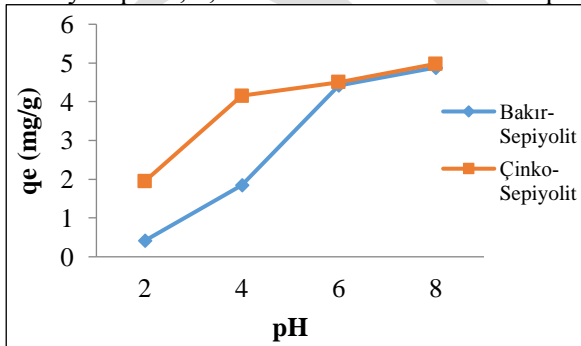
**Şekil 7.** Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun sepiyolit ile ağır metal giderimi

**Tablo 4.** Başlangıç ağır konsantrasyonunun adsorbent ile ağır metal giderimine etkisi.

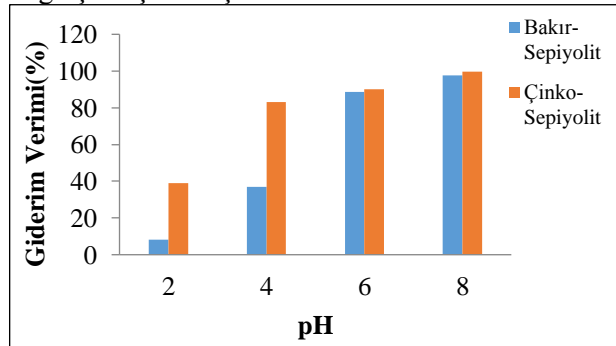
Başlangıç Ağır Metal Konsantrasyonu (mg/L)	Bakır q <sub>e</sub> (mg/g)	Çinko q <sub>e</sub> (mg/g)	Bakır % Verim	Çinko % Verim
25	2.340	2.340	93.51	97.19
50	4.620	4.620	92.44	97.20
100	7.710	7.710	77.07	87.95
150	10.600	10.600	70.67	74.50
200	12.560	12.560	62.79	56.79
250	14.480	14.480	57.90	42.80

### pH'ın Etkisi

Sulu ortam pH'sı adsorpsiyon prosesleri üzerinde etkili parametrelerden biridir. Hidrojen(H<sup>+</sup>) ve Hidroksil (OH<sup>-</sup>) iyonları kuvvetli bir şekilde adsorbe oldukları için diğer iyonların adsorpsiyonu çözelti pH'ından etkilenmektedir. Bakır ve çinko çözeltilerinin başlangıç pH'ları hem adsorbent hem de ağır metallerin kimyasal davranışını etkilemekle birlikte bu durum adsorplanan ağır metal miktarında değişmelere neden olmaktadır. Deneyler pH 2, 4, 6 ve 8 olmak üzere 4 farklı pH'da gerçekleştirilmiştir. .



**Şekil 8.** Ağır metal giderimine pH etkisi



**Şekil 9.** Ağır metal giderim verimine pH etkisi

pH 2 ve 4 aralığında asidik şartlarda adsorplama kapasitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda optimum pH 6 ve 8 aralığında olduğu belirlenmiştir. Kullanılan adsorbentlerin bazik karakterli oluşu ve yüksek asitlik içeren çözeltilerde adsorbent yüzey yükünü etkilemesi ile adsorplananın iyon derecesini etkilediği için pH 2'de adsorplama kapasitesi düşüktür. Farklı pH'larda elde edilen bu sonuçların değişkenlik göstermesinin nedeni çözeltideki iyonlar ile adsorbent yüzeyindeki fonksiyonel grupların arasındaki etkileşimdir.



**Tablo 5.** pH'in ağır metal giderimi üzerine etkisi.

pH	Bakır q <sub>e</sub> (mg/g)	Çinko q <sub>e</sub> (mg/g)	Bakır % Verim	Çinko % Verim
2	0.420	1.950	8.32	39.00
4	1.850	4.150	36.97	83.05
6	4.420	4.500	88.49	90.09
8	4.880	4.980	97.65	99.57

### ADSORPSİYON İZOTERMLERİ

Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon sistemlerinin tasarımı ve analizi için gerekli olan temel bir sistemdir. İzoterm sabit sıcaklıktaki adsorpsiyon prosesinin denge anında adsorbentin adsorplayabileceği birim kütle başına madde miktarı ile akışkan fazdaki madde konsantrasyonu arasındaki bağlantıyı verir. Bu bölümde sepiyolit, adsorbenti için ağır metallerin adsorpsiyonunda her bir ağır metal için farklı konsantrasyonlarda üç farklı izoterm çalışması yapılmıştır. Bu izotermi ise Langmuir, Freundlich ve Temkin adsorpsiyon izoterm modelleridir. İzoterm çalışmalarından elde edilen parametreler ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.

Langmuir İzotermi;

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{b \cdot q_{max}} + \frac{1}{q_{max}} \cdot C_e \quad (3)$$

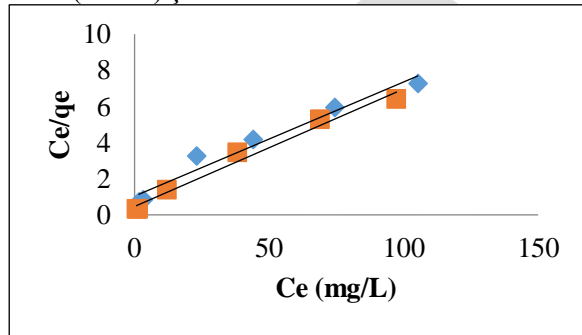
Freundlich İzotermi;

$$\log(q_e) = \log K_f + 1/n(\log C_e) \quad (4)$$

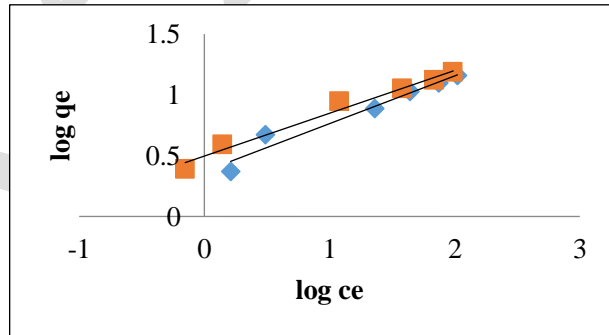
Temkin İzotermi;

$$q_e = K_t \cdot \ln(at) + K_t \cdot \ln C_e \quad (5)$$

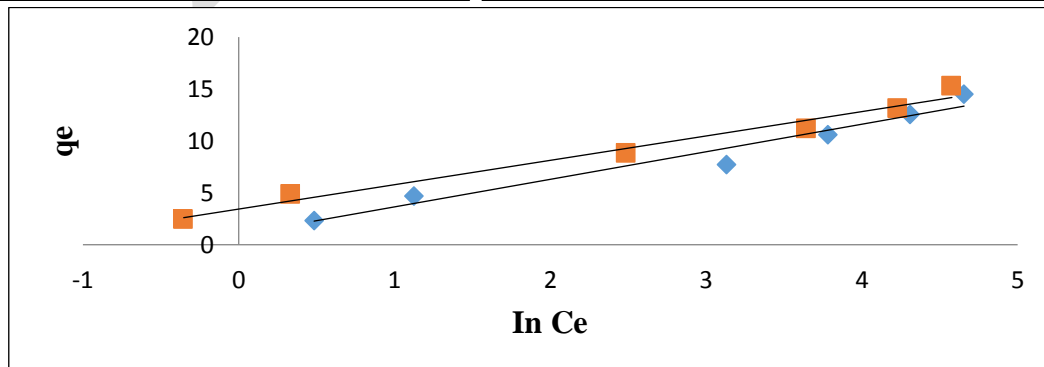
Dengede adsorplanan madde miktarı q<sub>e</sub> (mg/g), adsorplanan maddenin kütlesi X (mg/L), adsorplayıcının kütlesi M (g/L), çözünenin denge konsantrasyonu C<sub>e</sub> (mg/L), Langmuir sabiti b (L/mg), adsorplayıcının birim kütlesini tamamen doyurmaya yetecek (tek tabaka halinde) adsorplanan madde miktarını q<sub>max</sub> (mg/g) ifade eder. Adsorpsiyon kapasitesini, n Adsorpsiyon şiddetini (n>1) ifade etmektedir. RT gaz sabiti (J/mol°K), T sıcaklık (°K), b<sub>T</sub> Temkin sabiti(kJ/mol), A<sub>T</sub> maksimum bağlama enerjisine karşılık denge bağlama sabiti(L/mol) şeklinde ifade edilmektedir.



**Şekil 10.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi.



**Şekil 11.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi.



**Şekil 12.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonunun Temkin adsorpsiyon izotermi.

**Tablo 6.** İzoterm Parametreleri

Sepiyolit			
Langmuir izotermi		Bakır	Çinko
50 mg/L	q <sub>max</sub>	15.822	15.384
	b	0.060	0.139
	R <sup>2</sup>	0.964	0.981
Freundlich izotermi			
50 mg/L	n	2.548	2.840
	K <sub>f</sub>	2.430	3.139
	R <sup>2</sup>	0.956	0.980
Temkin izotermi			
50 mg/L	K <sub>t</sub>	2.655	2.347
	A <sub>t</sub>	1.450	4.314
	R <sup>2</sup>	0.958	0.978

Sepiyolit adsorbenti ile bakır adsorpsiyonunda Langmuir, Ferundlich ve Temkin izotermi verilmştir. Langmuir izotermi için 0.964'lük bir koreleasyon katsayısı elde edilmiştir. Bu yüksek koreleasyon değeri nedeniyle en uygun izoterm modelinin Langmuir olduğu söylenebilir. Sepiyolit ile çinko adsorpsiyonu çalışmasında en yüksek koreleasyon katsayısı Langmuir izotermi için koreleasyon kat sayısı 0.981 olarak bulunmuştur. Langmuir izoterm modeline uyum adsorbent yüzeyinin homojen olduğu ve yüzeyin tek tabakadan oluştuğunu göstermektedir. Tüm adsorpsiyon prosesinin aynı sistemde oluştuğu ve adsorbe edilen maddelerin aynı yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

**Tablo 7.** Langmuir izoterm modelinin uygulanmasında temel karakteristikleri ayırma faktörü.

R <sub>L</sub> > 1 Uygun değil	R <sub>L</sub> = 1 Doğrusal
0 < R <sub>L</sub> < 1 Uygun	R <sub>L</sub> = 0 Tersinmez

Langmuir izotermi temel karakteristikleri ayırma faktörü (R<sub>L</sub>) ile değerlendirilmektedir. R<sub>L</sub> değerleri bakır için 0.250 , çinko için 0.125 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler 0 ile 1 arasında olduğu için adsorpsiyon prosesi kendiliğinden gerçekleşmiştir.

#### ADSORPSİYON KİNETİKLERİ

Adsorpsiyon kinetiği ile adsorpsiyon işleminin tamamlanması için gerekli temas süresini belirleyen adsorpsiyon hızı tanımlanabilmektedir. Sepiyolit adsorbent olarak kullanılarak bakır ve çinko adsorpsiyon kinetiği, yalancı birinci dereceden, yalancı ikinci dereceden ve partikül içi difüzyon modellerine göre incelenmiştir. Bakır ve çinko ağır metalleri için adsorpsiyon kinetiği grafikleri 50 mg/L başlangıç ağır metal konsantrasyonunda 10 g/L adsorbent miktarında, karıştırma hızı 200 rpm'de farklı temas süreleri esas alınarak incelenmiştir.

Yalancı Birinci Dereceden Kinetik Model;

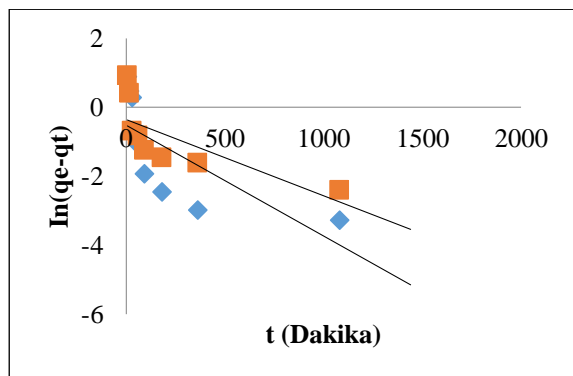
$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - (k_{int}) \cdot t \quad (6)$$

Yalancı İkinci Dereceden Kinetik Model;

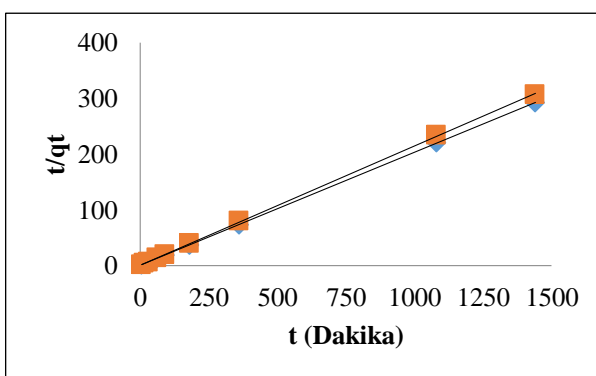
$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 \cdot q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (7)$$

Partikül İçi Difüzyon Modeli;

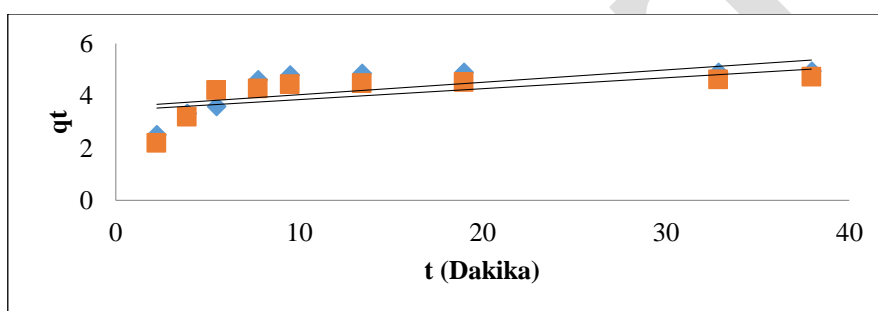
$$q_t = k_i \cdot t^{\frac{1}{2}} + C \quad (8)$$



**Şekil 13.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonu yalancı birinci dereceden adsorpsiyon kinetiği.



**Şekil 14.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonu yalancı ikinci dereceden adsorpsiyon kinetiği.



**Şekil 15.** Sepiyolit ile ağır metal adsorpsiyonu partikül içi difüzyon adsorpsiyon kinetiği.

Yalancı birinci dereceden kinetik model de bakır için 0.505, yalancı ikinci derece hız denkleminde 1, partikül içi difüzyon modelinde 0.458 korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Sepiyolit adsorbenti ile yapılan çalışmada kinetik modellerinden yalancı ikinci dereceden modelin uygun olduğu görülmüştür. Yalancı birinci dereceden kinetik model de çinko için 0.724, yalancı ikinci derece kinetik modelde 1, partikül içi difüzyon modelinde 0.406 korelasyon katsayısı elde edilmiştir. Sepiyolit adsorbenti ile yapılan çalışmada kinetik modellerden yalancı ikinci dereceden modelin uygun olduğu görülmüştür.

**Tablo 8.** Kinetik Parametreleri

Kinetik Eşitlikleri		Sepiyolit	
<b>Yalancı birinci derece kinetik model</b>		Bakır	Çinko
10 g/L	K1	0.032	0.003
	qe	0.593	1.322
	R <sup>2</sup>	0.505	0.724
<b>Yalancı ikinci derece kinetik model</b>			
10 g/L	qe	0.034	4.948
	K <sup>2</sup>	4.938	0.029
	R <sup>2</sup>	1.000	1.000
<b>Partikül içi difüzyon modeli</b>			
10 g/L	K <sub>i</sub>	0.047	0.041
	C	3.564	3.711
	R <sup>2</sup>	0.458	0.406

## KAYNAKLAR

- BIAC Expert Group on Nanotechnology, (2009). Responsible Development of Nanotechnology: Turning Vision Into Reality.
- Luther, W, (2008). Application of Nanotechnologies in the Energy Sector. Düsseldorf : HA Hessen.
- Bharat, B, (2007). Handbook of Nanotechnology. New York : Springer Press
- Can, G. (1992). Dünya'da ve Türkiye'de Sepiyolitik Kil. Ankara: Maden Tetkik ve Arama Fizibilite Etüdüleri Dairesi.

- Anonim, (2016). Türkiye ve Dünyada Bakır. Ankara: Maden Tetkik Arama Müdürlüğü.
- Purreza, N., Rastegarzadeh, S. (2012). Nao-TiO<sub>2</sub> modified with 2 mercaptobenzimidazole as an efficient adsorbent for removal of Ag from aqueous solutions. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 127-132.
- Sabah, E., Çelik, M. S. (2006). Atık Sularda Kirleticilerin Sepiyolit İle Uzaklaştırılması. Kil Bilimi ve Teknolojital Dergisi, 55-72.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S. (2004). Metallerin Çevresel Etkileri. İtü Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü.

DRAFT

## TiO<sub>2</sub> –sepiyolit nano kompozitleri ile sulu çözeltilerden çinko giderimi

Ayşenur Çolak\*, Semra Çoruh

Ondokuz Mayıs üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: aysenrcolak28@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada adsorpsiyon yöntemi ile sulu çözeltilerden çinko giderimi için doğal bir materyal olan sepiyolit ve nano-TiO<sub>2</sub> adsorbent olarak kullanılmıştır. Mekanik biyalı öğütme ve modifiye edilmiş nano- TiO<sub>2</sub> yöntemleri ile nano kompozitler hazırlanmıştır. Adsorpsiyon deneylerinde başlangıç çinko konsantrasyonu, pH, mekanik biyalı öğütme yöntemi ile toz oranlarının ve modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub>'nin adsorpsiyon üzerine etkinliği araştırılmıştır. Adsorpsiyon izoterm çalışmalarında Langmuir, Freundlich ve Temkin izoterm modelleri için incelemeler yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Çinko, TiO<sub>2</sub>, Sepiyolit, Adsorpsiyon, nano- kompozitler

### Zinc removal from aqueous solutions with TiO<sub>2</sub>-sepiolite nano composites

#### Abstract

In this study, sepiolite and nano-TiO<sub>2</sub> adsorbent method which is a natural material for zinc removal from aqueous solutions by adsorption method. Mechanical biomass grinding and modified nano-TiO<sub>2</sub> types and nano composites were prepared. In the adsorption experiments, initial zinc concentration, pH, powder ratios by mechanical ball grinding method and modified nano-TiO<sub>2</sub> were investigated on adsorption. Adsorption isotherm studies were conducted for Langmuir, Freundlich and Temkin isotherm models.

**Keywords:** Zinc, TiO<sub>2</sub>, Sepiolite, Adsorption, nano-composites.

### GİRİŞ

Nanoteknoloji, son yıllarda oldukça hızlı bir gelişme göstererek bilim dünyasında etkin bir yere sahip olmuştur. Fizik, biyoloji, tıp, malzeme bilimi, kimya, havacılık, çevre ve gıda gibi bir çok alanda varlığını aktif bir şekilde sürdürmektedir. malzeme yapısı kontrol edilerek çeşitli özelliklere sahip, farklı alanlarda uygulanabilir birçok malzeme üretilebilmektedir. Nano kelimesi genel anlamda metrenin milyarda biri olarak tanımlanmaktadır. Nano partiküller ise 100 nm ve daha küçük partikül boyutuna sahip partiküller olarak ifade edilmektedir (Luther,2008; Anonim,2009).

Nano teknolojik çalışmalar, havadaki kirleticilerin giderimi ve atık su arıtma teknolojilerinin etkinliğinin artırılması için çevresel iyileştirmeler adına önemli katkılar sağlamaktadır. Organik atıkların okside edilmesi için demir partiküllerinin üretimi, nano poroz malzemeler ile arsenik, kurşun, bakır, çinko, gibi ağır metallerin atık sularından giderimi, nano boyuttaki kolloidler ile yüksek konsantrasyonlu organik bileşiklerin giderilmesi, yakıt verimliliğini artırmak ve hava kirleticilerinin azaltılması için de nano malzemeler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bharat,2007; Anonim,2009).

### MATERYAL VE METOD

#### Kullanılan Adsorbentler ve Özellikleri

##### Sepiyolit

Sepiyolit, diğer endüstriyel kil minerallerine göre dünyadaki kaynakları çok az derecede olan bir hammaddedir. Ekonomik kaynakları sadece Türkiye’de ve İspanya’da bulunmaktadır. Çin’de bulunan sepiyolit yatakları rezerv bakımında çok az olup asbestiform yapıda olduğu için Dünya sağlık örgütü (WHO) standartlarına uygun değildir. Afrika ülkelerindeki rezervler de ise kristalografik farklılıklar gösterdiği için sadece emilim amacıyla kullanılabilir (Anonim,2018). Ülkemizde sepiyolitik kil, 1988 yılında MTA genel müdürlüğü tarafından sedimanter oluşumlu yataklara yönelik bilimsel araştırmalar ile başlamıştır. Genellikle Eskişehir ve çevresinde çıkarılmaktadır. Moleküler elek yapısı nedeniyle mükemmel bir adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Fillosilikat grubu kil mineralleri çevre koruma proseslerinde önemli bir yere sahiptirler. Geniş yüzey alanları ve dış yüzeyinin negatif yüklerle çevrili olması bu minerallerin adsorpsiyon işlemleri için kullanılmasını cazip kılmıştır (Can,1992)

Killerin adsorplama kapasiteleri partiküllerin gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Killer içinde her tür gözenek bulunmaktadır. Özgül yüzey alanı büyük ölçüde mikro gözenek duvarlarından kaynaklanmakta ve bu gözenekler de kil minerallerinin katmanları arasında yer almaktadır (Sabah ve Çelik,2006). Ucuz ve kolay temin edilebilir bir kil mineralidir. Yüksek porzitesi nedeniyle, leke çıkartmak amacıyla gaz ve sıvıların temizlenmesinde absorban olarak kullanılır. Otomotiv endüstrisinde yakıt temizleme ve korozyona ve aşınmaya dayanıklı boya üretiminde, hafif yapı malzemesi olarak uzay araçları ve füze yalıtımında, ilaç sektöründe, iyon değiştirici ve parafinlerin ayrılması gibi birçok sektörde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Can,1992).Deneysel çalışmalarda kullanılan sepiyolitın yüzey alanı yapılan BET analizine göre 1.904 m<sup>2</sup>/g'dır. Ortalama gözenek yarıçapı 4.51018e+01 Å ve toplam gözenek hacmi 4.295e-03 cc/g olarak ölçülmüştür.

### **Titanyumdioksit (TiO<sub>2</sub>)**

Yer kabuğunda en yaygın dokuzuncu element olarak kabul edilen TiO<sub>2</sub>, bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir metaldir. Doğal olarak cevherlerde, kumda ve toprakta bulunan titanyum oluşturulması için titanyum oksijenle tepkimeye girer. Titanyumdioksit inert ve güvenilir bir madde olarak bilinir ve onlarca yıldır yaşamımızın her köşesinde karşımıza çıkmaktadır. Nanoteknolojik gelişmelerle birlikte Titanyumdioksit daha fazla kullanım alanına sahip olmuştur (Anonim,2015). 1970'li yıllarda Fujishima ve Honda tarafından titanyum dioksitin fotokatalitik özelliğe sahip olduğu ortaya atılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda dünyada ciddi bir problem haline gelen çevre kirliliği sorunlarının azaltılması veya ortadan kaldırılması için önemli çalışmalar başlamıştır. İlk çalışma, TiO<sub>2</sub> tozları su içindeki siyanürü parçalayarak çevresel arıtma konusunda önemli adımlar atılmıştır. Bu bilimsel çalışmaları organik ve inorganik kirleticilerin sulardan uzaklaştırılması çalışmaları takip etmiştir. TiO<sub>2</sub> tozlarının sulardan kirleticilerin uzaklaştırması işleminde kullanılması ve daha sonra sulardan temizlenmesi gibi problemler ortaya çıkması ile ince film tabakalar veya nano-TiO<sub>2</sub> gibi farklı formlar üretilmiştir. Saf titanyumdioksit, parlak, beyaz pigment sağlayan, ince ve beyaz bir tozudur. Boyalar, kaplamalar kâğıt endüstrisi, tekstil ürünleri, gıda ve kozmetik sektörü, su arıtma, katalizör, ilaç, seramik ve plastik TiO<sub>2</sub> 'nin diğer kullanım alanlarıdır (Şam vd.,2007).

### **METOD**

#### **Mekanik bilyalı öğütme ile sepiyolit-TiO<sub>2</sub> tozlarının hazırlanması**

Mekanik bilyalı öğütme yöntemi ile yüksek enerjili bilyalı öğütücü içinde sepiyolit ve TiO<sub>2</sub> tozlarının soğuk kaynaklama, kopma ve yeniden kaynaklama sonucu ince bir yapıya sahip nano kompozitlerin üretimi amaçlanmıştır. Bu yöntemde adsorbent olarak seçilen sepiyolit ve TiO<sub>2</sub> tozları, 1:5 oranında 10 gram toz, 50 gram bilya olacak şekilde 100 ml'lik kahverengi saklama şişelerine konulmuştur. Toz oranları sırasıyla, %20 TiO<sub>2</sub>- %80 sepiyolit, %40 TiO<sub>2</sub>- %60 sepiyolit, %50 TiO<sub>2</sub>- %50 sepiyolit, %60 TiO<sub>2</sub>- %40 sepiyolit, %80 TiO<sub>2</sub>- %20 sepiyolit olacak şekilde 5 farklı oranda seçilmiştir. Şişeler 50 mL etanol konulmuş ve iyice çalkalanmıştır. Ardından şişeler bir değirmen içine yerleştirilmiştir. 2,10 ve 19 saatlik öğütme işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemeden sonra numune ve bilyalar süzgeç yardımıyla birbirinden ayrılmıştır. Vakum filtrasyonu ile süzülerek toz numune filtre kâğıdından geçirilmiştir. Filtre kâğıtları etüvde 50°C'de 1 gün boyunca kurutulmuştur. Kurutulan filtre kâğıdı üzerindeki numune bir kaşık yardımıyla sıyırılmış ve havanda dövülmüştür. Hazırlanan adsorbentler deney aşamasında kullanılması için kilitli poşetlerde saklanmıştır (Kumric vd.,2014).

#### **Modifiye edilmiş nano- TiO<sub>2</sub> tozlarının hazırlanması**

Nano- TiO<sub>2</sub> yüzey aktif madde aktivasyonu ile 2-merkaptobenzimidazole(MBI) ile modifiye edilmesi amaçlanmıştır. 250 mL'lik erlenlerde,50 mL saf su içinde 1 gram nono-TiO<sub>2</sub> agregasyonu azaltmak için karıştırıldı. Karışım esnasında 15 mL, 0.001 mol HCl damla damla eklendi. Erlenler Bandelin Sonorex model ultrasonik banyoya yerleştirildi. 60°C'de 60 dakika boyunca karıştırıldı. Bu karışım sırasında 3 mL 0.05 mol/L sodyum dodesol sülfat (SDS) ilave edildi. 60 dakika sonunda 10 mL etanol içinde çözünmüş 0,3 gram 2-mercaptobenzimidazole (MBI) solüsyona eklendi. Ardından 60°C'de 60 dakika daha ultrasonik etki altında karışması sağlandı. İşlem sonunda solüsyon vakum filtrasyonu yardımıyla filtre kâğıdından süzüldü ve filtre kâğıtları 50°C'de 1 gün boyunca etüvde kurutuldu. Etüvde kurutulan filtre kâğıtlarındaki numune spatül yardımıyla sıyırılarak havanda dövüldü. Hazırlanan adsorbent deney aşamasında kullanılması için kapalı bir şişede saklandı (Pourreza vd.,2012).

**Tablo 1.** Kullanılan adsorbentlerin BET analiz sonuçları

BET Analizi	Sepiyolit	TiO <sub>2</sub>	Mekanik Öğütülmüş Nano Kompozitler	Modifiye edilmiş Nano TiO <sub>2</sub>
Eğim	1466.220 (1/g)	296.044 (1/g)	540.691 (1/g)	311.272 (1/g)
Tutma Kapasitesi	3.625e+02 1/g	5.654e-01 (1/g)	9.553e-01 (1/g)	-1.184-02 (1/g)
Korelasyon Katsayısı	0.9943 (r)	0.9991 (r)	0.9988 (r)	0.9984 (r)
C Sabiti	5.045	524.641	566.967	-26295.741
Yüzey Alanı	1.904 m <sup>2</sup> /g	11.741 m <sup>2</sup> /g	6.429 m <sup>2</sup> /g	11.188 m <sup>2</sup> /g
Toplam Gözenek Hacmi	4.295e-03 cc/g	4.953e-02 cc/g	3.500e-02 cc/g	3.892e-02 cc/g
Daha Küçük Gözenekler	1093.5 Å (Radius)	1104.3 Å (Radius)	1100.3 Å (Radius)	1126.1 Å (Radius)
P/P <sub>0</sub>	0.99116	0.99124	0.99121	0.99142
Ortalama Gözenek Hacmi	4.51018e+01 Å	8.43767e+01 Å	1.08870e+02 Å	6.95701e +0.1 Å

### Adsorpsiyon deneyi

Adsorpsiyon deneyleri kesikli çalışan sistemde sabit sıcaklıkta yürütülmüştür. Deneysel çalışmalar 50 mg/L'lik çözeltiler üzerinden yürütülmüştür. Çözelti hacmi 50 mL olarak belirlenmiştir. Adsorbent olarak mekanik öğütülmüş nano- kompozitler ve modifiye edilmiş TiO<sub>2</sub> kullanılmıştır. Deneyler 100 ml'lik erlenler ile gerçekleştirilmiştir. Kesikli adsorpsiyon deneyleri için 8 hazneli İnova 2000 Platform Shaker model bir adet karıştırıcı kullanılmıştır. Karıştırma hızı 200 rpm olarak ayarlanmıştır. Numunelerin adsorbent ile temasını sağlamak için 90 dakika boyunca karışması sağlanmıştır. Karıştırma işleminden sonra 5 dakika boyunca çözelti içindeki adsorbentlerin çökmesi beklenmiş ve erlenlerdeki numunelerin üst yüzeyinden bir pipet yardımıyla alınarak santrifüj tüplerine konulmuştur. Bu işlemden sonra numuneler Sigma 3-16p model santrifüjde 5000 rpm hızında 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Santrifüjden çıkarılan tüplerin içine birer damla nitrik asit damlatılmıştır. Alevli Adsorpsiyon Spektroskopisinde numune değerleri okutulmuştur. Deneysel çalışmalar iki kopya halinde yürütülmüş ve elde edilen sonuçların ortalama değerleri alınarak deneysel veriler elde edilmiştir.

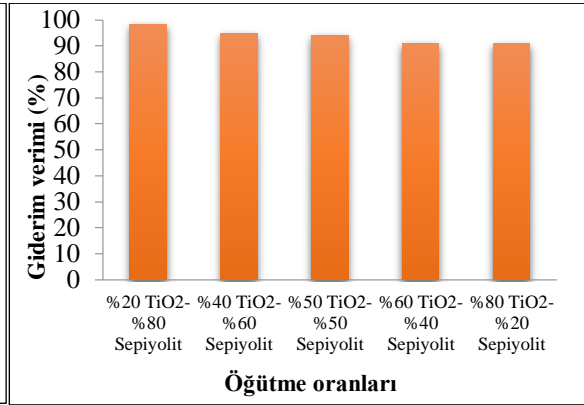
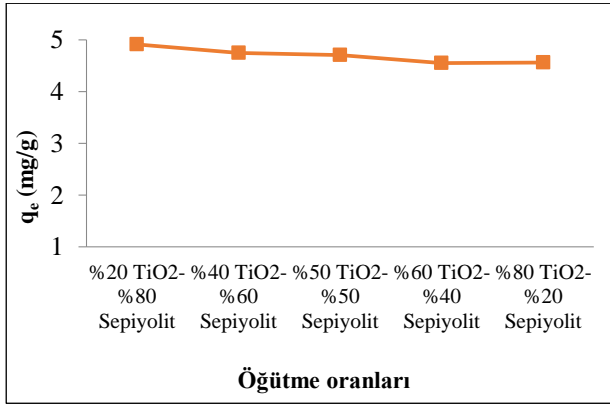
### SONUÇ

Adsorpsiyon izoterm çalışmalarında Langmuir, Freundlich ve Tempkin izotermi üzerine çalışmalar yapılmıştır. En yüksek verim Langmuir izotermi, çinko ile yapılan çalışmalarda Mekanik öğütülmüş nano-kompozitler ile giderimde en yüksek verim Freundlich izotermi % 99.13 olarak elde edilmiştir. Modifiye edilmiş nano- TiO<sub>2</sub> ile giderimde en yüksek verim Langmuir izotermi elde edilmiş % 98.63 olarak bulunmuştur. Mekanik öğütülmüş nano kompozitlerinde sulu çözeltilerden çinko giderimi için iyi bir adsorbent olduğu gözlenmiştir. Sadece sulu çözeltilerden ağır metal giderimi değil, ucuz doğal materyaller kullanılarak, atıksulardan da kesikli veya sürekli sistemlerde adsorpsiyonla ağır metal giderimi üzerine çalışmalar gerçekleştirilebilir.

### TARTIŞMA

#### Mekanik bilyalı öğütülmüş nano-kompozitlerin etkisi

Mekanik olarak öğütülmüş sepiyolit ve TiO<sub>2</sub> nano-kompozitlerinin adsorpsiyon üzerine etkisi incelenmiştir. Kompozitlerin hazırlanmasında öğütme süresi, bilya/toz oranı ve sepiyolit ile TiO<sub>2</sub>'nin karışım oranları dikkate alınarak deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Optimum öğütme süresi 19 saat, en iyi bilya/toz oranı 1/5 olacak şekilde belirlenmiştir (Dukic vd.,2014). Bilya oranları arttıkça(1/5, 1/10, 1/20 ve 1/40) daha küçük boyutta toz elde edilmekte ancak istenmeyen kirler ve istenmeyen fazlar oluşacağından dolayı bu oranlar optimize edilmiştir.



**Şekil 1.** Farklı toz oranlarına sahip nano-kompozit adsorbentlerin çinko giderimi üzerine etkisi

**Şekil 2.** Farklı toz oranlarına sahip nano-kompozit adsorbentlerin çinko giderim verimine etkisi

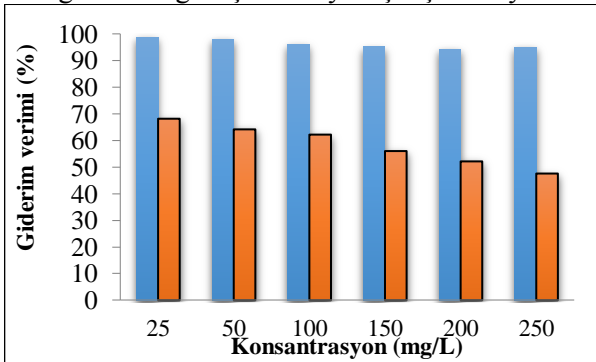
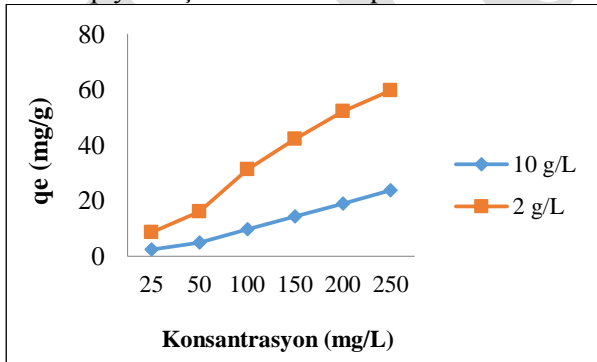
Farklı toz oranlarına sahip nano-kompozitlerin adsorpsiyon üzerine etkinliği araştırılmıştır. 10 g/L adsorbent miktarı için başlangıç konsantrasyonu 50 mg/L olacak şekilde deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda Toz oranlarının adsorplama kapasitesini çok fazla etkilemediği görülmüştür. Optimim şartlara %50 TiO<sub>2</sub>-%50 sepiyolit olacak şekilde belirlenmiştir.

**Tablo 2.** Farklı toz oranlarına sahip nano-kompozit adsorbentlerin çinko adsorpsiyonu üzerine etkisi

Öğütmedeki Toz oranları	Çinko q <sub>e</sub> (mg/g)	Çinko % Verim
%20 TiO <sub>2</sub> -%80 Sepiyolit	4.913	98.274
%40 TiO <sub>2</sub> -%60 Sepiyolit	4.743	94.862
%50 TiO <sub>2</sub> -%50 Sepiyolit	4.705	94.104
%60 TiO <sub>2</sub> -%40 Sepiyolit	4.554	91.086
%80 TiO <sub>2</sub> -%20 Sepiyolit	4.555	91.110

#### Konsantrasyon Etkisi

Çinko çözeltisi ile yapılan deneysel çalışmalarda başlangıç ağır metal konsantrasyonu ve öğütülmüş nano-kompozit adsorbent miktarının adsorpsiyona etkisi incelenmiştir. Başlangıç çinko konsantrasyonu sırasıyla 25, 50, 100, 150, 200, 250 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Mekanik olarak sentezlenen toz oranı %50 TiO<sub>2</sub>-%50 sepiyolit içeren nano-kompozit adsorbent miktarı 2 g/L ve 10 g/L için deneysel çalışmalar yürütülmüştür.



**Şekil 4.** Başlangıç ağır metal konsantrasyonu ve nano-kompozit adsorbent miktarının çinko giderim verimine etkisi

**Şekil 5.** Başlangıç ağır metal konsantrasyonu ve nano-kompozit adsorbent miktarının çinko giderim verimine etkisi



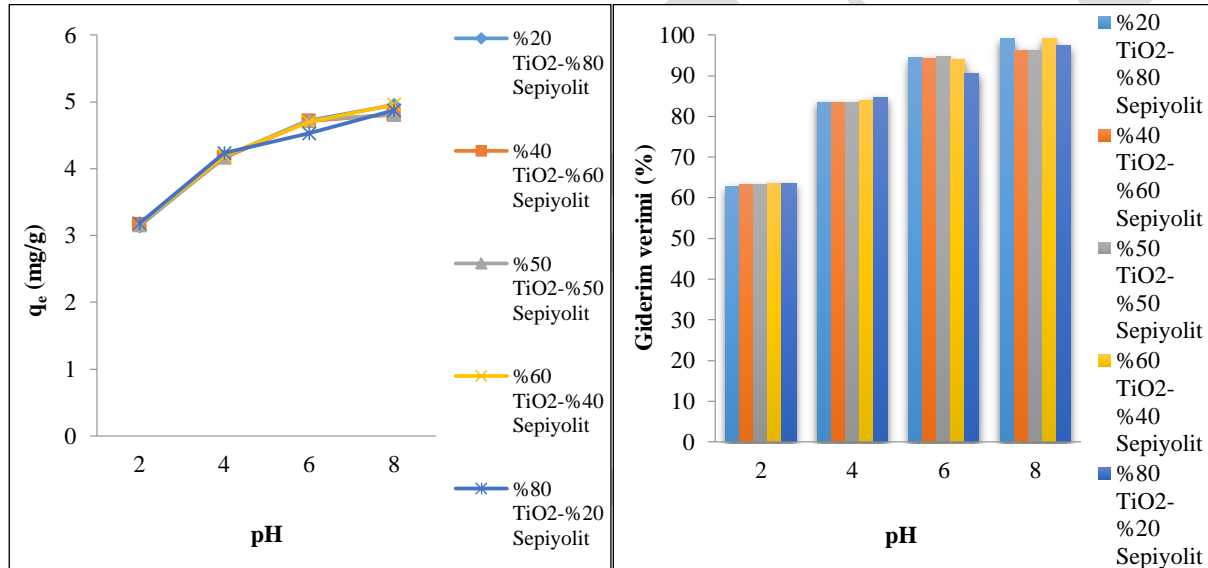
Deneysel veriler sonucunda konsantrasyon miktarındaki artış ile adsorplanan madde miktarı orantılıdır. Ancak adsorpsiyon giderim verimi azalmaktadır. Bunun nedeni ortamdaki adsorplanacak madde miktarının fazla, adsorplayacak madde miktarının azalmasından kaynaklandığı şeklinde açıklamak mümkündür.

**Tablo 2.** Farklı adsorbent miktarları için başlangıç çinko konsantrasyonlarının adsorpsiyon üzerine etkisi.

Başlangıç Çinko Konsantrasyonu (mg/L)	2 g/L $q_e$ (mg/g)	2 g/L % Verim	10 g/L $q_e$ (mg/g)	10 g/L % Verim
25	8.518	68.14	2.469	98.77
50	16.035	64.14	4.899	97.98
100	31.088	62.17	9.610	96.09
150	42.000	56.00	14.264	95.09
200	52.120	52.12	18.837	94.18
250	59.450	47.56	23.731	94.92

### pH Etkisi

Adsorbent yüzeyindeki aktif bölgeler için metal iyonları ile hidrojen iyonları arasında bir çekişme vardır. Bu nedenle ortamın asitliği arttığında metal tutunması etkili olamamaktadır. pH değeri adsorbentin yüzey yükünü, iyonlaşma derecesini ve adsorplanan maddeyi etkilemektedir. Adsorbentin yüzey mekanizmasına ve kirletici için adsorbent arasındaki bağlanma noktalarına etki ettiği için pH adsorpsiyon için en önemli parametrelerden biridir.



**Şekil 5.**Farklı toz oranlarındaki adsorbentler ile pH'ın çinko giderimi üzerine etkisi.

**Şekil 6.**Farklı toz oranlarındaki adsorbentler ile pH'ın çinko gider verimi üzerine etkisi.

pH 2'de çinko iyonu yaklaşık % 63 oranında giderilirken bu oran pH 8'de %99'a kadar ulaştığı gözlenmiştir. pH düşüğe adsorplanan madde miktarı azalmaktadır. Bu durum çözelti ortamında  $H^+$  iyonlarının fazlalığından kaynaklandığı ve adsorbentin anyonik bir yapıda olduğunu göstermektedir. Çözeltinin orijinal pH'sı 6.5-7.5 arasında değişkenlik göstermektedir.

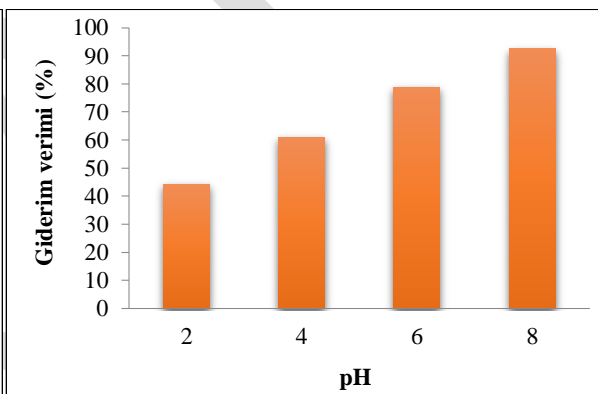
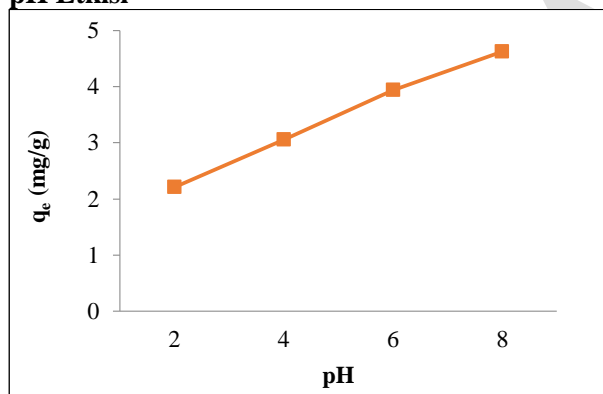
**Tablo 3.** Farklı toz oranlarında öğütülmüş nano-kompozit adsorbent miktarları ile pH'ın çinko giderimi üzerine etkisi

Öğütmedeki Toz oranları	pH:2 $q_e$ (mg/g)	pH:4 $q_e$ (mg/g)	pH:6 $q_e$ (mg/g)	pH:8 $q_e$ (mg/g)
%20 TiO <sub>2</sub> -%80 Sepiyolit	3.136	4.174	4.719	4.954
%40 TiO <sub>2</sub> -%60 Sepiyolit	3.166	4.164	4.710	4.809
%50 TiO <sub>2</sub> -%50 Sepiyolit	3.158	4.176	4.730	4.809
%60 TiO <sub>2</sub> -%40 Sepiyolit	3.174	4.193	4.700	4.956
%80 TiO <sub>2</sub> -%20 Sepiyolit	3.179	4.237	4.528	4.870

### Modifiye Edilmiş TiO<sub>2</sub> Kompozitlerinin Etkisi

Yüzey aktif madde aktivasyonu modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> adsorbent olarak kullanılmıştır. Modifiye işlemi için 2-merkaptobenzimidazole(MBI) kullanılmıştır. TiO<sub>2</sub>'nin adsorbent olma eğilimini artırmak için anyonik yüzey aktif madde olarak sodyum dodesol sülfat (SDS) kullanılmıştır. Başlangıç çinko konsantrasyonu 50 mg/L, adsorbent miktarı 10 g/L olacak şekilde seçilmiştir. Deneysel şartlarda adsorbentin adsorplama kapasitesi Çinko için 4.399 olarak elde edilmiştir. Adsorpsiyon giderim verimleri ise çinko için % 87.99 olarak belirlenmiştir. 2-merkaptobenzimidazole yapısı nedeniyle amfiprotik madde gibi davranabilmektedir. Bu nedenle metal iyonları ile kompleks oluşum kabiliyeti pH'a bağlı olabilmektedir. Modifiye edilmiş TiO<sub>2</sub> kompozitlerinin asidik ortam şartlarında adsorplama kapasitesi düşük bazik ortam şartlarında yüksek olduğu gözlenmiştir.

### pH Etkisi



**Şekil 7.** pH'ın modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> adsorbenti ile çinko giderimi üzerine etkisi.

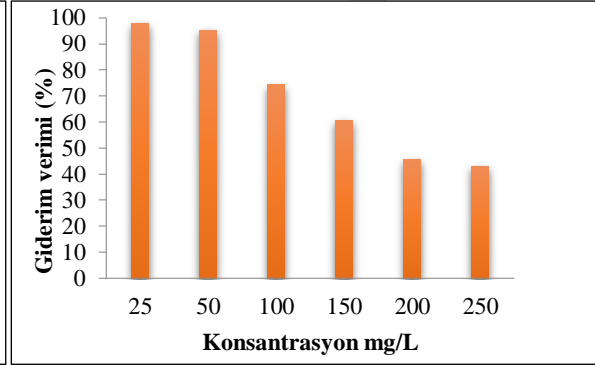
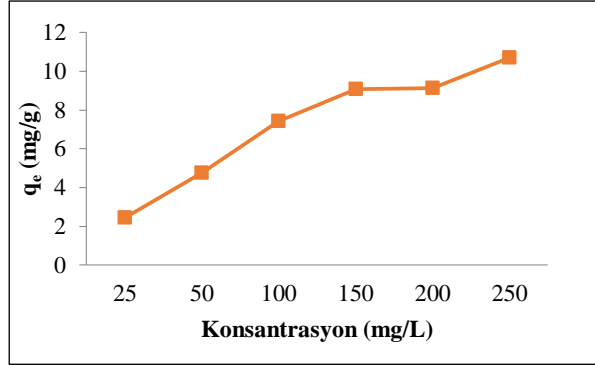
**Şekil 8.** pH'ın modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> adsorbenti ile bakır ve çinko giderim verimine etkisi.

**Tablo 5.** Farklı pH'larda modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> adsorbenti ile bakır ve çinko giderim verimine etkisi

pH	Modifiye-TiO <sub>2</sub> $q_e$ (mg/g)	Modifiye-TiO <sub>2</sub> % Verim
2	2.212	44.24
4	1.108	61.02
6	3.051	78.83
8	2.383	92.5

### Konsantrasyon etkisi

Deneysel şartlar oda sıcaklığında, 10 g/L adsorbent miktarında 100 mL'lik erlenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Başlangıç çinko konsantrasyonu 25, 50, 100, 150, 200 ve 250 mg/L olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. Düşük konsantrasyon değerlerinde adsorbentin adsorplama kapasitesi düşük, adsorpsiyon verimi ise fazla olduğu deneysel çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise adsorbentin adsorplama kapasitesi yüksek olduğu, giderim veriminin ise daha düşük olduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Bunun nedeni yüksek konsantrasyonlarda adsorplanacak madde miktarının fazla olduğu için adsorbent maddenin yüzey gözeneklerinin çok çabuk dolmasından kaynaklandığı şeklinde savunulabilir. En yüksek giderim verimi, 25 mg/L başlangıç ağır metal konsantrasyonunda çinko için %97.94 olarak belirlenmiştir.



Şekil 9. Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun modifiye edilmiş nano- TiO<sub>2</sub> adsorbentleri ile çinko giderimi üzerine etkisi.

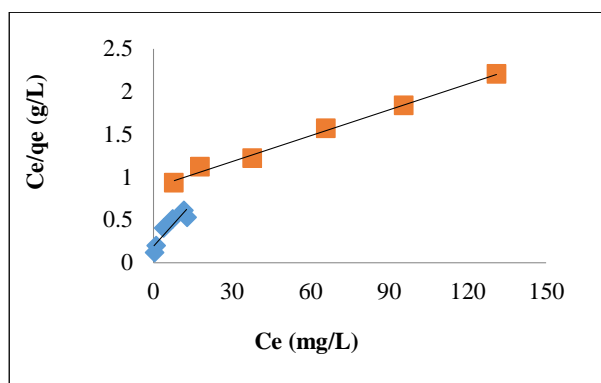
Şekil 10. Başlangıç ağır metal konsantrasyonu modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> adsorbentleri ile çinko giderim verimine etkisi.

**Tablo 6.** Başlangıç ağır metal konsantrasyonunun modifiye edilmiş nano- TiO<sub>2</sub> adsorbentleri ile çinko giderimi üzerine etkisi.

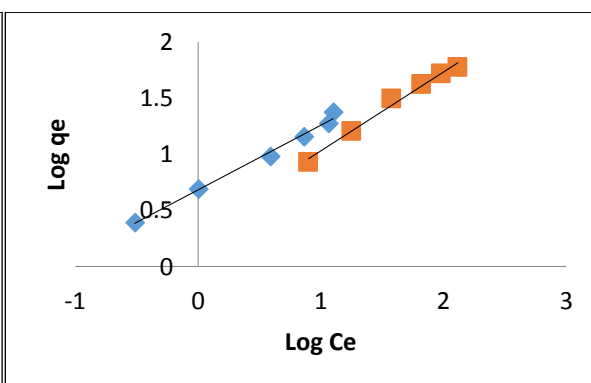
Başlangıç Çinko Konsantrasyonu (mg/L)	Modifiye-TiO <sub>2</sub> q <sub>e</sub> (mg/g)	Modifiye-TiO <sub>2</sub> % Verim
25	2.4485	97.94
50	4.765	95.30
100	7.425	74.25
150	9.067	60.45
200	9.135	45.68
250	10.700	42.80

### İzoterm Çalışmaları

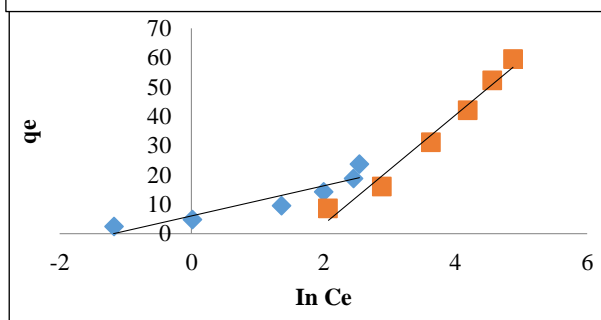
Adsorpsiyon izotermi, adsorpsiyon sistemlerinin tasarımı ve analizi için gerekli olan temel bir sistemdir. İzoterm sabit sıcaklıktaki adsorpsiyon prosesinin denge anında adsorbentin adsorplayabileceği birim kütle başına madde miktarı ile akışkan fazdaki madde konsantrasyonu arasındaki bağlantıyı verir. Bu bölümde modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> ve Mekanik öğütülmüş nano kompozitler için sulu çözeltilerden çinko giderimi için farklı konsantrasyonlarda üç farklı izoterm çalışması yapılmıştır. Bu izotermi ise Langmuir, Freundlich ve Temkin adsorpsiyon izoterm modelleridir. İzoterm çalışmalarından elde edilen parametreler ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.



**Şekil 11.** Mekanik öğütülmüş nano-kompozitler ile çinko adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi.



**Şekil 12.** Mekanik öğütülmüş nano-kompozitler ile çinko adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi.

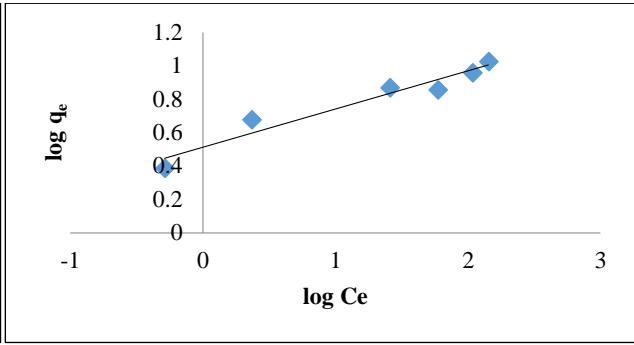
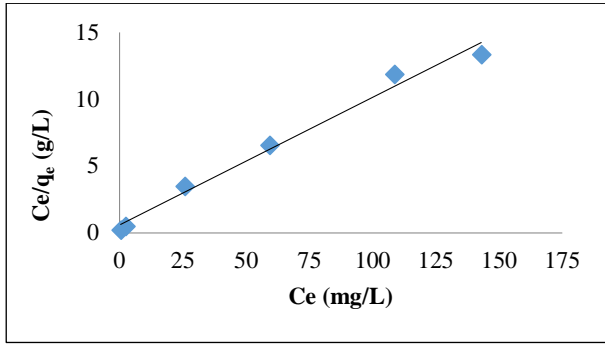


**Şekil 13.** Mekanik öğütülmüş nano-kompozitler ile çinko adsorpsiyonunun Temkin adsorpsiyon izotermi

Mekanik Öğütülmüş Nano- Kompozitler-Bakır			
Langmuir izotermi		2 g/L	10 g/L
50 mg/L	q <sub>max</sub>	46.728	33.22
	b	0.016	0.404
	R <sup>2</sup>	0.984	0.952
Freundlich izotermi			
50 mg/L	n	1.717	1.620
	K <sub>f</sub>	1.767	8.478
	R <sup>2</sup>	0.945	0.983
Temkin izotermi			
50 mg/L	K <sub>t</sub>	10.300	5.760
	A <sub>t</sub>	0.164	1.981
	R <sup>2</sup>	0.979	0.916

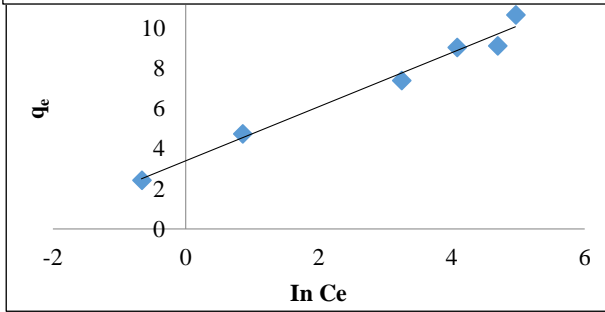
Modifiye Edilmiş Nano-TiO <sub>2</sub>		
Langmuir izotermi		Çinko
50 mg/L	q <sub>max</sub>	10.460
	b	0.163
	R <sup>2</sup>	0.986
Freundlich izotermi		
50 mg/L	n	4.376
	K <sub>f</sub>	3.256
	R <sup>2</sup>	0.941
Temkin izotermi		
50 mg/L	K <sub>t</sub>	1.350
	A <sub>t</sub>	12.341
	R <sup>2</sup>	0.980

Çinko çözeltisinin mekanik öğütülmüş nano-kompozitler ile adsorpsiyonunda 2g/L adsorbent miktarı için en yüksek korelasyon katsayısı 0.994 olarak Langmuir izotermi için bulundu. Langmuir izoterm modelinin daha uygun olduğu tespit edildi. Bu durum adsorpsiyon modelini tek tabakalı olarak gerçekleştirdiğinin bir göstergesidir. 10 g/L adsorbent miktarı için korelasyon katsayısı en yüksek 0.983 olarak Freundlich izoterm modeli için elde edildi. Bu nedenle adsorban yüzeyinin homojen olmadığı adsorplanan moleküller arasında etkileşimin meydana geldiği ideal olmayan sistemler olduğu şeklinde ifade edilebilir.



**Şekil 13.** Modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> ile çinko adsorpsiyonunun Langmuir adsorpsiyon izotermi.

**Şekil 14.** Modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> ile çinko adsorpsiyonunun Freundlich adsorpsiyon izotermi.



**Şekil 15.** Modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> ile çinko adsorpsiyonunun Temkin adsorpsiyon izotermi.

Çinko'nun modifiye edilmiş nano-TiO<sub>2</sub> üzerine adsorpsiyonunda korelasyon katsayısı 10g/L adsorbent miktarında 0.986 olarak belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda adsorpsiyon mekanizmasının Langmuir izoterm modeline uygun olduğu görülmüştür. Langmuir izoterm sabiti 50 mg/L konsantrasyonunda 50 mL çözelti için  $R_L$  0.109 olarak hesaplanmıştır.

## TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı kapsamında 2017 yılında PYO.MUH 1904.17.001 proje numarası ile desteklenmiştir. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi grubuna Projemize sundukları imkân ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- BIAC Expert Group on Nanotechnology, (2009). Responsible Development of Nanotechnology: Turning Vision Into Reality.
- Luther, W, (2008). Application of Nanotechnologies in the Energy Sector. Düsseldorf : HA Hessen.
- Bharat, B, (2007). Handbook of Nanotechnology. New York : Springer Press
- Can, G. (1992). Dünya'da ve Türkiye'de Sepiyolitik Kil. Ankara: Maden Tetkik ve Arama Fizibilite Etüdları Dairesi.
- Dukic, A., Kumric, K., Vukelic, N. (2015). Simultaneous removal of Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> from highly acidic solutions using mechanochemically synthesized montmorillonite-kaolinite/TiO<sub>2</sub> composite. Applied Clay Science, 20-27.
- Anonim, (2016). Türkiye ve Dünyada Bakır. Ankara: Maden Tetkik Arama Müdürlüğü.
- Purreza, N., Rastegarzadeh, S. (2012). Nao-TiO<sub>2</sub> modified with 2 mercaptobenzimidazole as an efficient adsorbent for removal of Ag from aqueous solutions. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 127-132.
- Sabah, E., Çelik, M. S. (2006). Atık Sularda Kirleticilerin Sepiyolitik İle Uzaklaştırılması. Kil Bilimi ve Teknolojital Dergisi, 55-72.

## Ameliorative effects of vitamin C on testosterone biosynthesis in acrylamide-exposed Leydig cells

Banu Orta Yilmaz

Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul, Turkey.

Corresponding author e-mail: banu.yilmaz@istanbul.edu.tr

### Abstract

In recent years, increasing concern has been concerned about the hazardous effects on the male reproductive system of various food toxicants. Acrylamide (Acr), which is widely used in industrial field, has been found to occur spontaneously in foods cooked in high temperatures in recent years. Acr, known to have various toxic effects on humans and animals, has been shown to cause infertility by causing various damages in the male reproductive system. This study was performed to determine the effects of Acr on the steroidogenic pathway that provides the testosterone production and the effect of vitamin C (VitC) on this damage. Acr (1000  $\mu$ M) and VitC (50  $\mu$ M) were exposed to TM3 Leydig cells for 24 h with luteinizing hormone stimulated conditions. Following the exposure time, Leydig cells were evaluated for cell viability, cytotoxicity, testosterone secretion and the changes in expression levels of steroidogenic genes (steroidogenic acute regulatory protein, cholesterol side chain cleavage enzyme, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3). The results indicated that Acr reduced the cell viability and decreased the levels of testosterone. The changes on expression levels of the genes which are essential at steroidogenic pathway, concluded that Acr was negatively affected the testosterone biosynthesis. In addition, this study found that VitC, a natural antioxidant, may have a curative effect against the harmful effects of Acr.

**Keywords:** acrylamide, steroidogenic genes, Leydig cells, vitamin C, testosterone secretion.

### INTRODUCTION

Acrylamide, due to its widespread use in industry, poses a risk to all living organisms by direct skin and inhalation (Wu et al., 2010). Acr, which is used for filtering undesirable substances during the water treatment, is taken orally with drinking water for it is also found in underground and surface waters (Besaratina ve Pfeifer, 2007). In addition, exposure to Acr is unavoidable with smoking (Parzefall, 2008). Tareke et al. (2002) showed that high heat-treated foods contained high amounts of Acr, then many studies have investigated the amount of acrylamide in food, chemical formation reactions, metabolism and toxicity of Acr (Taeymans ve diğ., 2004; Besaratina and Pfeifer, 2007; Parzefall, 2008). Acr, which is not found in the natural structure of nutrients, occurs as a result of the Maillard reaction of carbohydrates and proteins, known as enzymatic reactions at high temperatures (De Wilde et al., 2005). With over 120 °C of heat treatment of rich carbohydrate-containing foods, especially by frying and baking, the naturally occurring Acr is in the nutrients that every age group consumes in every meal due to our eating habits (Tareke et al., 2002). Especially, cereal and potato products were determined to contain high amounts of Acr (Rydberg et al., 2003). Due to the low molecular weight and high solubility of Acr, various studies have shown that it is rapidly and extensively absorbed and distributed to tissues (US EPA, 2010). In several studies, it has been determined that Acr has negative effects on reproduction and development as well as genotoxic, neurotoxic, carcinogenic and mutagenic effects (Takahashi et al., 2008). It was observed that testis and epididymis weights were decreased, and testicular tissue integrity deteriorated in Acr exposed male animals. In studies, Acr has also been shown to affect sperm count, viability and mobility. Furthermore, Acr induces apoptosis in seminiferous tubule cells, negatively impacting serum testosterone level and Leydig cells viability and spermatogenesis (Yang et al., 2005, Camacho et al., 2012).

An adequate amount of antioxidant should be consumed to prevent and minimize the oxidative stress caused by free radicals. Vitamin C is functional in the biosynthesis of collagen I and collagen IV, which are the basic collagen in the basal lamina of the seminiferous tubules and in the hydroxylation step of steroidogenesis (Luck et al., 1995). Also, VitC has important functions in preventing or reducing the oxidation of biological macromolecules such as DNA, proteins, lipids and carbohydrates with free oxygen radicals such as OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO (Mukhopadhyay and Chatterjee, 1994; Young and Woodside, 2001). In the absence or insufficiency of VitC decreased sperm count, motility and agglutination, and increased abnormal sperm count (Dawson et al., 1990). In studies conducted with Acr and VitC, it was concluded that VitC has a protective effect against Acr damage in various experimental animals (Soliman, 2013; Dortaj et al., 2017). However, although the individual

effects of Acr and VitC on male reproductive system have been examined, there is no study on how steroidogenic genes responsible for testosterone production lead this mechanism when these two agents are co-administered.

Leydig cells located between the seminiferous tubules in the testes are the main cells responsible to produce testosterone (Payne and Youngblood, 1995). In this study, mouse Leydig cells were used as an *in vitro* model to investigate the effects of Acr and VitC on testosterone biosynthesis. Thus, the aims of this study were to demonstrate the damage induced by Acr administration on TM3 Leydig cells by evaluating cytotoxicity, testosterone production and the expression levels of steroidogenic genes such as steroidogenic acute regulatory protein (*Star*), cholesterol side-chain cleavage enzyme (*Cyp11a1*), 3 $\beta$ -hydroxy dehydrogenase type 1 (*Hsd3b1*) and 17 $\beta$ -hydroxy dehydrogenase type 3 (*Hsd17b3*).

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The mouse Leydig TM3 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). For the cells, cell culture medium containing 50:50 DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, nutrient mix F12 Ham medium) supplemented with 5% Horse Serum, 2.5% Fetal Bovine Serum, 2.5 mM L-Glutamine, 0.5 mM Sodium Pyruvate, 1.2 g / L Sodium Bicarbonate, 15 mM HEPES and 1% Penicillin-Streptomycin mixture was used. Cells were incubated in sterile conditions with a temperature of 37 °C containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in incubator. Acr (Sigma Chemical Company) was dissolved in medium containing 1% horse serum for administration to the cells to obtain a 10 mM stock solution. Different concentrations of Acr were prepared from this stock solution by diluting with medium containing 1% horse serum. In the experiments, the selected VitC concentration was 50  $\mu$ M, which was used in *in vitro* studies and was known to be the average antioxidant concentration of VitC. VitC was dissolved in 1% horse serum and freshly prepared. In all experiments, luteinizing hormone was added to the control, Acr and VitC groups at 100 ng/ml to stimulate the cells (Adedara et al., 2014).

### Cell viability

The effects of Acr and VitC on Leydig cell viability were determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) kit (Roche, Germany). Leydig cells were seeded in a 96-well cell culture plate for 24 h at a density of 5000 cells per well. The cells were then treated with twelve different concentrations of Acr (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 and 10000  $\mu$ M) prepared in medium containing 1% horse serum. At the end of the exposure, the kit protocol was applied. The optic intensities of the cells were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) device at a wavelength of 540 nm. The viability of the control cells, which were not treated with the test substance, was assumed to be 100%, and the viability of the experimental cells was expressed in percentages. Based on these calculations, the 1000  $\mu$ M concentration of Acr, which caused a first significant reduction in cell viability (81%), was selected for use in subsequent experiments. In the light of these results, MTT test was repeated in Leydig cells exposed Acr and VitC.

### Lactate dehydrogenase enzyme activity

The amount of lactate dehydrogenase enzyme was determined using the micro plate-based Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). The cells were seeded in 96-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well) with concentrations of Acr (1000  $\mu$ M) and VitC (50  $\mu$ M) and incubated at 37°C with CO<sub>2</sub> for 24 h. The kit procedure was applied, and the results were measured on a 492 nm wavelength with a spectrophotometer. The cytotoxicity of the control cells not exposed with the test substance was considered as 100% and the results were calculated.

### Testosterone production

The total testosterone amount in the cell culture supernatant was measured using Testosterone Elisa Kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as described by the manufacturer. The optical density of each samples was measured within 30 min, using a microplate reader set to 450 nm and concentration values were determined by drawing standard graphs.

### Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

TM3 cells were plated at  $1 \times 10^6$  (per well/cell) in six-well plates and treated with indicated Acr concentration (1000  $\mu$ M) and VitC concentration (50  $\mu$ M) for 24 h. Total RNA was extracted from the treated cells using the RNeasy Mini Kits (Qiagene, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. First-strand complementary DNA was synthesized from RNA using Turbo 1 reverse transcriptase (Biomatic, Ontario, Canada) and primer (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) as described by the manufacturer. A LightCycler 480 SYBR Green 1 Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kit was used according

to the manufacturer's instructions for the quantification of gene expression. The housekeeping gene  $\beta$ -actin was used as an internal control. The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method of Schmittgen and Livak (2008) was used to analyze the data. The primer sequences used for real-time PCR are provided in Table 1.

**Table 12.** List of primers used for real-time PCR

Primers	Sequence 5'-3'	Base pair	References
<i>Star</i>	<b>F:</b> CTGCTAGACCAGCCCATGGAC <b>R:</b> TGATTTTCCTTGACATTTGGGTTCC	109	Horstman et al., 2012
<i>Cyp11a1</i>	<b>F:</b> CGTGACCAGAAAAGACAACA <b>R:</b> AGGATGAAGGAGAGGAGAGC	152	Liu et al., 2014
<i>Hsd3b1</i>	<b>F:</b> TAGTATTGCTTTTATTTCCCCCT <b>R:</b> ATTTATTGCTGTTTTTGTTTTGC	91	Liu et al., 2014
<i>Hsd17b3</i>	<b>F:</b> TGGGGCTGGAGGGAGAGT <b>R:</b> TATTTGGGGGGAGGGGTTC	228	Liu et al., 2014
$\beta$ -Actin	<b>F:</b> CGTTGACATCCGTAAAGAC <b>R:</b> TGGAAGGTGGACAGTGAG	201	Liu et al., 2014

### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA) and analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons among all groups. Data distribution was tested for normality using the Shapiro-Wilk test. All data was calculated by a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. The results were expressed as mean±standard error and values of  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### The cell viability of Leydig cells under different conditions

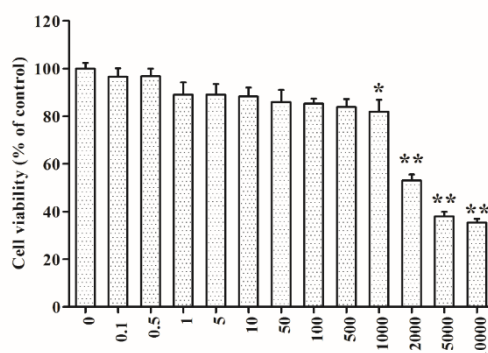
Cell viability in Leydig cells exposed to Acr for 24 hours decreased at concentrations of 1000  $\mu$ M and higher (Figure 1). The first significant decrease was observed in the 1000  $\mu$ M concentration of Acr and decreased cell viability to 81% ( $p < 0.05$ ). Therefore, the concentration of Acr to be used in the study was determined as 1000  $\mu$ M. Then the Leydig cells were exposed with Acr (1000  $\mu$ M) and VitC (50  $\mu$ M) for 24 h, the cell viability increased in Acr+VitC group compared with only Acr group (Figure 2A) ( $p < 0.01$ ).

### Cytotoxicity results

The results showed that lactate dehydrogenases enzyme activity increased after 1000  $\mu$ M Acr treatment ( $p < 0.01$ ). When the groups of Acr and VitC were applied together, it was observed that VitC had an ameliorative effect on the cytotoxicity caused by Acr (Figure 2B) ( $p < 0.01$ ).

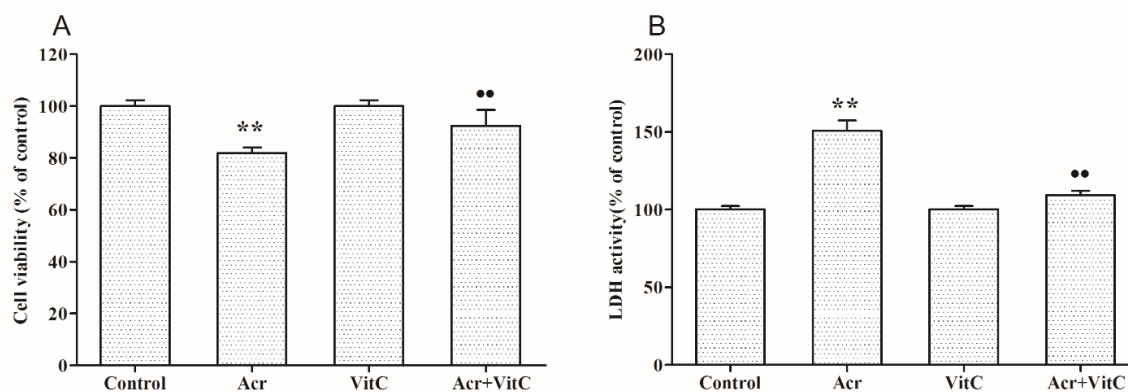
### Changes in testosterone secretion

Testosterone values measured after administration of Acr alone/or with VitC for 24 h in Leydig cells were given in figure 3. When the results were examined, it was observed that Acr decreased testosterone release ( $p < 0.01$ ) and VitC significantly increased compared to the only Acr group ( $p < 0.05$ ).

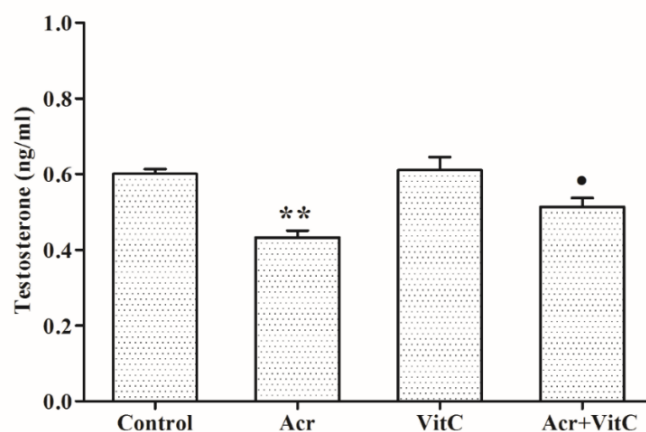


**Figure 1.** Effects of different concentrations of Acr on cell viability. All data are presented as the means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Significance at \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . (\*) compared with control group.





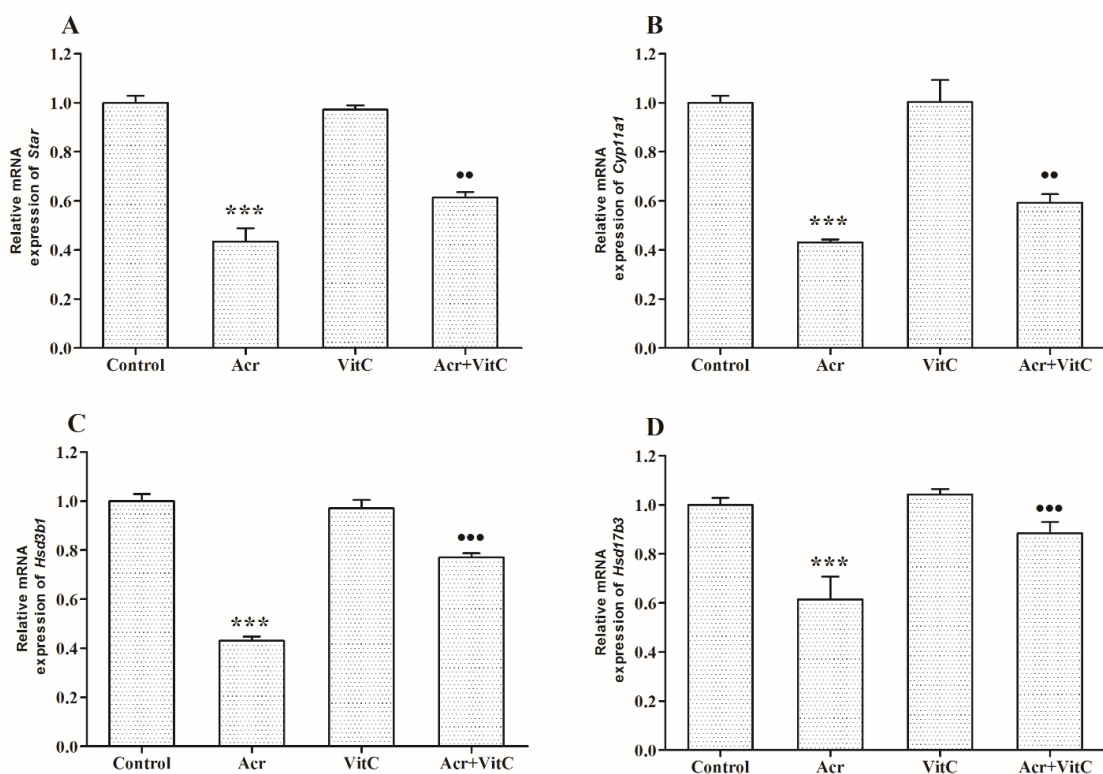
**Figure 2.** The effects of Acr and VitC on cell viability (A) and cytotoxicity (B). All data are presented as the means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Significance at \*\*  $p < 0.01$ . (\*) compared with control group, (•) compared with only Acr group.



**Figure 3.** The effects of Acr and VitC on testosterone production. All data are presented as the means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Significance at \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ . (\*) compared with control group, (•) compared with only Acr group.

### Gene expression analysis

Acr (1000  $\mu$ M) and VitC (50  $\mu$ M) were applied to Leydig cells with LH stimulation for 24 h and mRNA levels of steroidogenic genes (*Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1* and *Hsd17b3*) were determined (Figure 4). All results were normalized with the corresponding  $\beta$ -actin expression. In the Acr-treated groups of Leydig cells, a significant decrease in the expression levels of selected genes were observed and the findings were given in Figure 4A, B, C and D ( $p < 0.001$ ). Also, addition of VitC could significantly up-regulate the expression of steroidogenic genes in Acr-exposed Leydig cells ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figure 4.** The mRNA expression levels of *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1* (C) and *Hsd17b3* (D) in Leydig cells. All data are presented as the means  $\pm$  standard error of three independent experiments. Significance at \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ . (\*) compared with control group, (•) compared with only Acr group.

## DISCUSSION

Acrylamide is a naturally occurring toxic substance that has serious detrimental effects on various tissues, including the brain, kidney, liver, testes and epididymis (Ghanayem et al., 2005; Takami et al., 2012). The physiological effects of Acr in many clinical and laboratory studies have been demonstrated and it has been shown that the Acr toxicity in the animal species tested results in infertility (Abdelghaffar et al., 2015; Wang et al., 2019). Studies investigating the effect of Acr on spermatozoa and male infertility, although it has increased in recent years, there is a lack of information about the ways in which it shows its effects on the male reproductive system. The use of natural antioxidants to improve reproduction and development, and to treat the toxicity caused by industrial and nutrient intake has become mandatory. In this study, the pathways by which Acr and VitC changed testosterone biosynthesis in Leydig cells were revealed.

Previous studies have shown that Acr exposure caused significantly decreased cell viability of various cell lines. It was found that Acr significantly reduced cell viability at concentrations of 0.7, 1 and 2 mM in human retinal pigment cell line (Albalawi et al., 2017), at concentrations of 0.5-10 mM in mouse microglia cells (Liu et al., 2015), and at concentrations of 0.25 to 20 mM in rat Leydig cells (Sun et al., 2018). In many *in vivo* studies demonstrating the toxic effects of Acr on the male reproductive system, Leydig cell viability was significantly reduced by Acr administration to various experimental animals (Abdelghaffar et al., 2015; Wang et al., 2019). In some studies, various antioxidants such as VitC (Dortaj et al., 2017), garlic oil (Abdelghaffar et al., 2015), melatonin (Soliman, 2013) and lipoic acid (Lebda et al., 2014) have been used to eliminate the toxic effects of Acr. In this study, Acr significantly reduced Leydig cell viability at a concentration of 1000  $\mu$ M, and results showed similarity with Acr exposed other cell lines. It was also found that VitC may have a protective effect on cell death caused by Acr.

Lactate dehydrogenase (LDH) is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released out of the cell upon damage of the plasma membrane. An increase in the amount of dead or plasma membrane-damaged cells results in an increase of the LDH enzyme activity in the cell. Studies have shown that Acr toxicity leads to cell membrane degradation or death of cells (Chen et al., 2009; Zhang et al., 2013). LDH leakage induced by Acr from damaged cells into the serum has been reported in several *in vivo* and *in vitro* studies (Yousef and El-Demerdash, 2006; Yildizbayrak and Erkan, 2018). In this study, the fact that the applied Acr concentration lead to a significant increase in LDH amounts confirmed the results of other studies. In

addition, VitC reduced the cytotoxicity caused by Acr, thus it was showed that the use of antioxidants in excess of Acr exposure was inevitable.

The cooperation of many functional molecules such as StAR, P450scc, 3 $\beta$ -HSD, CYP17, 17 $\beta$ -HSD and CYP19 is important for testosterone biosynthesis in Leydig cells (Jana ve Samanta, 2006). After stimulation of Leydig cells by LH or cAMP, the StAR carries cholesterol to the internal mitochondrial membrane and is catalyzed by the cholesterol side-chain cleavage enzyme. Pregnenolone is converted to progesterone by the action of 3 $\beta$ -hydroxy dehydrogenase. Progesterone is then converted to androstenedione by the enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase / C17-20 lyase. In the last step, androstenedione forms testosterone by the action of 17 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase (Payne and Youngblood, 1995). There are some studies showing the effect of Acr on testosterone biosynthesis and expression levels of genes involved in steroidogenesis (Camacho et al., 2012; Yildizbayrak and Erkan, 2018). Studies on the effect of Acr on testosterone levels, it has been found to reduce testosterone production at high concentrations (Lebda et al., 2014; Abdelghaffar et al., 2015). In this study, Acr decreased testosterone levels as in other studies. In a study conducted in 2012, it was determined that Acr caused an increase in expression levels of *Star* and *Cyp11a1* genes, and no change in expression levels of *Cyp17a1* and *Hsd3b* genes (Camacho et al., 2012). However, in another study, the finding that Acr induced a significant reduction in steroidogenic gene expression levels in Leydig cells supported the results of this study (Yildizbayrak and Erkan, 2018). Furthermore, this study demonstrated that the decrease in the expression levels of steroidogenic genes by Acr could be improved by VitC, and this proved that VitC was an important antioxidant in Acr toxicity.

## CONCLUSION

In conclusion, Leydig cells responsible for steroidogenesis in the testes were used as a model for the toxicity of Acr on male reproductive system and it was concluded that Acr negatively affected testosterone biosynthesis. The results showed that Acr decreases testosterone levels and suppressed the expression of *Star*, *Hsd3b1*, *Hsd17b3*, *Cyp11a1* genes that play a key role in steroidogenesis in Leydig cells, while VitC could play a protective role in testosterone biosynthesis.

## REFERENCES

- Abdelghaffar S, Omar H, Fiedan I, Ahmed E 2015. Acrylamide induced testicular toxicity in rats: Protective effect of garlic oil. *Reproduction in Domestic Animals*, 50
- Albalawi A, Alhasani RHA, Biswas L, Reilly J, Shu X 2017. Protective effect of carnosic acid against acrylamide-induced toxicity in RPE cells. *Food and Chemical Toxicology*, 108: 543-553.
- Besaratinia A, Pfeifer GP 2007. A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity. *Carcinogenesis*, 28: 519-528.
- Camacho L, Latendresse JR, Muskhelishvili L, Patton R, Bowyer JF, Thomas M, Doerge DR 2012. Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicology Letters*, 211: 135-143.
- Chen JH, Wu KY, Chiu M, Tsou TC, Chou CC 2009. Acrylamide-induced astroglial and apoptotic responses in human astrocytoma cells. *Toxicology in Vitro*, 23: 855-861.
- Dawson EB, Harris WA, Powell LC 1990. Relationship between ascorbic acid and male fertility. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 62: 1-26.
- De Wilde T, De Meulenaer B, Mestdagh F, Govaert Y, Vandeburie S, Ooghe W, Degroot JM 2005. Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6550-6557.
- Dortaj H, Anvari M, Yadegari M, Hosseini Sharifabad M, Abbasi Sarcheshmeh A 2017. Stereological survey of the effect of vitamin C on neonatal rat kidney tissue treated with acrylamide. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1: 42-49.
- Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, Doerge DR 2005. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences*, 88: 311-318.
- Jana K, Samanta PK 2006. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*, 73: 289-300.
- Lebda M, Gad S, Gaafar H 2014. Effects of lipoic acid on acrylamide induced testicular damage. *Materia Socio-Medica*, 26: 208.
- Liu Z, Song G, Zou C, Liu G, Wu W, Yuan T, Liu X 2015. Acrylamide induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in BV-2 microglial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 84: 42-53.
- Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA 1995. Ascorbic acid and fertility. *Biology of Reproduction*, 52: 262-266.

- Mukhopadhyay CK, Chatterjee, IB 1994. Free metal ion-independent oxidative damage of collagen. Protection by ascorbic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 30200-30205.
- Parzefall W 2008. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1360-1364.
- Payne AH, Youngblood GL 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 52: 217-225.
- Rydberg P, Eriksson S, Tareke E, Karlsson P, Ehrenberg L, Törnqvist M 2003. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7012-7018.
- Schmittgen TD, Livak KJ 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature Protocols*, 3: 1101.
- Soliman GZ 2013. Protective effect of *Solanum nigrum*, vitamin C or melatonin on the toxic effect of acrylamide on rats. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5: 47-54.
- Sun J, Li M, Zou F, Bai S, Jiang X, Tian L, Bai W 2018. Protection of cyanidin-3-O-glucoside against acrylamide-and glycidamide-induced reproductive toxicity in leydig cells. *Food and Chemical Toxicology*, 119: 268-274.
- Taeymans D, Wood J, Ashby P, Blank I, Studer A, Stadler RH, Lindblom M 2004. A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44: 323-347.
- Takahashi M, Shibutani M, Inoue K, Fujimoto H, Hirose M, Nishikawa A 2008. Pathological assessment of the nervous and male reproductive systems of rat offspring exposed maternally to acrylamide during the gestation and lactation periods– a preliminary study. *The Journal of Toxicological Sciences*, 33: 11-24.
- Takami S, Imai T, Cho YM, Ogawa K, Hirose M, Nishikawa A 2012. Juvenile rats do not exhibit elevated sensitivity to acrylamide toxicity after oral administration for 12 weeks. *Journal of Applied Toxicology*, 32: 959-967.
- Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4998-5006.
- US EPA, 2010. Toxicological Review of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-07/009F.
- Wang P, Ji R, Ji J, Chen F 2019. Changes of metabolites of acrylamide and glycidamide in acrylamide-exposed rats pretreated with blueberry anthocyanins extract. *Food Chemistry*, 274: 611-619.
- Wu KY, Huang YF, Chen, MF, Shih TS, Uang SN, Mao IF, Chen ML 2010. Exposure assessment of airborne acrylamide for occupationally exposed workers by using an isotope-dilution gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Annals of Occupational Hygiene*, 54: 575-583.
- Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH 2005. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *Journal of Veterinary Science*, 6.
- Yildizbayrak N, Erkan M 2018. Acrylamide disrupts the steroidogenic pathway in Leydig cells: possible mechanism of action. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 100: 235-246.
- Young IS, Woodside JV 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- Yousef MI, El-Demerdash FM 2006. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, 219: 133-141.
- Zhang L, Wang E, Chen F, Yan H, Yuan Y 2013. Potential protective effects of oral administration of allicin on acrylamide-induced toxicity in male mice. *Food & Function*, 4: 1229-1236.

## Effects of arsenite and fluoride on antioxidant capacity and steroidogenesis of Leydig cells

Nebahat Yildizbayrak\*, Melike Erkan

Istanbul University, Faculty of Science, Department of Biology, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: nebahat.yb@gmail.com

### Abstract

Excessive amount of arsenic and fluoride coexist in drinking water and food in many regions of world, which are threat to environment and human health. Previous studies with various animal models have shown that arsenic and fluoride have detrimental effects on the male reproductive system, but the effects of arsenic and fluoride in combination are not fully described. Present study aimed to investigate the sodium arsenite and sodium fluoride induced cellular damage on TM3 Leydig cells by determination of following parameters: cell viability, cell proliferation, amount of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) and steroidogenic enzymes ( $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase). The amount of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase enzymatic antioxidants decreased at arsenite and fluoride exposed Leydig cells for 48 and 72h. Furthermore, arsenite and fluoride exposure caused decrease in  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme activities which are responsible for steroidogenesis.

**Keywords:** Sodium arsenite, Sodium fluoride, Leydig cell, Steroidogenic enzymes, Antioxidant system.

### INTRODUCTION

Arsenic and fluoride are both naturally occurring environmental contaminants and are known to be associated with many diseases and health problems worldwide. In addition to contaminate the drinking water, both of them are widely used in several industries (Chouhan and Flora, 2010). Arsenic commonly used in pesticide production, glass production, pharmaceutical industry, while fluoride used in aluminium processing and manufacturing of dental products (WHO, 2000; El-Demerdash et al., 2009). Fluoride, which is a preservative for bone and dental health when taken at low concentrations, while during long-term exposure it causes a wide range of organ and system damage in the body (Mittal and Flora, 2007). Arsenic is known as multi-organ and system toxicity in humans and animals as it targets enzyme reactions in living systems (Ratnaik, 2003). In addition, arsenic, which belongs to the group 1 carcinogens, threatens community health with the potential for tumour formation (IARC, 2002). Moreover, various animal experiment indicated that arsenic and fluoride have deleterious effects on male reproductive system including decreased sperm quality, suppression of spermatogenesis, variation in testicular organ weights and histopathological changes on reproductive tissues (Bashandy et al., 2016; Zhang et al., 2013).

There has been increasing evidence that separately arsenic and fluoride exposure is associated with oxidative stress and generation of reactive oxygen species. Against to environmental toxicants, in cellular defence system antioxidants play an important role and have the ability to suppressing and scavenging the free radicals. In male reproductive system fluoride mediated oxidative stress caused necrosis of seminiferous tubules and suppressed antioxidant capacity (Zhang et al., 2013). On the other hand, arsenic binds to the thiol groups of the functional proteins in the cells and leading to the deterioration of the intracellular prooxidant/oxidant balance (Ratnaik, 2003). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) are three major enzymatic antioxidants that protect cells from oxidative damage impressed by arsenic and fluoride toxicity (Sun et al., 2018).

Reproductive system contains various specialized cells. Testosterone hormone is critical for the maintenance of spermatogenesis in the gonads which are responsible for the production and release of sex hormones. Leydig cells, as interstitial cells of testes, are found adjacent to the seminiferous tubules and contribute the major function on testosterone production (Payne and Youngblood, 1995). Recent studies have shown that arsenic and fluoride separately have adverse effects on steroidogenesis (Yilmaz et al., 2018; Yu et al., 2018a).

In addition to all these effects on male reproductive system, there are restricted studies examining the combined effect of arsenic and fluoride. Therefore, in this study, the combined and individual effects of sodium arsenite and sodium fluoride on Leydig cells, their effects on the antioxidant system and on steroidogenic enzyme were aimed to be revealed.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals, Cell Culture and Treatment

All chemicals used in biochemical experiments were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (St. Louis, MO). For cell culture treatments Ham's F12 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (1:1) mixture (DMEM/F12, including 1.2 g/l sodium bicarbonate, 15 mM HEPES, 2.5 mM L-Glutamine, 0.5 mM sodium pyruvate), Horse serum (HS) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Wisent Bioproducts (St-Bruno, Quebec, Canada). TM3 Leydig non-tumorigenic cell line was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, USA). Cells were cultured in 1:1 DMEM and Ham's F12 medium with 5% HS, 2.5% FBS and 1% antibiotics, 5% CO<sub>2</sub>, at a temperature of 37°C with 95% humidity. TM3 Leydig cells were treated with 10 different concentrations of sodium arsenite in the range of 0-2000 ppb and sodium fluoride in the range of 0-100 ppm for 48 and 72h. According to the results of this preliminary study, as a result of 48 and 72 hours treatments, concentrations which decreased the cell viability up to to 80% were selected for both substances. The experimental groups were determined to be control (culture medium), 16 ppm sodium fluoride (NaF), 50 ppb sodium arsenite (As) and 16ppm NaF + 50ppb As.

### Cell Viability Assay and Cellular Proliferation

TM3 Leydig cells were plated on 96-well culture plates with 5000 cells for each well then, the plates were incubated at 37°C with CO<sub>2</sub> for 48 h and 72 h with experimental groups. Following treatment cell viability was evaluated using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and cell proliferation was analyzed with a 5-bromo-20-desoxyuridine (BrdU) kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) as described by the manufacturers. The optical density of the each well was measured at 540 nm for MTT assay and 450 nm for BrdU assay with an ELISA Reader.

### Cell Preparation for Biochemical Assays

TM3 Leydig cells were seeded on 6-well culture plates with 1x10<sup>6</sup> cells for each well, following treatment for 48 and 72 h cells were harvested for cell lysate preparation. Harvested cells transfer in to ice cold tris-HCl buffer (pH:7.2). After cells were sonicated using an ultrasonicator for 10 s with 10s intervals for three times. Homogenate was centrifuged at 1500 g for antioxidant enzymes and 16000 g for steroidogenic enzymes for 10 minutes at 4°C. Supernatants were used for biochemical evaluation of enzymes.

### Antioxidant Enzyme Assays

The superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to the method of Marklund and Marklund (1974). Principle of assay based on pyrogallol auto oxidation by superoxide radicals. The reaction mixture was containing 0.05 ml cell extract, 1.4 ml Tris-HCl buffer (pH 8.2) and 0.05 ml of 2 mM pyrogallol. the increase in the absorbance was inhibited by presence of SOD. The change in the absorbance was measured at 420 nm against blank for 3 min at 30 s intervals in a spectrophotometer.

The catalase (CAT) activity was determined as described by the method of Sinha (1972). The reaction is based on the reduction of dichromate in acetic acid to chromic acetate by heating in the presence of hydrogen peroxide. The assay mixture contained 0.4 ml of 0.2 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.5 ml sodium phosphate buffer with 0.1 ml cell extract. After reaction started, 2 ml dichromate-acetic acid reagent was added to arrest the reaction. Then, tubes were heated for 10 min and allowed to cool. After incubation period tubes allowed to cool while green color development was seen, and the chromic acetate was measured colorimetrically at 570 nm with a spectrophotometer.

The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the method of Hafeman et al., 1974. The reaction mixture was containing 0.5 mL sodium phosphate buffer (0.4 M, pH 7.2), 0.5 mL of 4M reduced glutathione, 0.25 mL of 10 mM sodium azide, 0.6 mL distilled water and 0.15 mL cell extract. After 5 minutes incubation period at 37°C, 0.5 ml of 1.25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added and incubated at 37°C for 3 min. The reaction was stopped by the addition of 1 ml 10% TCA after tubes were centrifuged and the supernatant removed. 4 ml of 0.3 M disodium hydrogen phosphate solution and 1 ml of the dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) reagent were added and experimental groups and standard were read spectrophotometrically against blank containing only phosphate solution and DTNB reagent at 412 nm.

### Steroidogenic Enzyme Assays

3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) enzyme activity was performed according to the method of Bergmeyer (1974). The experimental principle is based on the fact that the 3 $\beta$ -HSD enzyme converts androsterone and NAD<sup>+</sup> to 5 $\alpha$ -androstone-3,17-dion and NADH. The reaction mixture was containing 0.6 mL pyrophosphate buffer (100 M, pH 8.5), 0.2 mL NAD (0.5 M), 0.1 mL dehydroisoandrosterone (0.1 M) and 0.2 mL cell extract. The absorbance change in the sample and blank tubes was read in the spectrophotometer at 340 nm for 20 minutes in 5-minute intervals.

17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) enzyme activity was performed according to the method of Bergmeyer (1974). The experiment is based on the principle of absorbance at 340 nm wavelength of NADP resulting from the conversion of 17 $\beta$ -HSD enzyme into 1,4-Androstero-3,17-dione and NADPH to testosterone and NADP. The reaction mixture contained 0.6 mL pyrophosphate buffer (100 M, pH 8.5), 0.2 mL NADPH (0.5 M), 0.1 mL 1,4-androstadiene-3,17-dione (0.8 mM) and 0.2 mL cell extract. The absorbance change in the sample and blank tubes is read in the spectrophotometer at 340 nm for 20 minutes in 5-minute intervals.

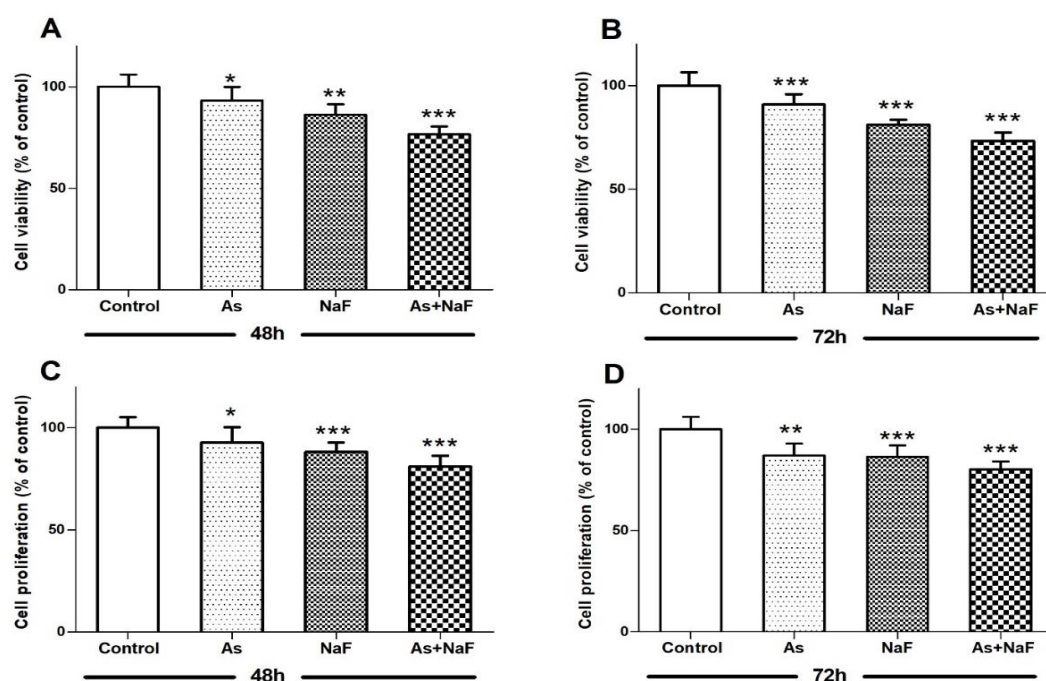
### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test was used for comparisons between groups. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error. Data distribution was tested for normality using the Shapiro – Wilk test, and values of  $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### Effects of Sodium Arsenite and/or Fluoride on Cell Viability and Cellular Proliferation

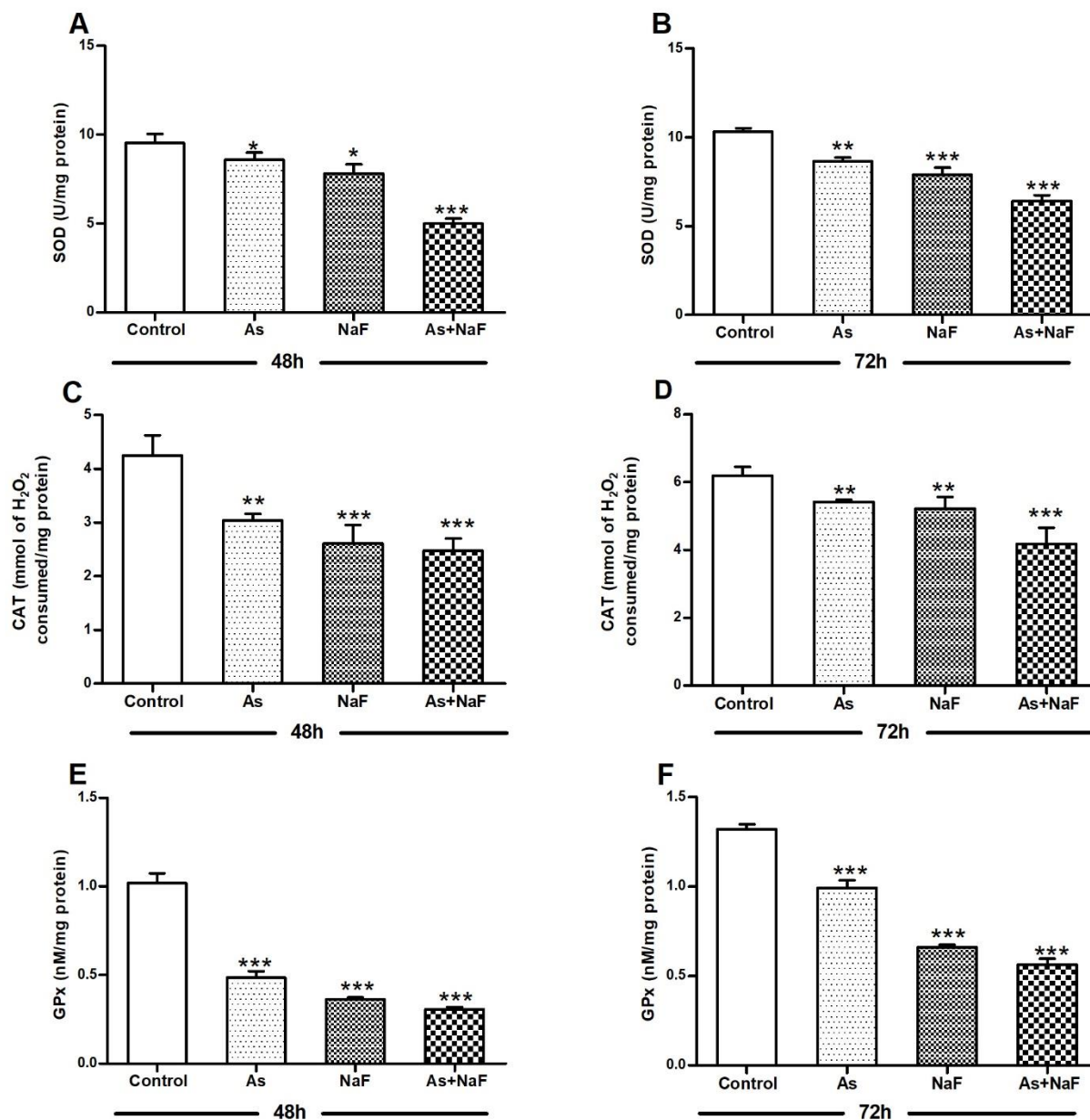
Figure 1 shows the alone and the combined effects of sodium arsenite and sodium fluoride on TM3 Leydig cells viability and proliferation. As a result of both 48-hour and 72-hour exposure, cell viability and proliferation were significantly reduced compared to control in all experimental groups ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figure 6.** Effects of sodium arsenite and/or fluoride on cell viability and cellular proliferation. Each bar denotes mean  $\pm$  SEM of five independent experiments carried out in triplicates. Significance at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with controls for 48 and 72 h.

### Effects of Sodium Arsenite and/or Fluoride on Antioxidant Enzymes

Cellular levels of antioxidant enzymes at experimental groups were presented in Figure 2. SOD (Figure 2A, B), CAT (Figure 2C, D) and GPX (Figure 2E, F) activities significantly decreased in all experimental groups at both exposure time ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ).

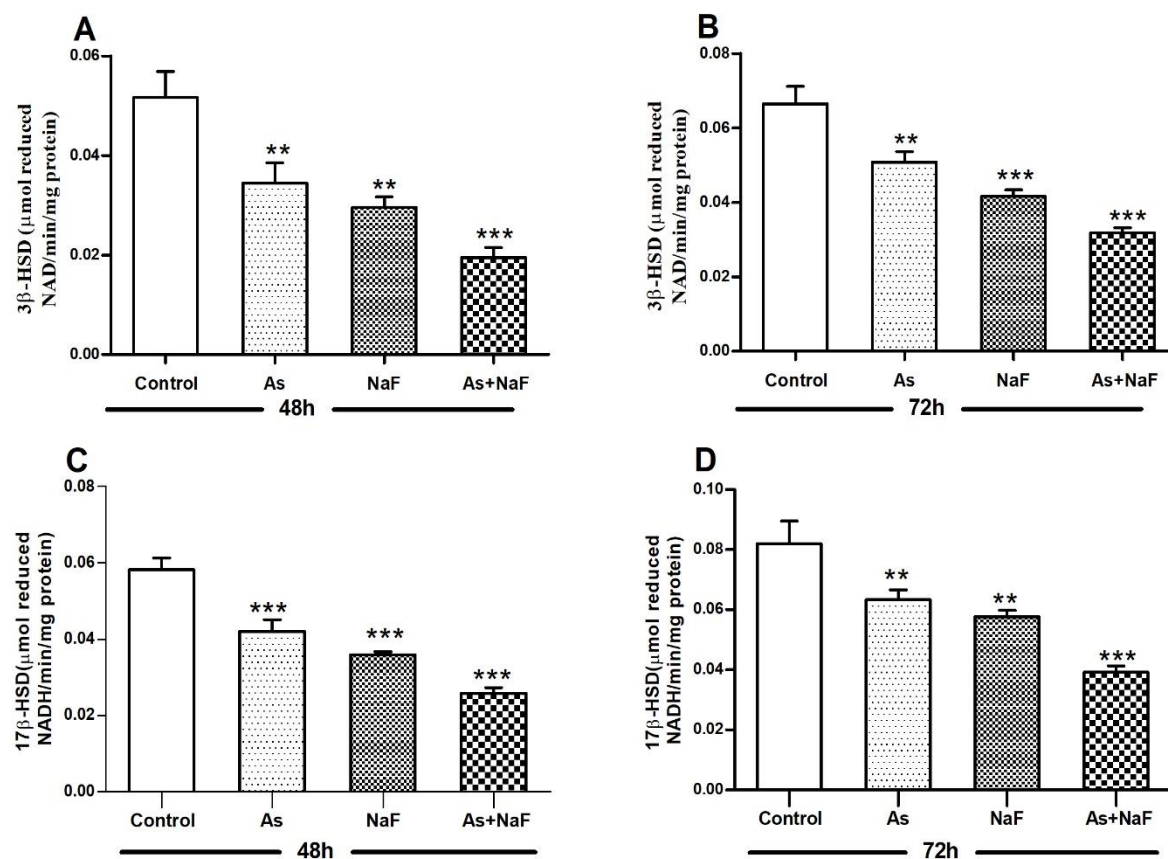


**Figure 2.** Effects of sodium arsenite and/or fluoride on enzymatic antioxidants Each bar denotes mean ± SEM of five independent experiments carried out in triplicates. Significance at \*p<0.05, \*\*p<0.01, and \*\*\*p<0.001 compared with controls for 48 and 72 h.

### Effects of Sodium Arsenite and/or Fluoride on Steroidogenic Enzyme

Steroidogenic enzyme activities demonstrated in Figure 3. Cellular levels of 3β-HSD (Figure 3A, B) and 17β-HSD (Figure 3C, D) significantly decreased compared to control in As, NaF and combined groups after 48 and 72 h exposure (p<0.01, p<0.001).





**Figure 3.** Effects of sodium arsenite and/or fluoride on steroidogenic enzymes. Each bar denotes mean  $\pm$  SEM of five independent experiments carried out in triplicates. Significance at \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with controls for 48 and 72 h.

## DISCUSSION

The present study was conducted to determine the cytotoxicity, antioxidant capacity and steroidogenic activity in the TM3 Leydig cells after exposure to sodium arsenite and sodium fluoride, independently or in combination. As environmental pollutants, different arsenic and fluoride species caused harmful effects such as apoptosis, oxidative damage on the male reproductive system and induced changes in testicular histomorphometry (Souza et al., 2016; Orta Yilmaz et al., 2018).

Recent studies which of them evaluated the effect of arsenic and fluoride on cell viability indicated that inorganic arsenic and fluoride decreased viability of cultured human umbilical vein endothelial cells, neural progenitor cells and Leydig cells (Ma et al., 2017; Rocha et al., 2011; Orta Yilmaz et al., 2018; Aydin, 2017). On the male reproductive system sodium fluoride and sodium arsenite separately decreased the sperm count of guinea pigs (Dong et al., 2016) and male rats (Bashandy et al., 2016). Studies conducted with Leydig cells isolated from 5, 10, 20 mg/L sodium fluoride treated mice showed dramatically inhibited cell proliferation after 24, 48 and 72 h exposure (Yu et al., 2018b, Li et al., 2018; Hua Song et al., 2014). Furthermore, according to Souza et al. (2016) 56 day 0.01-10mg/L sodium arsenite and arsenate exposure decreased the Leydig cell volume on male rats. According to the results of present study, arsenic and fluoride decreased the cell viability and proliferation in Leydig cells in 48 and 72 hours as in previous studies. In addition, they showed more toxic effect in the group they were applied together. (Figure 1).

Previous research established that both of arsenic and fluoride induced male reproductive toxicity via oxidative stress (Feng et al., 2015; Souza et al., 2016). In order to tolerate oxidative stress caused by factors such as environmental contaminants, cells activate their intracellular antioxidant defence systems. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants maintain the oxidant/prooxidant balance. SOD, CAT and GPx are the main enzymatic antioxidants that playing critical role to eliminate the oxidative stress. Measurement of antioxidant enzymes is important for understanding the mechanism of toxicity of substances. Significant reductions in SOD, CAT and glutathione-s-transferase enzyme activities in brain, kidney and lung tissues were reported in

rats exposed to 5 mg/kg sodium arsenite for 30 days (El-Demerdash et al., 2009). In a study with male mice received 50 mg/L sodium meta arsenite and sodium fluoride, SOD activity was decreased in liver tissues in groups with arsenic and fluoride administered together and separately, while CAT and GPx levels did not change (Mittal and Flora, 2007). Studies conducted with testis and epididymis tissue indicated that SOD and CAT activities were significantly reduced after fluoride exposure (Sun et al., 2018; Feng et al., 2015). In another study examining the effects of arsenic compounds, male rats received 0.01 and 10 mg/L sodium arsenite and arsenate for 56 days, while SOD activity did not change CAT activity was significantly decreased. In addition, it has been reported that the damage in the groups treated with sodium arsenite was higher than the groups received arsenate (Souza et al., 2016). According to the results of this *in vitro* study, sodium arsenite and arsenic caused significant decreases in the amount of SOD, CAT and GPx in Leydig cells in all experimental periods. For all antioxidant enzyme parameters, higher toxic effect was observed in co-exposure groups. These results were parallel with the previous reports indicated that arsenic and fluoride caused detrimental effects on antioxidant system.

Leydig cells are the only cells responsible to produce testosterone in the male reproductive system. After luteinizing hormone is bind to its receptor on the cell membrane, Leydig cells undergo a multi-step enzymatic process for performing testosterone conversion from cholesterol. Cholesterol side chain cleavage enzyme, 3 $\beta$ -HSD and 17  $\beta$ -HSD enzymes are essential for Leydig cell steroidogenesis. The 3 $\beta$ -HSD enzyme catalyses the conversion of pregnenolone to progesterone. At the last step of steroidogenesis, 17 $\beta$ -HSD enzyme provides the formation of testosterone from androstenedione (Payne and Youngblood, 1995). Studies in female and male reproductive systems have shown that arsenic and fluoride affect steroidogenesis, leading to a decrease in steroid hormone levels, resulting in disruption of 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD activity levels (Yu et al., 2018a, Yu et al., 2018b). In an *in vivo* study, sodium fluoride (20 mg / kg) administered for 29 days decreased 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD enzyme activities, and significantly reduced plasma testosterone levels (Ghosh et al., 2002). In a study conducted with Leydig cells treated 0.1, 1, 10 and 100 mg/L sodium fluoride for 24 hours, the expression levels of 3 $\beta$ -HSD was reduced by 0.1 mg/L fluoride, and the concentration of 17 $\beta$ -HSD was significantly decreased from the 1 mg/L fluoride concentration (Yilmaz et al., 2018) In another study, the expression levels of 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD were decreased in Leydig cells exposed to 5, 20 mg/L sodium fluoride 24 and 48 hours (Yu et al. 2018b). Male rats exposed to 0.5 mg/kg arsenic trioxide and 5 mg/kg sodium fluoride for 30 days were reported to have a decrease in the activities of 17 $\beta$ -HSD and 3 $\beta$ -HSD at testis tissue of groups exposed to arsenic alone and co-exposure with fluoride (Chinoy et al., 2004). In parallel with the above studies, in this *in vitro* study, both 3 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD enzymes were decreased in all groups after 48 and 72 hours exposure.

## CONCLUSION

In this study, TM3 Leydig cells were used as an *in vitro* model in order to reveal the effects of sodium arsenite and sodium fluoride in the male reproductive system. Sodium arsenite and sodium fluoride have been found to cause significant damage to the antioxidant defense system and steroidogenic capacity of Leydig cells even at concentrations decreased the cell viability up to 80%. This study has completed the lack of literature investigating the combined effects of sodium arsenite and sodium fluoride on the male reproductive system and has been a pioneer for future molecular studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (Project Number: 3884).

## REFERENCES

- Aydin Y 2017. Exposure to sodium fluoride via drinking water cause cytotoxicity and oxidative damage in Leydig cells. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18: 115-122
- Bashandy SA, El Awdan SA, Ebaid H, Alhazza IM 2016. Antioxidant potential of *Spirulina platensis* mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016
- Bergmeyer MU 1974. Steroid Dehydrogenases. In: M. U. Bergmeyer (eds), *In methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. pp:476–477.
- Chinoy NJ, Tewari K, Jhala DD 2004. Fluoride and/or arsenic toxicity in mice testis with formation of giant cells and subsequent recovery by some antidotes. *Fluoride*, 37: 172-184.
- Dong C, Cao J, Cao C, Han Y, Wu S, Wang S, Wang J 2016. Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in guinea pigs' testis. *Chemosphere*, 147: 345-351.

- El-Demerdash, Fatma M., Mokhtar I. Yousef, Fatma ME Radwan 2009. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 249-254.
- Feng D, Huang H, Yang Y, Yan T, Jin Y, Cheng X, Cui L 2015. Ameliorative effects of N-acetylcysteine on fluoride-induced oxidative stress and DNA damage in male rats' testis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 792: 35-45.
- Ghosh D, Das S, Maiti R, Jana D, Das UB 2002. Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive toxicology*, 16: 385-390.
- Hafeman, DG, Sunde RA, Hoekstra WG 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *The Journal of Nutrition*, 104: 580-587.
- Hua Song G, Wang RL, Chen ZY, Zhang B, Wang HL, Liu ML, Yan XY 2014. Toxic effects of sodium fluoride on cell proliferation and apoptosis of Leydig cells from young mice. *Journal of physiology and biochemistry*, 70: 761-768.
- IARC, 2002. International agency for research on cancer IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 96:1-390.
- Li J, Shi Y, Fan H, Li Y, Zhu Y, Lin X, Zhang J 2018. Effects of fluoride on surface structure of primary culture Leydig cells in mouse. *Biological trace element research*, 183: 123-127.
- Ma Y, Ma Z, Yin S, Yan X, Wang J 2017. Arsenic and fluoride induce apoptosis, inflammation and oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chemosphere*, 167: 454-461.
- Marklund S, Marklund G 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47: 469-474
- Mittal M, Flora SJS 2007. Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug and chemical toxicology*, 30: 263-281.
- Orta Yilmaz B, Yildizbayrak N, Erkan M 2018. Sodium arsenite-induced detriment of cell function in Leydig and Sertoli cells: the potential relation of oxidative damage and antioxidant defense system. *Drug and chemical toxicology*, 1-9.
- Payne AH, Youngblood GL 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction* 52: 217-225.
- Ratnaike RN 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medicine Journal* 79:391-396
- Rocha RA, Gimeno-Alcaniz JV, Martin-Ibanez R, Canals JM, Velez D, Devesa V 2011. Arsenic and fluoride induce neural progenitor cell apoptosis. *Toxicology Letters*, 203: 237-244.
- Chouhan S, Flora SJ 2010 Arsenic and fluoride: two major ground water pollutants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48: 666-678.
- Sinha AK, 1972. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47: 389-394.
- Souza ACF, Marchesi SC, de Almeida Lima GD, Ferraz, RP, Santos FC, da Matta SLP, Machado-Neves M 2016. Effects of sodium arsenite and arsenate in testicular histomorphometry and antioxidants enzymes activities in rats. *Biological Trace Element Research*, 171: 354-362.
- Sun Z, Li S, Guo Z, Li R, Wang J, Niu R, Wang J 2018. Effects of Fluoride on SOD and CAT in Testis and Epididymis of Mice. *Biological Trace Element Research*, 184: 148-153.
- WHO, 2000. Regional Office for Europe, Air Quality Guidelines, Second Edition, Chapter 6.5 Fluorides, Denmark.
- Yilmaz BO, Korkut A, Erkan M 2018. Sodium fluoride disrupts testosterone biosynthesis by affecting the steroidogenic pathway in TM3 Leydig cells. *Chemosphere*, 212: 447-455.
- Yu H, Kuang M, Wang Y, Rodeni S, Wei Q, Wang W, Mao D 2018a. Sodium Arsenite Injection Induces Ovarian Oxidative Stress and Affects Steroidogenesis in Rats. *Biological Trace Element Research*, 1-8.
- Yu Y, Han Y, Niu R, Wang J, Manthari RK, Ommati MM, Sun Z 2018b. Ameliorative effect of VE, IGF-I, and hCG on the fluoride-induced testosterone release suppression in mice leydig cells. *Biological Trace Element Research*, 181: 95-103.
- Zhang S, Jiang C, Liu H, Guan Z, Zeng Q, Zhang C, Lei R, Xia T, Gao H, Yang L, Chen Y, Wu X, Zhang X, Cui Y, Yu L, Wang Z, Wang A 2013. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Toxicology and Applied Pharmacology* 271: 206-215

## Elmalarda boscalid ve acetamiprid pestisit kalıntılarının izlenmesi

Serap Ustaoglu<sup>1,2\*</sup>, Şükrü Karataş<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>T.C.Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Aydın Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:serapmakili@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada; elma meyvelerine uygulanan boscalid ve acetamiprid pestisitlerinin kalıntılarının miktarlarındaki değişimin yedi ay boyunca izlenmesi ve Hoskins formülü kullanılarak yarılanma ömürlerinin (DT<sub>50</sub>) hesaplanması amaçlanmıştır. Ayrıca elma kabuklarının soyulmasından sonra elmalardaki boscalid ve acetamiprid'in kalıntılarındaki miktarsal değişimler izlenmiştir. Elmada boscalid ve acetamiprid kalıntı miktarlarındaki azalma %'leri incelendiğinde; bir ay sonrasında sırasıyla % 47.10 ve % 59.37 azaldığı, ayrıca pestisitlerin yedi ay boyunca degradasyonları incelendiğinde; boscalid 5 ay sonrasında LOQ (0.01 ppm) seviyesi altına düşerken, acetamiprid'in 2 ay sonrasında LOQ (0.01 ppm) seviyesi altına düştüğü belirlendi. Hoskins formülü ile kabuklu elmalarda boscalid'in yarılanma ömrü 39 gün, acetamiprid'in ise 23 gün olduğu belirlenirken, soyulmuş elmalarda ise sırasıyla, 64 gün ve 25.91 gün olduğu görüldü. Soyulmuş elmadaki boscalid ve acetamiprid'in kalıntılarının miktarı kabukluya göre sırasıyla, % 65.28 ve % 9.37 azaldığı görüldü. Analizler için LC-MS/MS (Agilent 6460 Triple Quad) cihazı ve QuEChERS (AOAC 2007.01) çoklu kalıntı ekstraksiyon metodu kullanılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Elma, Boscalid, Acetamiprid, Yarılanma ömrü, QuEChERS, LC-MS/MS.

### Monitoring of residues of boscalid and acetamiprid pesticides in apples

#### Abstract

In this research, the observation of change in the amounts of boscalid and acetamiprid pesticide residues applied on apple fruits, and the calculation of half life using Hoskins formula have been aimed. Additionally, after peeling the apple skin, the quantitative change of the boscalid and acetamiprid residue on the apples have also been observed. On examining the decrease percentage of the boscalid and acetamiprid residue amount on apples, it's realized that one month later the residue amount has decreased to 47,10% and 59,37% relatively. Likewise, with the observation of pesticide degradation for seven months, it's seen that after 5 months boscalid has degraded under LOQ (0,01ppm) levels, whereas acetamiprid has fallen under LOQ (0,01ppm) level at the end of the second month. With the Hoskins formula, the half life of boscalid on skinned apple has been detected as 39 days with acetamiprid as 23 days while on the peeled apples they are observed as 64 days and 25,91 days respectively. The boscalid and acetamiprid residue amount on peeled apples in comparison with skinned apples has been observed to decrease 65,28% and 9,37% respectively. LC-MS/MS (Agilent 6460 Triple Quad) system and QuEChERS (AOAC 2007.01) multiple residue extraction method have been utilized for the analyses.

**Keywords:** Apple, Boscalid, Acetamiprid, Half Life, QuEChERS, LC-MS/MS.

### GİRİŞ

Elmanın içerdiği mineraller ve vitaminler bakımından zengin olması nedeniyle beslenmedeki önemi büyüktür (Sauphanor ve diğ., 2009). İngiltere'de yapılan bir araştırmada, elmanın kanser hastalığını geciktirme etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da elmanın insana sağladığı katkılara bir diğer örnektir (Şentürk, 2012). Bu kapsamda sürekli tüketilmesi uzmanlar tarafından tavsiye edilmektedir. Elma, dünyada yaygın alanlar gösteren ve farklı iklim bölgelerinde üretim yapılabilir bir üründür. Anavatani, Anadolu'yu da içine alan Güney Kafkaslardır. Niğde ili elma üretiminde üçüncü fakat kaliteli elma üretiminde iklimin etkisiyle Türkiye'de birinci olduğu belirtilmektedir. Elmanın üretim miktarları açısından sırasıyla Çin (44.447.793 ton), ABD (4.649.323 ton), Polonya (3.604.271 ton) ve Türkiye (2.925.828 ton) takip etmektedir (FAOSTAT, 2016).

Latince zararlı anlamına gelen "pest" ile öldüren anlamına gelen "cide" kelimelerinin birleşmesiyle olan pesticide (pestisit), istenmeyen böcek, kemirgen, mikroorganizma, küf gibi zararlıların, yabancı ot veya hastalıkların önlenmesi için kullanılan kimyasal maddelere verilen genel isimdir. Tarım ürünlerinde zararlılara karşı kullanılan mekaniksel, fiziksel, biyolojik, kültürel mücadele gibi bir çok mücadele yöntemi vardır. Fakat

bunların yerine etkinin kısa sürede olması ve kullanım kolaylığı açısından en çok bir kimyasal mücadele olan pestisitler tercih edilmektedir (Tiryaki, 2010). Birçok pestisit elmaların üretimi, depolanması ve taşınmasındaki olumsuzlukları engellemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Rawn ve diğ., 2008). 2017 yılında AB ülkelerine gönderilen standartlara uygun olmayan gıdaların, Gıda ve Yemlerde Hızlı Alarm Sistemi (RASFF)'nin ilk 10 bildirimini ülke bazlı sıralaması Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** 2017 yılı içerisinde en fazla bildirim yapılan zararlar (RASFF, 2017).

Zarar	Ürün Katagorisi	Ülke	Bildirim (Adet)
Salmonella	Kümes hayvanları eti ve ürünleri	Brezilya	320
Pestisit Kalıntıları	Meyve ve sebzeler	Türkiye	83
Aflatoksinler	Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar	Çin	81
Civa	Balık ve balık ürünleri	İspanya	80
Bileşen	Diyet gıdaları, gıda takviyeleri	ABD	77
Aflatoksin	Meyve ve sebzeler	Türkiye	70
Fipronil (Pestisit)	Yumurta ve yumurta ürünleri	İtalya	66
Aflatoksin	Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar	Türkiye	65
Aflatoksin	Fındık, fındık ürünleri ve tohumlar	İran	50
Salmonella	Kümes hayvanları eti ve ürünleri	Polonya	50

Tablo 1'e göre Türkiye meyve ve sebze de pestisit kalıntısı ile en çok bildirim yapıldığı 2. sırada yer almaktadır. İstatistiklere göre Türkiye'deki pestisit kullanımı dünyadaki kullanımdan düşük olduğu yorumlansa da 2017 yılı RASFF'nin raporu ülke olarak pestisit kalıntılarında ciddi bir şekilde önem verilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Pestisitlerin üründe kalıntı olarak kalması veya çevreye karışması o pestisit kimyasal ve fiziksel özellikleri etkilemektedir.

Pestisitlerin üründe veya çevrede davranışlarını etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- ✓ Çözünürlük, (S)
- ✓ Buhar basınçları (Pvp)
- ✓ Dipol durumu (Polarite)
- ✓ Organik karbon adsorpsiyon katsayısı (Koc/Kd)
- ✓ Reaksiyon sabiti
- ✓ pH
- ✓ Yarılma Ömürleri (DT<sub>50</sub>)
- ✓ Aktivasyon Enerjisi (E)
- ✓ Oktanol/su partitasyon katsayısı (Kow)
- ✓ Biyokonsantrasyon faktörü (BCF),
- ✓ Molekül ağırlığı
- ✓ Toprakta tutunma katsayısı (Kd)
- ✓ Çevrenin sıcaklık ve nemi
- ✓ Adsorpsiyon ve absorpsiyon

#### **Yarılma Ömrü (DT<sub>50</sub> veya t<sub>1/2</sub>):**

Bir maddenin konsantrasyonunun yarı konsantrasyonuna bozunması için geçen süreye denir. Pestisitler için bu ifade, ürüne pestisit uygulandıktan sonra başlangıç konsantrasyonu ile yarılacağı konsantrasyona kadar bozunduğu süredir.

Pestisitlerin dağılım modeli birinci derece kinetiklerine uygun olarak reaksiyon sabiti Denklem 1 ile hesaplandı.

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Pestisitlerin yarılma ömrü ise Hoskins (1961) formülü (Denklem 2) ile hesaplandı.

$$DT_{50} = \ln 2/k \quad (2)$$

Denkleme göre; C<sub>t</sub> t süre sonunda pestisit konsantrasyonu ( mg/kg), C<sub>0</sub> pestisit başlangıç konsantrasyonu (mg/kg), t zaman (gün), k reaksiyon hız sabiti (gün<sup>-1</sup>) ve DT<sub>50</sub> yarılma ömrü ( gün) ifade etmektedir.

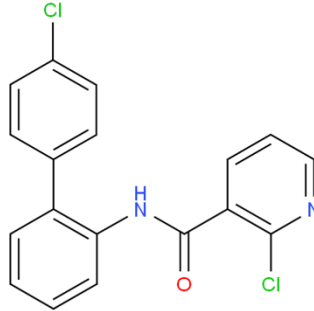
## Pestisit Kalıntılarını Azaltma Yöntemleri-Soyma

Bilim adamları ve gıda işletmecileri gıdanın işlenmesi sırasında pestisit kalıntılarını azaltmak için uzan zamandır çalışmaktadırlar (Xia Tao, ve diğ., 2016). Meyve ve sebzelerin ticari veya ev tipi çalışmalarda kullanılan pestisit azaltma teknikleri; yıkama, ağartma, soyma, püre yapma, pişirme, kızartma, kızartma ve kaynatma işlemlerini içermektedir (Keitkotlhaile ve diğ., 2010).

Bu proseslerden soymanın pestisit kalıntı miktarını azaltmada çok önemli bir teknik olduğu vurgulanmıştır. Soyma, pestisit kalıntılarını azaltmada yıkamadan sonra en çok kullanılan önemli bir tekniktir. İnsektisit veya fungusitlerin büyük bir bölümü ürünün kutikula tabakasının altına hareketi veya penetrasyonu sınırlıdır (Kaushik ve ark., 2009). Rasmussen ve arkadaşları (2003), soyma ve suyunu sıkma tekniklerinin elmada pestisit kalıntılarını azaltmak için çok etkili uygulamalar olduğunu belirtmişlerdir.

### İncelenen Pestisitler ile İlgili Genel Bilgiler

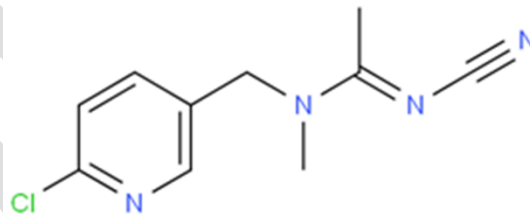
#### Boscalid (Fungisit)



Şekil 1. Boscalid kimyasal yapısı (Pubchem Kütüphanesi).

- **IUPAC ismi;** 2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide,
- Boscalid pyridinekarboksamidlerin kimyasal sınıfına ait olan yağda çözünür bir fungusittir.
- **Molekül ağırlığı**=343.2, **Molekül formülü**= C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>2</sub>O,
- **Kararlılığı;** pH 4, 5, 7 ve 9' da hidrolize kararlı,
- **Biyokimyası;** mitokondriyal elektron taşıma zincirine etki etmekte,
- **Etki çeşidi;** yaprak fungusiti, bitki yaprağında önleyici ve iyileştirici etki sağlar,
- Toprakta orta düzeyde bozunma davranışı göstermektedir.

#### Acetamiprid (İnsektisit)



Şekil 2. Acetamiprid kimyasal yapısı (Pubchem Kütüphanesi).

- **IUPAC ismi;** (E)-N1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N2-cyano-N1-methylacetamide,
- Neonicotinoid grubundadır,
- **Molekül ağırlığı**=222.7, **Molekül formülü**= C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>4</sub>,
- **Kararlılığı;** pH 4,5,7 'de tamponlanmış çözeltilerde kararlı, pH 9 ve 45°C'de yavaşça bozunmaktadır,
- **Biyokimyası;** böceğin merkezi sinir sistemindeki sinapslara etki etmektedir (EFSA Journal 2010;8(11):1898),
- **Etki çeşidi;** yaprak dokusuna nüfus eden aktiviteye sahip, temas ile mideye etkili sistemik insektisittir (Esentürk, 2009).
- Toprakta yüksek derecede taşınır özellikle olduğu için ortamda kalıcı olması beklenmez.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda Niğde bölgesinde elma üretimi yapan Göknur Gıda Maddeleri İthalat İhracat Tic. ve San. A.Ş.'nin pestisitlerin elmalara uygulanması hususunda destek alındı. Elmalar Haziran ayından Aralık ayı da dahil olmak üzere yedi ay boyunca elma bahçelerinden konunun uzmanlarınca toplanmıştır. Pestisit analizi 2 şekilde yapıldı:

a)Kabuklu olarak,

b) Soyma işlemi uygulanarak (soyucu ile 0,1 cm kalınlığındaki kabuk uzaklaştırılmıştır).



Şekil 3: Toplanan elma numuneleri

Analizde QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) ekstraksiyon metodu (AOAC Resmi Metodu, 2007.01) kullanıldı.

LC-MS/MS (Agilent 6460 Triple Quadropole) cihazı ile analizler yapıldı (Şekil 4).



Şekil 4: LCMS/MS (Agilent, 6460)

## BULGULAR

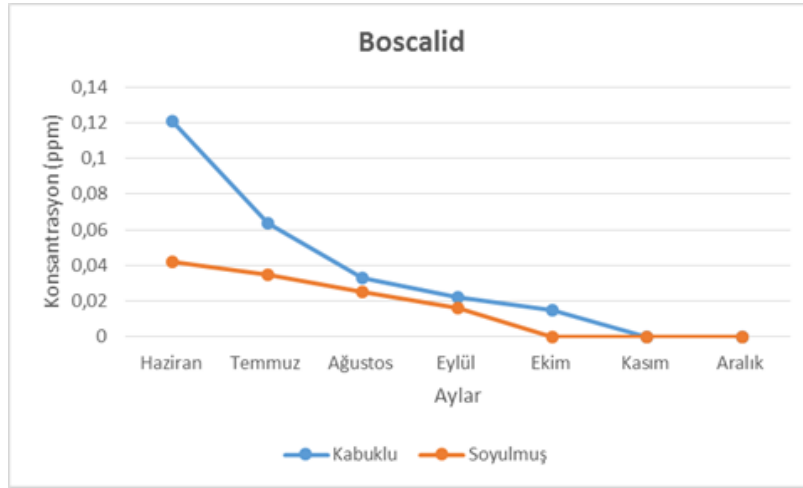
### *Pestisit Kalıntı Miktarının Soyma İşlemi ve Zaman ile Değişimi*

#### *Boscalid*

Elma numunelerinde boscalid kalıntısı Haziran ayında elma soyulduktan sonra % 65.28 azaldı (0,121 ppm'den 0,042 ppm'e). Bir ay sonra analiz için alınan elma ve boscalid kalıntısı % 47,10 oranında azaldı (0,121 ppm'den 0,064 ppm'e). Ve diğer aylar da tespit edilemeyen seviyeye kadar azalmaya devam ettiği görüldü (Şekil 5). Kabuklu elmada uygulama sonrası LOQ seviyesi altına 5 ay sonra düşerken soyulmuş elmada 4 ay sonra düştüğü bulundu.

<b>Boscalid</b>	<b>Kabuklu iken Konsantrasyon (ppm)</b>	<b>Kabuksuz Konsantrasyon (0,1 cm soyma) (ppm)</b>
Haziran (22 °C)	0,121	0,042
Temmuz (27 °C)	0,064	0,035
Ağustos (32 °C)	0,033	0,025
Eylül (29 °C)	0,022	0,016
Ekim (20 °C)	0,015	T.E.D.B.
Kasım (15 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.
Aralık (9 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.

Şekil 5. Boscalid konsantrasyon değişimi



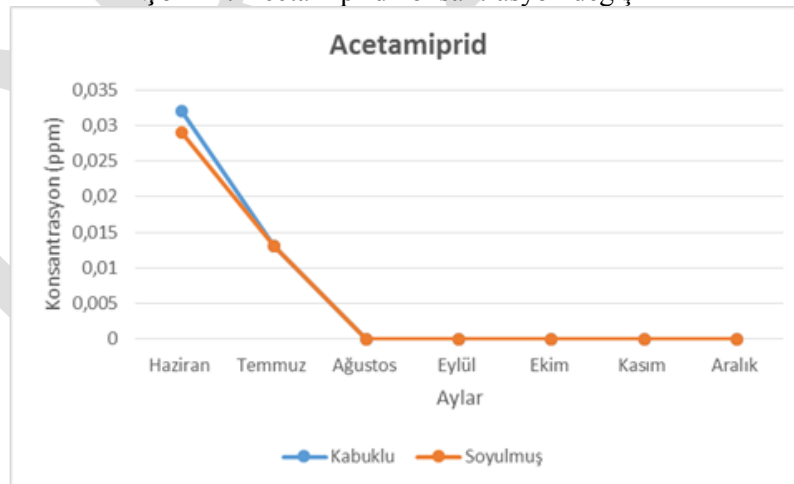
Şekil 6. Boscalid degradasyon eğrisi

#### Acetamiprid

Yedi ay süresince analizi yapılan elmalarda acetamiprid kalıntısı, Haziran ayında elmanın soyulması ile % 9.37 azaldı (0,032 ppm'den 0,029 ppm'e). Bir ay sonra analiz için alınan elma ve acetamiprid kalıntısı % 59.37 azaldı (0,032 ppm'den 0,013 ppm'e). Kabuklu elmada uygulama sonrası LOQ seviyesi altına 2 ay sonra düşerken soyulmuş elmada da 2 ay sonra düştüğü görüldü.

Acetamiprid	Kabuklu iken Konsantrasyon (ppm)	Kabuksuz Konsantrasyon (0,1 cm soyma) (ppm)
Haziran (22 °C)	0,032	0,029
Temmuz (27 °C)	0,013	0,013
Ağustos (32 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.
Eylül (29 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.
Ekim (20 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.
Kasım (15 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.
Aralık (9 °C)	T.E.D.B.	T.E.D.B.

Şekil 7. Acetamiprid konsantrasyon değişimi



Şekil 8. Acetamiprid degradasyon eğrisi

#### Yarılanma Ömrü Hesabı

Yedi ay boyunca pestisit kinetiğini belirlemek için elmadaki pestisit içeriğindeki değişimler incelendi. Boscalid ve acetamipridin birinci derece reaksiyon kinetiği izlediği görüldü. Analiz edilen elmalarda en uzun yarılanma ömrü boscalid (39 gün), en kısa yarılanma ömrü acetamiprid (23 gün) hesaplandı.



## TARTIŞMA

Soyulmuş elmalarındaki; boscalid ve acetamiprid sırasıyla; %65.28 ve %9.37 azalma olduğu görüldü. Pestisit kalıntılarında boscalid en fazla azalırken, en az acetamiprid olduğu belirlendi.

Elma ağaçlarına uygulanan pestisitlerin ve olgunlaşma süresine bağlı olarak yapılan incelemede birinci ayın sonrasında boscalid % 47.10 ve acetamiprid % 59.37 azaldığı belirlendi.

Chavarri ve arkadaşları (2004) tarafından chlorpyrifos pestisiti uygulanan kuşkonmaz numuneleri üzerindeki yaptıkları çalışmada soyulmuş kuşkonmazdaki kalıntısının %60 azaldığını ayrıca Abou-Arab (1999) çalışmasında; soyma işleminin pestisit kalıntılarının giderilmesinde %80,6 ile %89,2 daha etkili proses işlemi olduğunu belirtmiş, bu çalışmalarda bulguların soyulmuş elma numuneleri ile paralellik gösterdiği görüldü.

Yıkanmış, soyulmuş Domates, hıyar ve patlıcanda üzerinde yapılan pestisit kalıntılarındaki çalışmalarda yıkanan numunelerde %21-75, soyulmuş numunelerde %60-95 azalma olduğu belirtilmiştir (Abou-Arab, 1999).

Elmaların hasat zamanında alınan numunelerinde, acetamiprid %100 azaldığı ve LOQ(10ppb) seviyesi altına düştüğü, boscalid ise %87,60 azaldığı belirlendi. Acetamiprid 2 ay, boscalid 5 ay sonra LOQ seviyesi altına düştüğü belirlendi.

Ticha ve arkadaşları (2008), elmalarda pestisit kalıntılarının miktarının depolama sırasında azaldığını ayrıca Kaushik, Satya ve Naik (2009), pestisit kalıntılarının proses ile değiştiğini ve gıdanın türüne, pestisit çeşidine bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmiş bu çalışmalarında bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Yarılanma ömürlerinde ise en yüksek yarılanma ömrü boscalidde (39 gün), en düşük yarılanma ömrü ise acetamiprid (23 gün) olduğu görüldü.

Sadlo ve arkadaşları (2016) kontrollü atmosfer şartlarında soğuk havada depolanan elmalarda captan, boscalid, pyraclostrobin ve trifloxystrobin pestisit kalıntılarının yarılanma ömürleri incelenmiş, 3 farklı çeşit elmada boscalid için 147-170-193 gün olarak belirtilmiştir.

Araştırmamızda kullanılan boscalidin yarılanma ömrü; 39.0 gün olarak bulundu bu bulgular Sadlo ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmalarla karşılaştırıldığında bu pestisit için yarılanma ömrünün çok daha az olduğu bunun da iklim koşulları, coğrafi konumu farklı olduğundan kaynaklandığı düşünüldü.

## SONUÇ

Bu tez çalışması elmanın pestisit kalıntı miktarlarının tespiti, elmaya kontrollü olarak uygulanan pestisitlerin soyma işlemi ile değişimi ve zamanla değişiminin izlenmesi, yarılanma ömürlerinin tahmini amacıyla yapıldı. Literatürlerde elmaya kullanılan pestisitlerin PHI yani bekleme süresine dikkat edilerek uygulandığı ve PHI hesapları mevcuttur. Fakat pestisit elma ürünündeki yarılanma ömürleri bilinmemektedir.

Dünyada yapılan çalışmalar ile literatürlerde pestisitlerin toprakta veya tarlada yapılan çalışmalar sonucu yarılanma ömürleri hesaplanmıştır. Bu konuda özellikle elmada pestisitlerin yarılanma ömürlerine dikkat edilerek ilaçlama yapılabileceği önerilmektedir.

Pestisitlerin toprakta yarılanma ömürleri göz önüne alındığında elmada hesaplanan yarılanma ömürlerinin topraktan daha az olduğu ve sonuçlarımız ile paralellik gösterdi.

Öneri olarak da;

- Farklı prosesler uygulayarak pestisit miktarlarındaki değişimlerin izlenmesi,
- Soyma ve zamanla pestisitlerin kalıntı miktarları azaldığı için tüketici tarafından elmaların soyarak yenilmesinin sağlık açısından faydalı olacağı tespit edildi.
- Pestisitlerin yarılanma ömürlerinin hesaplanmasında diğer bölgelerde veya şehirlerde de elmalara aynı bitkisel koruma ürünleri uygulanarak çalışmalar yapılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, Gıda Yüksek Mühendisi Serap USTAOĞLU'nun İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümünde "Elmada bulunan pestisit kalıntılarının zamana bağlı olarak değişiminin ve penetrasyonunun incelenmesi" isimli tez projesinden faydalanılmıştır. Doktora çalışmamın başlangıcından bitimine kadar gerek bilimsel gerekse manevi açıdan değerli öneri ve yönlendirici katkılarıyla bana destek veren Sayın Hocam Prof. Dr. Şükrü KARATAŞ' a içtenlikle teşekkür ediyorum.

## KAYNAKLAR

Abou-Arab AAK 1999. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. Food Chemistry, 65: 509–514.

AOAC Official Method 2007.01. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liq-uid Chromatography/Tandem

- Mass Spectrometry First Action (2007), AOAC International, Rockville, MD. Available at: [http://www.weber.hu/Downloads/SPE/QuEChERS/A\\_OAC\\_2007\\_01.pdf](http://www.weber.hu/Downloads/SPE/QuEChERS/A_OAC_2007_01.pdf). [Erişim 04.07.18]
- Chavarri MJ, Herrera A, Arino A 2004. Pesticide Residues in Field-Sprayed and Processed Fruits and Vegetables, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1253-1259.
- Esentürk N 2009. Tekirdağ İlinde Kanolada Zararlı Ceutorhynchus Assimilis Paykull. ‘A Beta Cyflutrin Ve Acetamiprid’in Etkileri Üzerinde Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, Türkiye.
- Hoskins WM 1961. Mathematical treatment of the rate of loss of pesticide residues. *FAO Pl. Prot Bull.*, 9: 163-168.
- Kaushik G, Satya S, Naik SN 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation – a review. *Food Research International* 42 (1): 26–40.
- Keikotlhaile BM, Spanoghe P, Steurbaut W 2010. Effects of food processing on pesticide residues in fruits and vegetables: A meta-analysis approach. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1-6.
- RASFF, 2017. The Rapid Alert System for Food and Feed, 2017 Annual Report.
- Rasmussen RR, Poulsen ME, Hansen HCB 2003. Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing. *Food Additives&Contaminants*, 20(11): 1044-1063.
- Sadlo S, Walorczyk S, Grodzicki P, Piechowicz B 2016. Disappearance of Captan, Boscalid, Pyraclostrobin and Trifloxystrobin Residues in Ripe Apples During Cold Storage Under Controlled Atmosphere. *Fresenius Environmental Bulletin*. 25 (6): 1959-1965.
- Şentürk, T 2012. Ulusal Elma Strateji Planı, Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 1. Ulusal Elma Çalıştayı, Konya, Türkiye.
- Ticha J, Hajslova J, Jech M, Honzicek J, Lacina O, Kohoutkova J, Kocourek V, Lansky M, Kloutvorova J, Falta V 2008. Changes of pesticide residues in apples during cold storage. *Food Control*, 19: 247-256.
- Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S 2010. Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(2): 154-169.
- Xia E, Tao W, Yao X, Wang J, Tang F 2016. Effects of processing on carbendazim residue in *Pleurotus ostreatus*. *Food Science & Nutrition*, 4(4): 645-650.

## Functional effects of cereal-like products on health

Şeniz Karabiyikli\*, Sümeyya Erdoğan

Tokat Gaziosmanpaşa University, Faculty of Engineering and Natural Science, Department of Food Engineering, Tokat, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: seniz.karabiyikli@gop.edu.tr

### Abstract

In recent years, consumers have tended to consume both good quality and healthy nutrients, because of cancer, diabetes and cardiovascular diseases increased due to changing nutritional habits. When the whole of these health risks are considered, functional foods, which have become a new trend, have gained importance in terms of healthy nutrition. Functional foods components include dietary fibers, peptides, alcohols, vitamins, minerals, unsaturated fatty acids and antioxidants. Fruits, vegetables and cereals among the functional foods have a great importance, especially cereals and cereals-like products used in foods such as bread, flour, pasta, biscuits, cakes, puddings and soups, which are produced too much in the food sector, and that caused the investigation of the composition of these foods and their health benefits. Buckwheat, quinoa and amaranth take part in pseudo-cereal group, and they are consumed extensively by people who diet because they contain high levels of dietary fiber, essential amino acids and vitamins compared to cereals. These gluten free products are also used for celiac patients who are gluten-sensitive in special diets. Buckwheat prevents high blood pressure, hypertension and diabetes. It has shown that quinoa inhibits the formation of cancer cells thanks to its bioactive compounds. It was observed that amaranth has cholesterol-lowering effect. Besides the benefits of these cereals there are some negative features too. Because quinoa contains oxalic acid, they can cause renal calculus by preventing the absorption of calcium and zinc. Buckwheat has immunoglobulin-E which is one of the most important allergens, and if it is consumed over 1.26 KuA/L, allergic reactions can occur. In this study, the studies on the nutrient, mineral matter and antioxidant content of buckwheat, quinoa and amaranth are evaluated as functional food and the importance of cereal-like products in terms of health is emphasized.

**Keywords:** Functional foods, cereals, buckwheat, quinoa, amaranth.

### INTRODUCTION

A rapid change in the dietary lifestyle have observed to globalization, urbanization, and economic developments leading to an increase in diseases such as cardiovascular diseases, some of cancer types, diabetes and obesity (Goyal et al., 2015). Recently, depending on rapid increase with the emergence of diseases, people have changed their eating habits and started to interest about healthier and safe foods. Thus, functional foods which have positive effects on health and produced from natural foods have become increasingly more popular. Functional foods are traditional foods or food components that are taken as part of normal nutrition and which benefit health beyond their nutritional properties (Rai et al., 2016). Functional foods include antioxidants, vitamins, minerals and many organic acids. These components include many fruits, vegetables, cereals and various dairy products. According to the American Heritage English dictionary; “*pseudo-cereals*” or “*cereal-like products*” are defined as ‘any plant that does not belong to the weed family, but produces fruits and seeds that are used as flour for bread and other basic foods’. Functional foods, cereals and cereal-like products are used in a lot of products in the food industry such as bread, flour, pasta, biscuits, cakes, pudding and soup (Dizlek et al., 2009). The most common pseudo-cereals are Amaranth (*Amaranth caudatus*, *Amaranth cruentus*, *Amaranth hypochondriacus*), quinoa (*Chenopodium quinoa sub sp.*, *Quinoa Chenopodiaceae*), and Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*, *Polygonaceae*). Those are monocotyledon dicotyledonous plants unlike cereals such as wheat, rice and barley. Seeds are called pseudo-cereal plants that are similar to true cereals in terms of function and composition (Alvarez-Jubete et al., 2010).

### IMPORTANCE IN TERMS OF NUTRITION

Vegetable proteins have an important place in terms of human nutrition. The nutritional quality of proteins can be determined by the presence of essential amino acids which cannot be synthesized by the human metabolism (Mota et al., 2016). For this reason, essential amino acids are more important than non-essential amino acids for the growth and maintenance of metabolic needs. The intake of these amino acids is compulsory and it is essential that they are taken from outside (WHO, 2007). The amount and quality of protein in amaranth, quinoa and buckwheat is higher than in cereals. The content of arginine and histidine, which are necessary for both

infants and children, makes amaranth and quinoa interesting for the nutrition of children. Amaranth, quinoa and buckwheat are more beneficial to other grains than the other proteins due to their reliability, high biocompatibility and low costs (Bergamo et al., 2011). In addition, the basic foods obtained from cereals were examined in many respects and they had less nutritional values than amaranth buckwheat and quinoa, thus benefiting the introduction of cereal-like products into the food industry and producing new functional foods. In addition to the products such as sorghum and wheat, amaranth and buckwheat, which are used as an alternative to the products obtained from flour-fruit-vegetables are added to a variety of bread with a high functional composition was produced. In some studies, spices and various herbs have been added to gluten-free flour and various phenolic, antioxidant contents have been enriched (Foschia et al., 2017; Giuberti and Gallo 2018; Pellegrini and Agostoni, 2015; Vici et al., 2016). Thus, gluten-free grains, which will replace foods such as corn rice, shed light on the development of new concepts in gluten-free food areas. All pseudo-cereal products such as buckwheat, amaranth and quinoa have a rich content of various compounds. These products have flavonoids, phenolic acids, trace elements, fatty acids, vitamins, which have effects such as the prevention and reduction of many degenerative diseases, so they are beneficial for human health (Gorinstein et al., 2002; Li and Zhang, 2001; Kalinova and Dadakova, 2009; Tomotake et al., 2007).

Dietary fiber is the edible part of plant nutrients and is resistant to digestion and adsorption in the small intestine when consumed. Dietary fiber is composed of polysaccharide, oligosaccharide and related plant compounds and provides many health benefits. Dietary fiber intake shows that obesity (Lairon et al., 2005) reduces the development of certain diseases such as coronary heart disease (Liu et al., 1999), diabetes (Montonen et al., 2003), hypertension (Whelton et al., 2005), paralysis (Steffen et al., 2003) and some gastrointestinal tract disorders (Petruzzello et al., 2006). Furthermore, consumption of dietary fiber improves immune function (Watzl et al., 2005), maintaining normal serum lipid concentrations (Brown et al., 1999), helps in weight loss (Birketvedt et al., 2005), reduces blood pressure and blood glucose levels (Anderson, 2004). The main purpose of dietary fiber enrichment of gluten-free products is to increase nutritional value, to improve technological properties and to increase sensory attractiveness. Furthermore, the addition of DF helps to increase the tissue and shelf life of the products due to the gel formation capability, oil mimetic, water binding capacity, thickening and texturing effect (Belton and Taylor, 2002; Kiskini et al., 2007; Marco and Rosell, 2008). The proposed intake of 25-35 g/day dietary fiber necessitates the enrichment of gluten-free products with dietary fiber, resulting in an improvement in the physico-chemical, structural and microstructural properties of the products (Mayer, et al., 1991).

The proportion of dietary fiber, protein, vitamins, minerals and other phytochemical components is generally higher compared to conventional products made of fake cereals, traditional products made of gluten-free flour or starches. In addition, the glycemic index of buckwheat and quinoa is low, and they benefit from formulations of gluten-free products for celiac. Grain-like products such as buckwheat (29.5%), quinoa (14.2%), and amaranth (20.6%) have significant dietary fiber (Alvarez-Jubete, et al., 2009a). Especially buckwheat contains a higher amount of dietary fiber than general cereals. In addition, the ratio of dandruff (embryo and seed husk) is higher compared to wheat and corn, which causes an increase in fat and protein levels. Therefore, the manufacturer of gluten-free food products is an exceptional source of dietary fiber, vitamin B and iron, so the use of whole-grained so-called cereals or small-scale cereals such as millet and sorghum is being investigated. Table 1 shows nutritional values of amaranth, quinoa, buckwheat, corn and rice for 100g (Jnawali et al., 2016).

### **IMPORTANCE FOR HEALTH**

Cereal-like products have started to become alternative food sources for people with celiac disease because they do not contain gluten in cereals such as barley, wheat and rye. In addition, gluten-free food addresses not only clinically diagnosed celiac patients, but also consumers adopting the gluten-free food lifestyle (Giuberti and Gallo 2018; Vici et al., 2016). Celiac disease is the most common food-borne enteropathy triggered by the consumption of gluten in genetically susceptible individuals and is seen in approximately 1% of the population in most Western countries (Cichewicz, 2019). Celiac disease is a digestive disorder caused by gluten current in genetically predetermined individuals (Hamer, 2005; Laurin et al., 2008). Gluten causes the mucosa of the small intestine to be destroyed because it cannot be digested and it affects the nutrient balance of the body by preventing the absorption of some important nutrients such as folic acid, fat-soluble vitamins, iron and calcium (Hill et al., 2005). Although celiac disease may cause non-gastrointestinal symptoms, weight loss and diarrhea, in some people it may show unusual symptoms such as short stature, anemia, neuropathy, extreme weakness, liver and osteoporosis (McGough and Cummings, 2005; Rodrigo, 2006).

**Table 1.** Nutritional values of buckwheat amaranth and quinoa (100 g)

Cereals	Protein	Fat	CHO	Crude fiber	Dietary fiber	Mineral
Buckwheat	12.50	2.10	75.74	0.7	29.50	14.2
Amaranth	16.50	5.20	69.00	2.3	14.20	2.70
Quinoa	16.50	5.70	70.3	3.9	20.60	3.25
Rice	7.70	2.20	73.70	1.63	2.20	1.20
Corn	8.80	3.80	65.00	ND	2.20	1.30

One of the biggest challenges for people with celiac disease is to find a quality gluten free diet product. Despite the growth of the gluten-free market, individuals with celiac disease still have trouble finding gluten-free products due to their high prices, limited diversity and availability, and weak sensory characteristics (Mir et al., 2017). For these reasons, amaranth, quinoa and buckwheat have nutritional properties and gluten-free food; it is thought that these foods will replace the main food products such as corn, wheat and rice. In addition, phenolic and antioxidant substances contained in these foods reduce the risks of diabetes, obesity and cancer diseases. These products are associated with a decrease in the incidence of diseases such as cancer, cardiovascular diseases, high blood pressure and diabetes. (Chan et al., 2007; Slavin, 2004; Jacobs and Gallaher, 2004; Mellen et al., 2008; Behall et al., 2006; Flint et al., 2009; Lutsey et al., 2007; Qi and Hu, 2007; Rave et al., 2007). Flavonoids and phenolic acids that support the functional properties of amaranth, quinoa and buckwheat are given in Table 2 (Mir et al., 2018).

#### FUNCTIONAL FEATURES OF BUCKWHEAT

Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Monch) is a single-year plant with no relationship with grains (Acar et al. 2011; Peng et al., 2012), most of which are grown and produced in China, Russia, Ukraine and Kazakhstan, but in recent years all over the world and especially in Asia, Europe and America (Crista and Smietana, 2008). Basic structural difference that separates buckwheat from grains; it is not a monocot and a dicot (Dizlek et al. 2009) and it has the ability to adapt to the development at high altitudes (Kan, 2011). Common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and Tatar buckwheat (*Fagopyrum tartaricum* Gaerth) are the most commonly grown buckwheat species as a food source (Dizlek et al. 2009). Tatar buckwheat is mostly cultivated in the south-west of China, while the common buckwheat species is grown in northern China (Peng et al. 2012). It affects warm climates, low requirements of humus and can be produced in almost any soil. It has the potential to prevent Type II diabetes and reduce cholesterol (Mir et al., 2018). The routine glycoside contained in buckwheat is used to treatment or prevent cardiovascular disorders with hypertension resulting in retinal hemorrhage, resulting in tearing of the veins in the brain. In addition, this glycoside is used in the treatment of renal hemorrhage, hereditary hemorrhagic lesions, hemophilia and some hemorrhagic diseases (Rajbhandari, 2004).

Buckwheat protein is a nutritionally superior to the amino acid composition and other cereal proteins as well as being one of the best sources of high biological value proteins (Mariotti et al. 2013). The similarity of these proteins to animal-derived proteins is high (Rajbhandari, 2004). It contains flavanoid, fagopirin and thiamine binding proteins with prophylactic value along with valuable proteins (Crista and Smietana, 2008). These proteins have cholesterol lowering and antihypertensive effect (Li and Zhang, 2001). It is a product with high nutritive value: important microelements like buckwheat Zn, Cu, Mn, Se, and macroelements such as K, Na, Ca, Mg (Crista and Smietana, 2008), basic functional components such as flavonoids, polyphenols, inositol, organic acids (Peng et al. 2012) high levels of protein, dietary fiber, vitamins, minerals, basic polyunsaturated fatty acids (Dizlek et al. 2009). Iron content is the highest among all cereal and legume group foods. It is an ideal product for people, pregnant women and babies who are having anemia problem (Rajbhandari, 2004).

**Table 2.**Flavonoids and phenolic acids in amaranth, quinoa and buckwheat

	<b>Amaranth</b>	<b>Buckwheat</b>	<b>Quinoa</b>
<b>Phenolic acids</b>	Protocatechuic	Ferulic, caffeic, gallic	Caffeic
	p-Hydroxybenzoic	p-hydroxybenzoic	Ferulic, p-coumaric
	Syringic	o-Coumaric	p-Hydroxybenzoic acid
	Gallic, p-coumaric, vanillic	Sinapic, vanillic	Vanillic acid
		p-Coumaric	Gallic, cinnamic Protocatechuic acid
<b>Flavonoids</b>	Rutin	Quercetin	Myricetin
	Isoquercetin	Quercetin-3-O- rutinoside	Quercetin, kaempferol
	Quercetin	Rutin	Isohamnetin
	Nicotiflorin	Isovitexin	Rutin, orientin
	Anthocyanins	Vitexin, homoorientin	Hesperidin
		Orientin	Vitexin, morin
		Isorientin	Neohesperidin
	Hyperoside, epicatechin,		

Buckwheat is also important as a nutrient for dietary fiber and resistant starch content which has harmful effects by reducing glycemic and insulin indexes (Skrabanja et al., 2001). It was observed that the amount of phenolic compounds in black wheat flour in tyrosol (227.9 mg/kg), alkylphenol (156.2 mg/kg) and phenolic acid (2277.1 mg/kg) and buckwheat flour isomeric feruloylkinic acid (113.8 mg/kg) and quercetin 3-O-xylosylglycoside (69.2 mg/kg). Buckwheat is the highest source of phenolic compounds compared to other grain-like products (Li et al., 2013; Mikulajova et al., 2016).

### FUNCTIONAL PROPERTIES OF AMARANTH

Amaranth has a large biodiversity and among all species *Amaranth caudatus*, *Amaranth hypochondriacus* and *Amaranth cruentus* are most commonly grown from these seeds (Kaur et al., 2010). Seeds are in sizes ranging from 1 to 1.5 mm and weighing 0.6-1.3 mg per seed (Caballero et al., 2003). This plant grows evenly in arid conditions and high tolerance to poor soils, drought resistance, hot and harmful insects and traditional grain crops, even in poorly developed environments. Amaranth is a rich source of iron, copper, manganese and zinc. In a study with 10% amaranth flour in the cheese fiber and increased the content of dietary fiber and iron on a 9-point hedonic scale according to the control group said that 6.8 points (Lemos et al., 2012). Some researchers made from bread 100% amaranth flour in his study (De la Barca et al., 2010). It was found that the bread made from the flour obtained by combining 60% roasted amaranth and 40% raw amaranth for the flour had a homogenous content and higher volume.

The fat in cereal-like cereals is characterized by a high amount of unsaturated fatty acids (very high amounts of linolenic acid). Polyunsaturated fatty acids have many positive effects on cardiovascular diseases and improved insulin sensitivity (James, 2009). Amaranth usually contains high amounts of squalene, a highly unsaturated open-chain triterpene found only in the liver of deep-sea fish. Squalene derived from these grains is widely used in pharmaceutical and cosmetic applications. Studies in the literature have shown that steroids induced by buckwheat proteins, steroids binding to undigested proteins, can reduce the cholesterol concentration in the serum by increasing fecal excretion (Takahama et al., 2011). It was reported that the lipid content of amaranth and quinoa was two to three times higher than the general cereals such as wheat and wheat. It was also found that lipids found in these fake grains are characterized by a high degree of unsaturation desired for nutrition (Alvarez-Jubete et al., 2009b).

## FUNCTIONAL FEATURES OF QUINOA

Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) is a species belonging to the family of Amaranthaceae in the Andes region of South America. Quinoa can be grown in 2000 - 4000 m altitudes and even in areas with low rainfall up to 300 - 400 mm. At the same time this plant is frost resistant and its seeds can germinate a few hours after exposure to moisture. Depending on the variety, the color may be white, yellow or light brown in red. The grain was wrapped with a two-layer pericarp containing saponins. Saponins are bitter substances and must be removed before consumption (Kuljanabhagavad et al., 2008). Phenolic compounds from various plant sources, including food grains and legume seeds, have been shown to inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities and allow for better control of blood glucose levels.  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase are key enzymes related to carbohydrate digestion in the small intestine, which inhibits the breakdown of starch in diabetic patients and lowers the blood glucose levels (Hemalatha et al., 2016).

It was found that quinoa protein could provide about 210% of histidine, 107.33% of isoleucine, 132.22% of lysine and 107.43% determined protein calculations for adult nutrition by reference to standard FAO/WHO (2013) protein scores in the calculation of amino acids (Mir et al., 2015). Compared to other cereal crops such as wheat, rice and sorghum, sulfur-containing amino acids are found in high concentrations of cysteine and methionine (James, 2009). Gamel et al. (2004) reported that amaranth and quinoa are good sources of riboflavin, vitamin C, and especially folic acid and vitamin E. Folic acid was 78.1  $\mu$ g / 100 g in quinoa and 102  $\mu$ g / 100 g in amaranth and 40  $\mu$ g / 100 g in wheat.

Quinoa seeds are rich sources of polyunsaturated fatty acids and are predominant in linoleic acid (Ng et al., 2007). It has been found that a diet containing high amounts of  $\alpha$ -linolenic acid increases the uptake of n-3 fatty acids, as it reduces biomarkers associated with many degenerative diseases such as cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, inflammatory and autoimmune diseases (Simopoulos, 2001). It was reported that amaranth and quinoa lipids are generally stable against oxidation, despite the high fat content and degrees of unsaturation, although this is attributed to the protective effect of tocopherols found in relatively high amounts in fake cereals (Ng et al., 2007). It has been reported that the content of phosphorus and magnesium in the quinoa may contribute even to 55% of the recommended daily intake (Nascimento et al., 2014).

Alvarez-Jubete et al. (2009b), in their study, compared the bread made from potato and rice, and bread made from amaranth, quinoa and buckwheat. Antioxidant activity, vitamin E content, protein and calcium content of the bread obtained from cereal-like products were higher than the other bread group. Starch typically produces the basic biopolymeric components of plants (grains, tubers and seeds) in granular forms of various shapes and sizes. Starch is the main source of physiological energy in human nutrition and is generally classified as an existing carbohydrate. Starchy compounds are found in the perisperm of seeds and can be found in simple units or in aggregate aggregates. In another study, quinoa consisted of approximately 64-74% dry matter and reported that it had amylose content in lower amounts of about 11% than other grades (Jancurová et al., 2009).

Amaranth, quinoa and buckwheat grains are usually good sources of calcium, magnesium, iron and other important mineral sources. It is of particular importance for people with known osteopenia and osteoporosis who have been diagnosed with celiac disease (Fasano and Catassi, 2001; Chand and Mihas, 2006; Rodrigo, 2006).

## RESULTS

Nowadays, the emergence of diseases such as obesity, cancer and diabetes, caused by the consumption of processed foods, has directed people to consume natural and healthy foods. The emergence of consumption awareness led to the realization that the foods were not only intended for feeding and functional foods came to the fore. Functional foods contain many vitamins, minerals and antioxidants which are beneficial for human health when consumed. Cereals are used in all products in the food industry thanks to their nutritional values and low production costs. However, cereals such as wheat and rice corn are rich in carbohydrates and are not suitable for people who consume their diet, and people with gluten discomfort cannot consume these products. They are similar to amaranth, quinoa and buckwheat grains but not whole grains. These grain-like products have high amounts of phenolic compounds and phytochemicals. These compounds reduce the risk of various

diseases such as heart disease, diabetes, diabetes. At the same time, these cereal-like products do not contain gluten, which are a common source of food for people who adopt a gluten-free lifestyle and celiac patients. Despite the market share of gluten-free products for individuals with celiac disease, high prices still have problems in finding gluten-free products due to their limited diversity and availability and weak sensory properties.

Therefore, these cereal-like products need to be processed. Despite of there are many positive effects of these products, there are some points that should be concerned such as saponins which are not useful for human health. Because of this reason, further researches are necessary to determine the physicochemical properties of amaranth, quinoa and buckwheat. As a result, it is assumed that cereal-like foods can replace the cereals which are indispensable for our nutrition such as wheat, corn or rice. Therefore, the production of foods obtained from amaranth, quinoa and buckwheat should be tried to be expanded.

## REFERENCES

- Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E 2009a. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(sup4): 240-257.
- Alvarez-Jubete L, Hölse M, Hansen Å., Arendt EK, Gallagher E 2009b. Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal chemistry*, 86(5): 511-515.
- Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK, Gallagher E 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119: 770–778.
- Anderson JW 2004. Whole grains and coronary heart disease: the whole kernel of truth. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6): 1459–1460.
- Auricchio S 2012. An innovative approach to measure compliance to a gluten-free diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3): 537–538.
- Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch J 2006. Whole-grain diets reduce blood pressure in mildly hypercholesterolemic men and women. *Journal of the American Dietetic Association*, 106(9): 1445–1449.
- Belton PS, Taylor JR, (Eds.). 2002. *Pseudocereals and less common cereals: grain properties and utilization potential*. Springer Science and Business Media.
- Bergamo P, Maurano F, Mazzarella G., Gianfrani C, Rossi M 2011. Immunological evaluation of the alcohol-soluble protein fraction from glutenfree grains in relation to celiac disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(8): 1266–127.
- Birketvedt GS, Shimshi M, Thom E, Florholmen J 2005. Experiences with three different fiber supplements in weight reduction. *Medical Science Monitor*, 11(1): PI5-PI8.
- Brown L, Rosner B, Willett WW, Sacks FM 1999. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 69(1): 30-42.
- Caballero B, Trugo LC, Finglas, PM 2003. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Academic.
- Chan JM, Wang F, Holly EA, 2007. Whole grains and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *American journal of epidemiology*, 166(10): 1174-1185.
- Chand N, Mihas AA 2006. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of clinical gastroenterology*, 40(1): 3-14.
- Christa K, Smietana M 2008. Buckwheat grains and buckwheat products – nutritional and prophylactic value of their components– a review. *Czech Journal Food Science*, Vol. 26: 153– 162.
- Cichewicz AB, Mearns ES, Taylor A, Boulanger T, Gerber M, Leffler DA, Lebowitz B 2019. Diagnosis and Treatment Patterns in Celiac Disease. 1-12.
- Cummings JH, McGough N 2005. Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4): 434-450.
- De la Barca AMC, Rojas-Martínez ME, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chávez F 2010. Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3): 241-246.
- Dizlek H, Özer M, İnanç E, Gül H 2009. Karabuğday'ın bileşimi ve gıda sanayiinde kullanım olanakları. *Gıda*, 34: 337-324.
- Fasano A, Catassi C 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120(3): 636-651.



- Fao/Who 2013. Protein and amino acid requirements of infants and children. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series; No. 935.
- Flint AJ, Hu FB, Glynn RJ, Jensen MK, Franz M, Sampson L, Rimm EB 2009. Whole grains and incident hypertension in men. *The American journal of clinical nutrition*, 90(3): 493-498.
- Foschia M, Beraldo P, Peressini D 2017. Evaluation of the physicochemical properties of gluten-free pastas enriched with resistant starch. *Journal Science Food Agriculture*, 97:572-577.
- Gamel TH, Linssen JP, Alink GM, Mosallem AS, Shekib LA 2004. Nutritional study of raw and popped seed proteins of *Amaranthuscaudatus* L and *Amaranthuscruentus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10): 1153-1158.
- Giuberti G, Gallo A 2018. Reducing the glycaemic index and increasing the slowly digestible starch content in gluten-free cereal-based foods: a review. *International journal of food science & technology*, 53(1): 50-60.
- Gorinstein S, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Weisz M, Trakhtenberg S 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8): 886-891.
- Goyal A, Sharma V, Sihag MK, Tomar SK, Arora S, Sabikhi L, Singh AK 2015. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated flaxseed oil powder: A functional ingredient for omega-3 fortification. *Powder Technology*, 286: 527-537.
- Hamer RJ 2005. Coeliac disease: background and biochemical aspects. *Biotechnology Advances*, 23(6): 401-408.
- Hemalatha P, Bomzan DP, Rao BS, Sreerama YN 2016. Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Food chemistry*, 199: 330-338.
- Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Seidman EG. 2005. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 40(1): 1-19.
- Jacobs DR, Gallaher DD 2004. Whole grain intake and cardiovascular disease: a review. *Current atherosclerosis reports*, 6(6): 415-423.
- James LEA 2009. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Advances in food and nutrition research*, 58: 1-31.
- Jancurová M, Minarovičova L, Dandar A 2009. Quinoa—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(2): 71-79.
- Jnawali P, Kumar V, Tanwar B 2016. Celiac disease: Overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food Science and Human Wellness*, 5(4): 169-176.
- Kalinova J, Dadakova E 2009. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant foods for human nutrition*, 64(1): 68.
- Kan A 2011. Konya ekolojik koşullarında yetiştirilen karabuğdayın bazı kalite özelliklerinin araştırılması. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 25: 67-71.
- Kaur S, Singh N, Rana JC 2010. *Amaranthushypochondriacus* and *Amaranthuscaudatus* germplasm: Characteristics of plants, grain and flours. *Food chemistry*, 123(4): 1227-1234.
- Kiskini A, Argiri K, Kalogeropoulos M, Komaitis M, Kostaropoulos A, Mandala I, Kapsokefalou M 2007. Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten-free bread fortified with iron. *Food Chemistry*, 102(1): 309-316.
- Kuljanabhadgavad T, Thongphasuk P, Chamulitrat W, Wink M 2008. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry*, 69(9): 1919-1926.
- Lairon D, Arnault N, Bertrais S, Planells R, Clero E, Hercberg S, Boutron-Ruault MC 2005. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *The American journal of clinical nutrition*, 82(6): 1185-1194.
- Laurin P, Wolving M, Fälth-Magnusson, K 2002. Even small amounts of gluten cause relapse in children with celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 34(1): 26-30.
- Lemos ADR, Capriles VD, Arêas JAG 2012. Effect of incorporation of amaranth on the physical properties and nutritional value of cheese bread. *Food Science and Technology*, 32(3): 427-431.
- Li FH, Ya YUAN, Yang XL, Tao SY, Jian MING 2013. Phenolic Profiles And Antioxidant Activity Of Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Mœench And *FagopyrumTartaricum* L. Gaerth) Hulls, Brans And Flours. *Journal Of Integrative Agriculture*, 12(9): 1684-1693.

- Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Willett WC 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3): 412-419.
- Li SQ, Zhang QH 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(6): 451-464
- Lutsey PL, Jacobs DR, Kori S, Mayer-Davis E, Shea S, Steffen LM, Tracy R 2007. Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA Study. *British Journal of Nutrition*, 98(2): 397-405.
- Marco C, Rosell, CM. 2008. Breadmaking performance of protein enriched, gluten-free breads. *European Food Research and Technology*, 227(4): 1205-1213.
- Mariotti M, Pagani MA, Lucisano M 2013. The role of buckwheat and HPMC on the breadmaking properties of some commercial gluten-free bread mixtures. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 393-400.
- Mayer M, Greco L, Troncone R, Auricchio S, Marsh MN 1991. Compliance of adolescents with coeliac disease with a gluten free diet. *Gut*, 32(8): 881-885.
- Mellen PB, Walsh TF, Herrington DM 2008. Whole grain intake and cardiovascular disease: a meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(4): 283-290.
- Mikulajová A, Šedivá D, Hybenová E, Mošovská S 2016. Buckwheat cultivars- phenolic compounds profiles and antioxidant properties. *ActaChimicaSlovaca*, 9(2): 124-129.
- Mir NA, Gul K, Riar CS 2015. Technofunctional and Nutritional Characterization of Gluten-Free Cakes Prepared from Water Chestnut Flours and Hydrocolloids. *Journal of food processing and preservation*, 39(6): 978-984.
- Mir NA, Riar CS, Singh S 2018. Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in food science & technology*, 75: 170-180
- Mir SA, Bosco SJD, Shah MA, Santhalakshmy S, Mir MM 2017. Effect of apple pomace on quality characteristics of brown rice based cracker. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(1): 25-32.
- Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Aromaa A, Reunanen A 2003. Whole-grain and fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 77(3): 622-629.
- Mota C, Santos M, Mauro R, Samman N, Matos AS, Torres D, Castanheira I 2016. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food chemistry*, 193: 55-61.
- Nascimento AC, Mota C, Coelho I, Gueifão S, Santos M, Matos AS, Castanheira I 2014. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthuscaudatus*), and purple corn (*Zea mays L.*) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. *Food chemistry*. 148: 420-426.
- Ng SC, Anderson A, Coker J, Ondrus M 2007. Characterization of lipid oxidation products in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Chemistry*, 101(1): 185-192.
- Pellegrini N, Agostoni C 2015. Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12): 2380-238.
- Peng L, Wang S, Zou L, Zhao J, Zhao G 2012. HPLC fingerprint of buckwheat from different habitats and varieties. *Pharmacognosy Journal*, 4(31): 5-10.
- Qi L, Hu FB 2007. Dietary glycemic load, whole grains, and systemic inflammation in diabetes: the epidemiological evidence. *Current opinion in lipidology*, 18(1): 3-8.
- Rai AK, Kumari R, Sanjukta S, Sahoo D 2016. Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresource technology*, 219: 239-24.
- Rajbhandari P 2004 Eco-physiological aspects of common buckwheat. Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat. 101-108.
- Ramazan ACAR, Güneş A, Topal İ, Gummadov N 2011. Farklı bitki sıklıklarının karabuğday'da (*Fagopyrum esculentum Moench.*) verim ve bazı verim unsurlarına etkisi. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 25(3): 47-51.
- Rave K, Roggen K, Dellweg S, Heise T, Dieck, H 2007. Improvement of insulin resistance after diet with a whole-grain based dietary product: results of a randomized, controlled cross-over study in obese subjects with elevated fasting blood glucose. *British Journal of Nutrition*, 98(5): 929-936.
- Rodrigo L 2006. Celiac disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(41): 6577.
- Simopoulos AP 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 60(9): 502-507.

- Skrabanja V, Laerke HN, Kreft I 1998. Effects of Hydrothermal Processing of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats on Starch Enzymatic Availability In Vitro and In Vivo in Rats. *Journal of Cereal Science*, 28(2): 209-214.
- Slavin J 2004. Whole grains and human health. *Nutrition research reviews*, 17(1): 99-110
- Steffen LM, Jacobs DR, Stevens J, Shahar E, Carithers T, & Folsom AR 2003. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3): 383-390.
- Watz B, Girrbaach S, Roller M 2005. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *British Journal of Nutrition*, 93(S1): S49-S55.
- Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, Yi Y, Whelton PK, He J 2005. Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials.
- Takahama U, Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V 2016. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical nutrition*, 35(6): 1236-1241. Academic Press.
- Tomotake H, Yamamoto N, Kitabayashi H, Kawakami A, Kayashita J, Ohinata H, Kato N 2007. Preparation of tartary buckwheat protein product and its improving effect on cholesterol metabolism in rats and mice fed cholesterol-enriched diet. *Journal of food science*, 72(7): S528-S533

## Sızıntı sularından elektro-Fenton yöntemi ile KOİ giderimi

Hakan Esen\*, Nevzat Beyazıt

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: hakans.esenn@gmail.com

### Özet

Sızıntı suları yüksek konsantrasyonda organik ve inorganik kirletici bileşenlere sahip olup alıcı ortama deşarj edilmeden önce mutlaka arıtılması gereken atık sularındandır. Son yıllardaki literatür çalışmalarında, sızıntı sularının arıtılması için elektro-Fenton gibi ileri oksidasyon proseslerinin de değerlendirilmesi önerilmektedir. Bu çalışmada sızıntı suyundan elektro-Fenton yöntemi ile KOİ giderimi üzerine atık su giriş pH'sı, akım yoğunluğu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu, elektrotlar arası mesafe ve reaksiyon süresinin etkisi araştırılmıştır. Belirlenen optimum deneysel koşullarda (pH: 2.5, akım yoğunluğu: 75 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 2000 mg/L, elektrotlar arası mesafe: 10 mm ve reaksiyon süresi: 30 dakika) sızıntı suyundan 0.517 kg/m<sup>3</sup> anot ve 1.092 kWh/m<sup>3</sup> lük elektrik enerjisi tüketimleri ile maksimum % 63 oranında KOİ giderimine ulaşılmıştır. Anot (>%99.9 saflıkta demir), elektrik enerjisi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketimlerinin toplamı olarak; toplam maliyet 110.25 \$/m<sup>3</sup> iken, 1 kg KOİ giderimi için hesaplanan maliyet 9.71 \$'dır.

**Anahtar Kelimeler:** Sızıntı suyu, elektro-Fenton, KOİ giderimi

### Abstract

Leachate has a high concentration of organic and inorganic pollutants and that must be treated before discharge to the receiving environment. In recent studies, it has been suggested that advanced oxidation process such as electro-Fenton for leachate treatment should also be evaluated. In this study the effect of wastewater pH, current density, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, the distance between electrodes and reaction time on COD removal by electro-Fenton were investigated. In the determined experimental conditions (pH: 2.5, current density: 75 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration: 2000 mg/L, distance between electrodes: 10 mm and reaction time: 30 minutes), were achieved maximum of % 63 COD removal from leachate with the anode consumption of 0.517 kg/m<sup>3</sup> and electrical energy of 1,092 kWh/m<sup>3</sup>. The total cost is 110.25 \$/m<sup>3</sup>, while the cost for 1 kg COD removal is 9.71 \$, which were the sum of the anode (> 99.9% purity iron), electrical energy and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption.

**Keywords:** Leachate, electro-Fenton, COD removal

### GİRİŞ

Kentsel katı atıkların nihai bertaraf yöntemi olarak düzenli depolama, yaygın bir şekilde tercih edilen bir uygulamadır. Düzenli depolama sahalarında oluşan sızıntı suları genellikle yağmur suyunun katı atıklardan süzülmesiyle oluşmakla birlikte katı atıkların içeriğinden de oluşabilir. Sızıntı suyunun alıcı ortama doğrudan deşarj edilebilmesi için uygun metotlar ile arıtımı gereklidir (Kattel vd., 2016; Suresh vd., 2016). Sızıntı sularının arıtılmasında, biyolojik arıtma, membran prosesleri, kimyasal oksidasyon, aktif karbon adsorpsiyonu ve ters osmoz gibi metotlar kullanılabilir (Gönüllü ve İlhan, 2008). Depolama sahası sızıntı suyunun geleneksel biyolojik yöntemlerle arıtımı, içeriğindeki bozunmaya dirençli kirletici maddelerden dolayı yüksek verimler ile sağlanamamaktadır (Wang vd., 2019). Son yıllarda, yüksek toksisite ve düşük biyolojik bozuna bilirliliğe sahip sızıntı suları gibi yüksek organik içerikli atık suların arıtılması için elektrokimyasal yöntemler önerilmektedir. Günümüzde, Fenton oksidasyonu (FO), foto oksidasyon ve elektrooksidasyon gibi farklı oksidasyon işlemlerinden oluşan hibrit sistemler elektrokimyasal yöntemlerin etkinliğini artırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle, Fenton oksidasyonu ve elektrokoagülasyonun birlikte uygulandığı elektro-Fenton, elektrokimyasal arıtma çalışmalarında, sızıntı sularının yüksek verimlerde arıtılabildiği bilinmektedir (Orkun ve Kuleyin, 2010). Organik maddeleri parçalamak için güçlü oksitleyici özellikli hidroksil radikalleri (OH•) üreten Fenton işleminin (Fe<sup>2+</sup> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sızıntı suyu arıtımında etkili bir yöntem olduğu doğrulanmıştır (Wang vd., 2019). Fenton reaksiyonunda hidroksil radikalleri üretmek için, hidrojen peroksit demir iyonları tarafından katalizlenir (Mohajeri vd., 2009). Fenton yöntemi ile inorganik ve organik kirleticilerin oksidasyonu, genel olarak aşağıdaki zincir reaksiyonları ile gerçekleşir (Altın, 2008).



Seçici olmayan OH• radikali, organik ve inorganik kökenli yapıları kolayca oksitleyebilmektedir (Şahinkaya, 2017). Son zamanlarda, elektro-Fenton işleminin iki uygulaması ön plana çıkmaktadır. Bunlardan ilki, Fenton reaktiflerinin ( $Fe^{2+}$  ve  $H_2O_2$ ) reaktöre dışarıdan eklendiği ve yüksek katalitik aktiviteye sahip olan çözünmeyen elektrotların anot materyali olarak kullanıldığı elektro-Fenton sistemidir. İkincisi ise  $H_2O_2$ ' nin dışarıdan eklendiği  $Fe^{2+}$  iyonlarının anot demirden üretildiği sistemdir (Altın, 2008). Literatürde Atmaca (2009) sızıntı suyundan elektro-Fenton yöntemi ile % 72 KOİ, %90 renk giderimine ulaşmıştır. Bi başka çalışmada Zang ve arkadaşları (2006) sızıntı suyundan elektro-Fenton yöntemi ile %65 KOİ giderim verimi elde etmişlerdir. Bu çalışmada, sızıntı suyundan elektro-Fenton prosesi ile KOİ giderimi üzerine giriş pH'sı ve  $H_2O_2$  konsantrasyonu, akım yoğunluğu, elektrotlar arası mesafe ve reaksiyon süresinin etkileri incelenmiş, elde edilen verimler ile birlikte, toplam maliyet ve kg KOİ başına oluşan maliyet hesaplanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Atıksu ve özellikleri

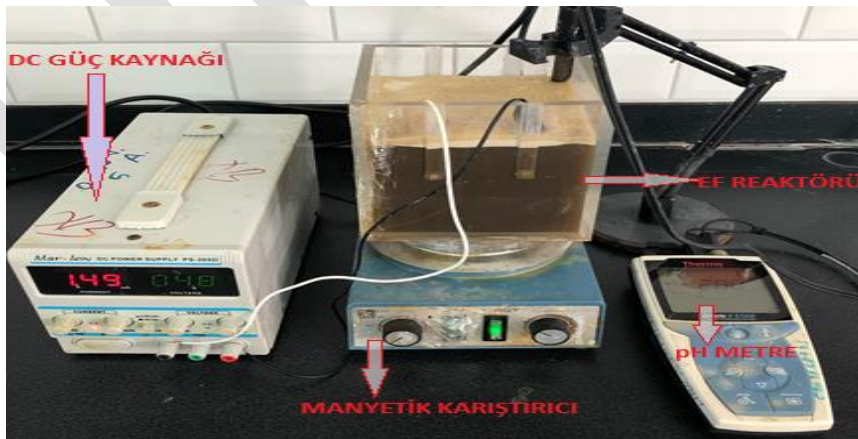
Deneylerde kullanılan sızıntı suyu Samsun il merkezine 10 kilometre uzaklıkta Kadamut mahallesinde faaliyet gösteren Samsun Katı Atık Düzenli Depolama tesisine ait sahadan temin edilmiştir. Saha 5,6, 4 ve 9 hektar olmak üzere 3 lot dan oluşmaktadır. Saha 2008 yılında aktif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Deponi sahası orta yaşlı saha sınıfına girmektedir. Sahada günde yaklaşık 800-900 ton arasında atık depolanmaktadır. 2008 yılından 2017 yılına kadar tesiste bertaraf edilen atık miktarı 1.840.256 ton kadardır. Sahada günlük oluşan sızıntı suyu miktarı  $300 m^3$  tür. Oluşan bu sızıntı suyu sahada arıtılmamakta ve  $30 m^3$  kapasiteli tankerler ile her gün Samsun Doğu İleri Artıma tesisine gönderilmektedir. Deneylerde kullanılan sızıntı suyuna ait karakteristik özellikler Tablo 1' de verilmiştir.

Tablo 1. Sızıntı suyu karakterizasyonu

Parametre	Değer
pH	7.94-8.36
KOİ (mg/L)	8340-18250
İletkenlik (mS/cm)	20-40

### Malzemeler ve analitik yöntemler

Deneylerde, DC güç kaynağı (MarxLow PS-305 D), manyetik karıştırıcı (RCT) ve EF reaktörü (pleksiglas malzemeden  $2131.2 cm^3$  ( $12 \times 12 \times 4,8$ ) faydalı hacime sahip) kullanılmıştır. Reaktörde 3 anot (demir), 3 katot (paslanmaz çelik, SS-316) kullanılmış olup toplam aktif anot alanı  $199.19 cm^2$  dir.



Şekil 1. Deneysel düzenek

### Deneysel prosedür ve hesaplamalar

Deneylerin her aşamasında kaba filtre kağıdından filtrelenmiş 1.5 L sızıntı suyu kullanılmıştır. Giriş pH değerlerinin ayarlanması için 18, 10 ve 5 M  $H_2SO_4$  ile 0.5, 1 ve 2 M NaOH kullanılmıştır. Gereken konsantrasyonda  $H_2O_2$  reaktöre eklendikten hemen sonra istenen akım ayarlanarak güç kaynağı çalıştırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında numuneler santrifüj tüplerine alınmış, eşzamanlı olarak pH ve voltaj değerleri

kaydedilmiştir. EF deneyleri sonrası alınan numuneler 9000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra KOİ ölçümleri Merck marka KOİ ölçüm kitleri ile yapılmıştır.

KOİ giderim verimi denklem (5) kullanılarak hesaplanmıştır (Un ve Oduncu , 2014).

KOİ Giderimi;

$$\% \text{ Giderim} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (5)$$

Burada  $C_0$  ve  $C$  sırasıyla elektro-Fenton öncesi ve sonrası mg/L cinsinden KOİ konsantrasyonlarıdır.

Elektrik enerjisi tüketim denklemi (E) (kWh/m<sup>3</sup>) denklem (6) ile, anot tüketimi ise denklem (7) ile hesaplanmıştır (Un ve Oduncu , 2014).

$$E = \frac{U \times I \times t}{V} \quad (6)$$

Burada U; Voltaj (volt), I; akım (A), t; reaksiyon süresi (saniye), V; atık suyun hacmi (L) dir.

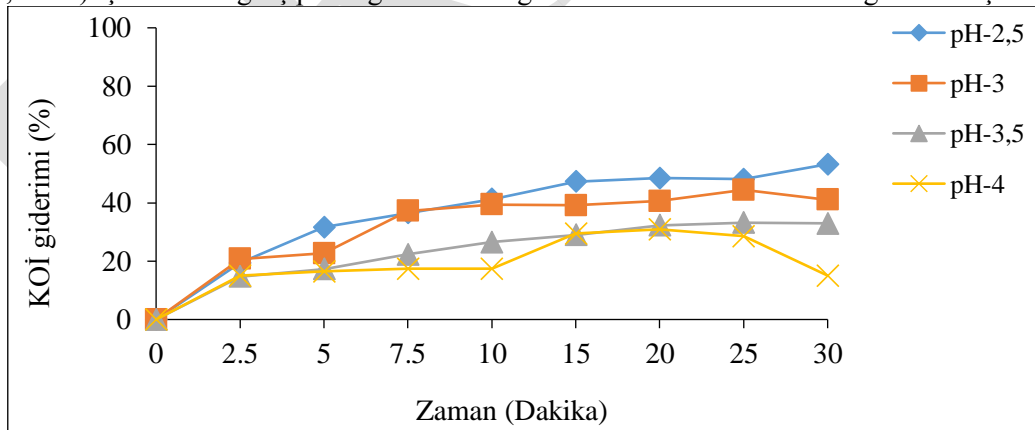
$$m = \frac{M \times I \times t}{z \times F \times V} \quad (7)$$

Burada m; üretilen metal iyonların kütlesi (gram), I; akım (Amper), t; deney süresi (sn), M; metalin molekül ağırlığı (g/mol), z; çözünen elektron sayısı (z =2 Demir için) ve F Faraday sabiti (A.sn/mol) dir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Giriş pH' sının etkisi

pH, Fenton ve elektro-Fenton proseslerinin verimini etkileyen en önemli parametrelerden birisi olup; demir türlerinin oluşumunu ve hidrojen peroksit ayrışmasını etkiler. pH 2-4 aralığında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rejenerasyonu veya reaksiyon oranlarındaki artış nedeniyle hidroksil (OH•) radikallerin üretimi daha yüksektir ( Umar vd., 2010). Çok düşük pH değerlerinde, oluşan [Fe (H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile daha yavaş reaksiyona girerek daha az OH• radikali oluşturur ve düşük pH, Fe<sup>3+</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyonu engelleyebilir. pH 2'den düşük değerlerde H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> iyonları oluştuğundan fenton reaksiyonu kısmi olarak yavaşlar (Deng ve Englehardt, 2006). Ayrıca nispeten yüksek pH değerlerinde elektro-fenton prosesinde anotta üretilen çözünmüş demir iyonları, katotta üretilen OH<sup>-</sup> iyonları ile hidroksit bileşiklerine ya da komplekslerine dönüşerek elektro-Fenton prosesini olumsuz etkiler (Atmaca, 2009). Daha yüksek pH, hidroksil radikallerini süpüren CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> üretimi ile sistemin giderim verimini etkiler; hidroksil radikallerinin oksidasyon potansiyelini azaltır, ferrik hidroksit oluşumu ile Fe<sup>2+</sup> 'yı devre dışı bırakır, H<sup>+</sup> üretimini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin su ve oksijene ayrışmasını azaltır. pH 4 ün üzerinde, ferrik hidroksitin (Fe (OH)<sub>3</sub>) çökmesi meydana gelir (Zhou vd., 2018; Baiju vd., 2018). pH 4'ün üzerinde, alkali koşullar altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oksidasyon reaksiyonlarına herhangi bir katkı yapmaz ve hidroksil radikali üretmez (Umar vd., 2010). Şekil 2' de giriş pH değerinin KOİ giderim verimi üzerine etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2. Giriş pH' sının KOİ giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:50 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, Elektrotlar arası mesafe:10mm)

Şekil 2'de görüldüğü üzere, pH'nın 2.5 ve 3 değerlerinde zamanla giderek artış gösteren verimler elde edildiği, diğer taraftan pH 3.5 ve 4' de verim artış eğilimlerinin daha düşük değerler ile değişim gösterdiği anlaşılmaktadır. Maksimum %53' lük KOİ giderimine pH 2.5 değerinde 30 dakikada ulaşılmıştır. Sızıntı suyu giriş pH'sı 3'ün üstüne yükseltildiğinde ise, çözelti ortamındaki Fe<sup>2+</sup>'nin çözünürlüğünün azalması ve böylece üretilen OH• radikalının miktarının azalması nedeni ile KOİ giderim verimi önemli derecede düşmüştür. Yüksek pH'larda hidrojen peroksitin kararsızlığı ve çözünmeyen demir hidroksokomplekslerin oluşumu KOİ giderim veriminin azalmasını nedeni olabilir (Baiju vd., 2018). 30 dakikalık EF sonrasında 2.5,

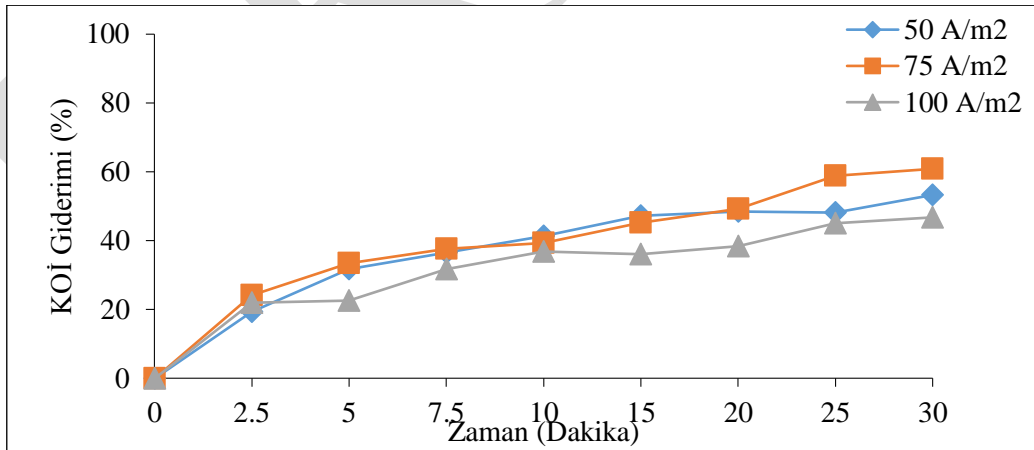
3, 3.5 ve 4 lük giriş pH değerleri için sırasıyla en yüksek KOİ giderim verimleri sırası ile %53.24, %44.44, %33.18 ve %30.92 olarak bulunmuştur. Literatürde Wang ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları çalışmada pH 2' de KOİ gideriminin pH 3 ve pH 4' e kıyasla daha etkili olduğunu Altin (2008) yapmış olduğu çalışmada pH 2.5 değerinin KOİ gideriminde optimum değer olduğunu gösteren benzer sonuçlara ulaşılmışlardır. Sistemin diğer aşamaları için giriş pH değeri 2.5 olarak belirlenmiştir.

### Akım Yoğunluğunun Etkisi

Elektro-Fenton yönteminin diğer önemli işletme parametresi uygulanan akım yoğunluğudur. Elektrotlara uygulanan akım arttıkça, fenton oksidasyonu için gereken Fe<sup>2+</sup> üretimi artar bu da OH• radikalleri üretmek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ayrışmasını artırır (Atmaca 2009;Wang vd., 2019). Fe<sup>2+</sup> üretiminin yetersiz olması oksidasyon veriminin düşmesine neden olmaktadır. Aşırı miktarda anotta Fe<sup>2+</sup> üretimi ise hem radikal süpürücü etki yaparak reaksiyon veriminin düşmesine yol açmakta, hem de tehlikeli atık sınıfında bulunan kimyasal arıtma çamurunun oluşumunu arttırmaktadır (Şahinkaya, 2017).Yüksek DC akım uygulanması halinde elde edilen verim önemli ölçüde değişmezken, sistemin enerji tüketimi artar. Bu yüzden, sistemde kullanılacak akım yoğunluğunun kesin olarak belirlenmesi gerekmektedir (Atmaca, 2009). Sistemin optimum akım yoğunluğunun belirlenmesi için pH: 2.5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 2000 mg/L, elektrotlar arası mesafe: 10 mm deneysel koşullar altında 50 - 75 ve 100 A/m<sup>2</sup> için elektro-Fenton deneyleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 3' te gösterilmiştir. Şekil 3'te görüldüğü üzere sistemin akım yoğunluğu 50 A/m<sup>2</sup> den 75 A/m<sup>2</sup> ye çıkarıldığında KOİ gideriminde 20. dakikadan sonra önemli bir artış olduğu görülmüş ve 30. dakikada KOİ giderimi %60.88 'e ulaşmıştır. Akım yoğunluğu 100 A/m<sup>2</sup> ye çıkarıldığında KOİ giderim verimindeki artış daha düşük seviyelerde gerçekleşmiştir. Bu durum oluşan fazla Fe<sup>2+</sup> iyonları ile reaksiyona girebilecek kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kalmadığının işareti olarak düşünülmüştür. Fe<sup>2+</sup> oluşumunun aşırı miktarda olması süpürücü etki yaparak reaksiyon veriminin azalmasına neden olur (Şahinkaya, 2017). Panizza ve Cerisola (2009) yapmış olduğu çalışmada artan akım yoğunluğu ile KOİ gideriminin arttığını, Wang ve arkadaşları (2008) yapmış oldukları gerçek boya atık sularından renk giderimi çalışmasında akım yoğunluğunun artmasıyla renk giderimin arttığını bulmuşlardır. Sahinkaya (2013) ise tekstil atık sularından yaptığı KOİ ve renk giderim çalışmasında uygulanan akım bir noktadan sonra verimin artışında etkisinin olmadığını bildirmiştir. Çok yüksek akımlarda anotta oksijenin deşarjı (8) ve katotta hidrojen gazının gelişimi ortaya çıkmaktadır.



Bu reaksiyonlar ana reaksiyonlar olan (9) ve (10) gibi reaksiyonları engellemektedir bu da elektro-Fenton'un veriminde düşüşe neden olmaktadır (Nidheesh ve Gandhimathi, 2012).



Şekil 3. Akım yoğunluğunun KOİ giderimi üzerine etkisi (Anot: Demir, Akım yoğunluğu:50 A/m<sup>2</sup>, pH:2.5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L)

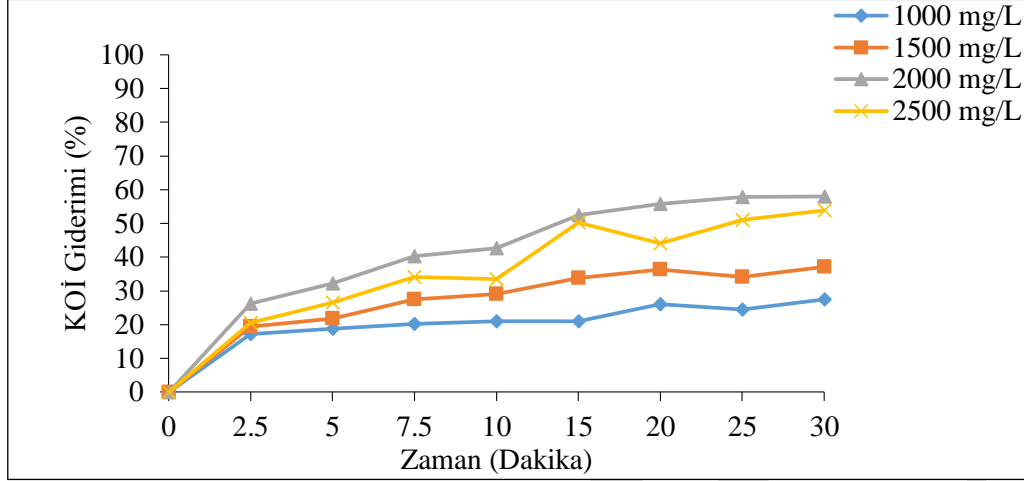
### Giriş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun etkisi

OH• radikallerinin ana kaynağı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'dir. Bununla birlikte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketiminin (1), (11) ve (12) de gösterilen reaksiyonlarla artması EF yönteminin verimliliğini belirleyen en önemli faktörlerden biridir (Atmaca, 2009).



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin fazla miktarda kullanılması hem arıtma maliyetini artırmakta hem de oksidasyonu gerçekleştiren OH• radikallerinin süpürülmesine neden olduğu için, optimize edilmesi gerekmektedir (Şahinkaya, 2017).

Giriş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu ve giderim verimliliği arasındaki sonuçlar Şekil 3'te gösterilmiştir. Sistemin optimum H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunu belirlemek için, diğer koşullar sabit tutularak (pH:2.5 akım yoğunluğu 75 A/m<sup>2</sup>, elektrotlar arası mesafe: 10mm) 1000-2500 mg/L aralığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu denenmiştir. Şekil 3'te görüldüğü üzere, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu arttıkça, KOİ giderim veriminin de önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. KOİ giderim verimleri 2000 ve 2500 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları için sırası ile %58 ve %53 olarak bulunmuştur. Maksimum KOİ giderim verimine 2000 mg/L' de ulaşıldığı için optimum değer seçilerek diğer aşamaya geçilmiştir.



Şekil 4. Giriş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun KOİ giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:75 A/m<sup>2</sup>, pH:2,5 Elektrotlar arası mesafe:10mm)

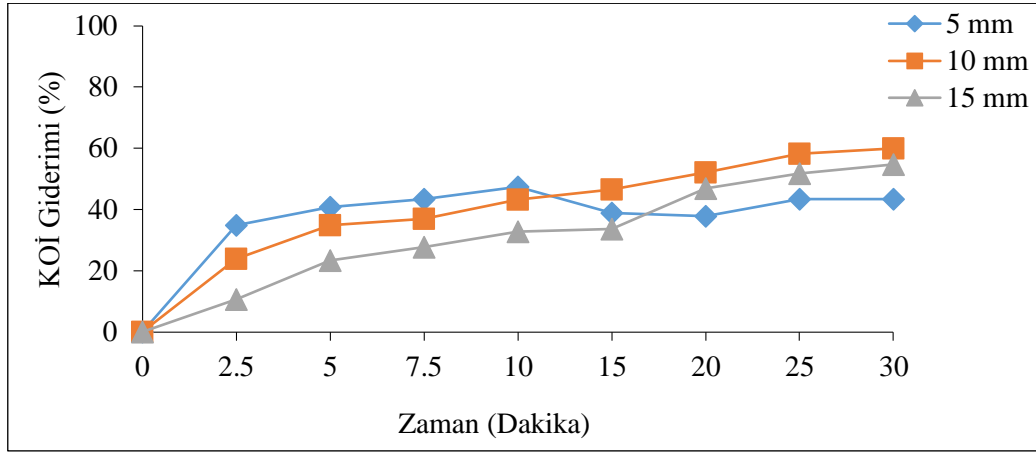
#### Elektrotlar Arası Mesafenin Etkisi

Elektrotlar arasındaki mesafe, sistem potansiyelini ve enerji tüketimini yönettiği için elektro-Fenton süreçlerinin genel verimliliğini etkiler. Elektro-Fenton reaksiyonlarında katılan iyonların hareket süresi elektrotlar arasındaki mesafenin artışıyla artar. Bunun sonucunda sistemde daha uzun süreli elektroliz gerçekleşmesi ile sistem verimi olumsuz etkilenir ( He & Zhou, 2017). Elektrotlar arası mesafenin artması, sistemin enerji tüketimini artırır. Bu nedenle, düşük enerji tüketimi için elektrotlar arası mesafe minimuma yakın optimum olarak belirlenmelidir (Atmaca, 2009). Şekil 5'te elektrotlar arası mesafenin KOİ giderimi üzerine etkisi gösterilmiştir. 5, 10 ve 15 mm lik elektrotlar arası mesafeler için maksimum KOİ giderim verimleri sırası ile %47.39, %60.00 ve %54.68 olarak bulunmuştur. Şekil 5'ten görüldüğü üzere, elektrotlar arası mesafe 5 mm den 10 mm ye çıkarıldığında KOİ giderim verimleri artarken, 15 mm ye çıkarıldığında ise azalmıştır. Elektrotlar çok yakın yerleştirildiğinde, anotta Fe<sup>2+</sup> kolayca Fe<sup>3+</sup>'e oksitlenebilir. Oluşan Fe<sup>3+</sup> ün H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyonu sonucu oksidasyon potansiyeli OH• radikali göre daha az olan ve Fe<sup>2+</sup> ile reaksiyon hızı düşük olan HO<sub>2</sub> oluşur. Her iki durumda elektro-Fenton prosesinin veriminde düşüş olabilir ( He ve Zhou, 2017; Martı'nez-Huitle ve Brillas, 2009; Moreira vds., 2017).



Elektrotlar arası mesafe 10 mm'den 15 mm'ye çıkarıldığında giderim veriminde yaklaşık %5'lik bir azalma söz konusudur. Elektrotlar arası mesafe 10 mm den 15 mm ye çıkarıldığında ohmik düşüş ve Fe<sup>3+</sup> transferindeki azalma verimin düşmesine neden olmuştur (Malakootian, 2017). Malakootian, (2017) yapmış olduğu çalışmada, elektrotlar arası mesafenin 1 cm'den 4 cm'ye çıkartıldığında giderim veriminde %11.35 lik bir azalma gözlemlenmiştir. Literatürde EF ile renk giderim çalışmasında Malakootian ve Moridi, 2017 yaptığı çalışmada elektrotlar arası mesafe arttıkça verimin düştüğünü, He ve Zhou (2017) yapmış oldukları çalışmada elektrotlar arası mesafe olarak 0.7 cm ile 1.3 cm denenmiş sırasıyla KOİ giderimlerini %73,6 ve %80,4 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada düşük enerji tüketimi ve daha yüksek KOİ giderimine ulaşıldığı için 10 mm optimum mesafe olarak seçilmiştir.

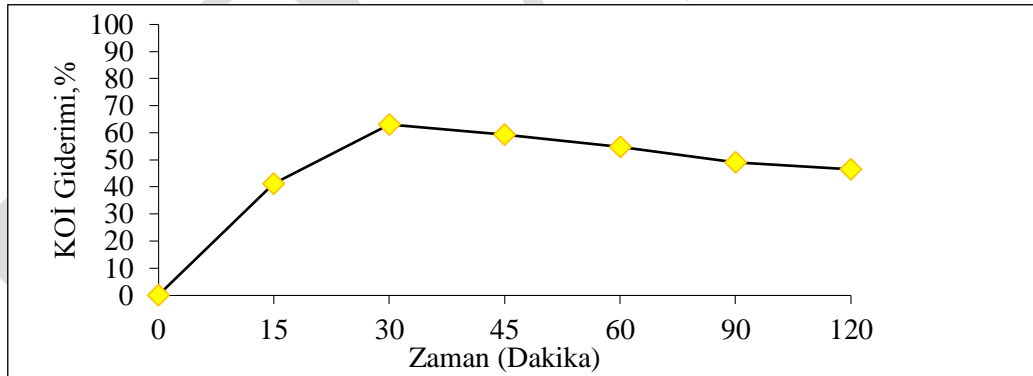




Şekil 5. Elektrotlar arası mesafenin KOİ giderimi üzerine etkisi (Anot: Demir, Akım yoğunluğu:75 A/m<sup>2</sup>, pH:2,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L)

### Reaksiyon Süresinin Etkisi

Reaksiyon süresinin artışı ile Fe<sup>2+</sup> iyonlarının miktarı artarken, reaksiyona girecek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları düşmekte bir yandan da artı kalan demir iyonları KOİ oluşturmaktadır. Bu bakımdan optimum EF süresinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Önceki aşamalarda belirlenen işletme koşulları ile optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi çalışılmıştır. Oksidasyon reaksiyonunun tamamlanma süresi büyük ölçüde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dozajına bağlıdır, dolayısıyla oksidasyon reaksiyonundaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketim noktası, oksidasyon bitiş noktası olarak adlandırılabilir ( Umar vd., 2010). Şekil 6' da görüldüğü üzere sızıntı suyunda bulunan organik maddeler ilk 30 dakikada büyük ölçüde çözülmüş daha sonra kademeli olarak bu çözünme azalmaya başlamıştır. İlk 30 dakikadaki hızlı bozunmanın nedeni sızıntı suyundaki kolay bozunabilen organik maddelerin varlığından kaynaklanmaktadır ( Umar vd., 2010). İlk 30 dakikadaki KOİ giderim veriminin %63 gibi yüksek seviyede olmasının sebebi ortamda bol miktarda Fe<sup>2+</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunmasıdır (Şahinkaya, 2017). Bu bileşenlerin ortamda azalması ile Şekil 6' dan da anlaşılacağı üzere KOİ giderimi azalmıştır. Reaksiyon süresi arttıkça ortamda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin kalmaması ve Fe<sup>2+</sup> üretiminin sürekli artması sistemin verimini düşürmüştür. Çünkü oluşan fazla demir iyonlarının da yüksek KOİ ölçümüne neden olacağı bilinmektedir.



Şekil 6. Reaksiyon süresinin KOİ giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:75 A/m<sup>2</sup>, pH:2,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, E.A.M.=10mm)

### MALİYET HESABI

Maliyet hesapları optimum koşullar (pH:2,5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu:2000 mg/L, akım yoğunluğu 75 A/m<sup>2</sup>, elektrotlar arası mesafe 10 mm ve reaksiyon süresi 30 dakika) ile hesaplanmıştır. Hesaplama atık suyun pH ayarlaması için kullanılan kimyasallar dâhil edilmemiştir. Dolar kuru 1\$=5.9 TL olarak alınmıştır.

Elektrik sarfiyatı optimum koşullarda 1,09267 kW/m<sup>3</sup> olarak hesaplanmış birim elektrik fiyatı Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu tarafından 2019 yılı nisan ayı tek terimli mesken aboneleri için görevli tedarik şirketi kullanıcılar için 0,434451 TL/kWh olarak belirlenmiştir (Enerjiportalı, 2019).

$1.09267 \text{ kWh/m}^3 \times 0,434451 \text{ TL/kWh} = 0.4747 \text{ TL/m}^3 = 0,080 \text{ \$/m}^3$   
Anotta tüketilen demir miktarı  $0.51744 \text{ kg/m}^3$  hesaplanmış ve gr Fe (>%99.9 demir) fiyatı  $0,0006 \text{ \$}$  (Ozyonar ve Karagozolu, 2014)' dir.  
 $0.51744 \text{ kg/m}^3 \times 0,0006 \text{ \$} = 0,0003 \text{ \$/m}^3$   
1 L  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı 130 TL dir. Kullanılan  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2000 \text{ mg/L} = 5.05 \text{ ml}$ ,  $0,16702794 \text{ \$}$   
Kullanılan  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının fiyatı:  
 $5.05 \text{ ml}$  için fiyat  $0,65 \text{ TL/L} \times 1000 \text{ L} = 650 \text{ TL/m}^3 \Rightarrow 110.16 \text{ \$/m}^3$   
Toplam maliyet  $110.25 \text{ \$/m}^3$  ve 1 kg KOİ için  $9.71 \text{ \$}$  olarak hesaplanmıştır.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada sızıntı suyundan elektro-Fenton yöntemi ile KOİ gideriminin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimum deneysel koşullarda (pH:2.5, akım yoğunluğu:  $75 \text{ A/m}^2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonu:  $2000 \text{ mg/L}$ , elektrotlar arası mesafe:  $10 \text{ mm}$  ve reaksiyon süresi:  $30 \text{ dakika}$ ) maksimum % 63 lük KOİ giderimine ulaşılmıştır. Sistemin toplam maliyeti  $110.25 \text{ \$/m}^3$  ve 1 kg KOİ başına  $9.71 \text{ \$}$  olarak bulunmuştur.  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun sistem veriminde ve maliyetinde rolünün oldukça fazla olduğu anlaşılmıştır. Ulaşılan KOİ giderim verimleri ile, Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği Tablo 20.6 ile öngörülen deşarj limitlerinin karşılanmadığı anlaşılmış olup elektro-Fenton yönteminin, sızıntı sularının arıtılmasında biyolojik arıtma öncesi ya da sonrasında kullanılabileceği öngörülmektedir. Elektro-Fenton prosesi biyolojik parçalana bilirliği düşük ve toksik özellikteki sızıntı sularının ön arıtımında oldukça etkili olduğu değerlendirilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.MUH.1904.18.011 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Altin, A. (2008). An alternative type of pHotoelectro-Fenton process for. *Separation and Purification Technology*, 391–397.
- Atmaca, E. (2009). Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method. *Journal of Hazardous Materials*, 109–114.
- Baiju, A., Gandhimathi, R., Ramesh, S., & Nidheesh, P. (2018). Combined heterogeneous Electro-Fenton and biological process for. *Journal of Environmental Management*, (210):328-337.
- Deng, Y., & Englehardt, J. (2006). Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Science Direct*, 3683 – 3694.
- Enerjiportali. (2019, 4 16). <https://www.enerjiportali.com/>
- Gönüllü, M. T., Arslankaya, E., Apaydin, Ö., Kurt, U., & İlhan, F. (2008). Sızıntı Sularının Elektrokoagülasyon Yöntemiyle Arıtılması (Rapor No:4). *Tübitak*, İstanbul
- He , H., & Zhou, Z. (2017). Electro-Fenton process for water and wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and*.
- Kattel, E., Trapido, M., & Dulova, N. (2016). Treatment of landfill leachate by continuously reused ferric. *Chemical Engineering Journal*, 646–654.
- Malakootian, M., & Moridi, A. (2017). Efficiency of electro-Fenton process in removing. *Process Safety and Environmental Protection*, 138–147.
- Martínez-Huitle, C., & Brillas, E. (2009). Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by. *Applied Catalysis B: Environmental*, (87):105–145.
- Mohajeri, S., Aziz, H. A., Isa, M. H., Zahed, M. A., & Adlan, M. N. (2010). Statistical optimization of process parameters for landfill leachate treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 749–758.
- Moreira, F., Boaventura, R., Brillas, E., & Vilar, V. (2017). Electrochemical advanced oxidation processes: A review on their. *Applied Catalysis B: Environmental*, (202):217–261.
- Nidheesh, P., & Gandhimathi, R. (2012). Trends in electro-Fenton process for water and wastewater treatment: An overview. *Desalination*, (299):1-15. on the advanced oxidation treatment. *Water Research*, (88):389-402.
- Orkun, M., & Kuleyn, A. (2010). Treatment performance evaluation of chemical oxygen demand from landfill leachate by electro-coagulation and electro-fenton technique. *Wiley Online Library* , doi: 10.1002/ep.10522 .

- Ozyonar, F., & Karagozoglul, B. (2014). Investigation of technical and economic analysis of electrocoagulation process for the treatment of great and small cattle slaughterhouse wastewater. *Desalination and Water Treatment*, (52) : 74-87.
- Panizza, M., & Cerisola, G. (2009). Electro-Fenton degradation of synthetic dyes. *ScienceDirect*, (43):339–344.
- Sahinkaya, S. (2013). COD and color removal from synthetic textile wastewater by ultrasound assisted. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, (19):601-605.
- Suresh, A., Pieus T., M., & Soloman, P. (2016). Treatment of Landfill Leachate by Membrane Bioreactor and Electro Fenton Process. *International Journal of Engineering Sciences & Research Technology*, 689-697.
- Şahinkaya, S. (2017). Plastik geri dönüşüm tesisi atıksularının. *Mühendislik Dergisi Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi*, 631-639.
- Umar, M., Aziz, H. A., & Yusoff, M. S. (2010). Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and pFoto-Fenton for the treatment. *Waste Management*, 2113–2121.
- UN, U. T., & Oduncu, E. (2014). Electrocoagulation of Landfill Leachate with Monopolar. *Journal of Clean Energy Technologies*. 2(1):15-17
- Wang, C.-T., Hu, J.-L., Chou, W.-L., & Kuo, Y.-M. (2008). Removal of color from real dyeing wastewater by Electro-Fenton. *ScienceDirect*, (152):601–606.
- Wang, Z., Li, J., Tan, W., Wu, X., Lin, H., & Zhang, H. (2019). Removal of COD from landfill leachate by advanced Fenton process. *Separation and Purification Technology*, 3–11.
- Zhang, H., Zhang, D., & Zhou, J. (2006). Removal of COD from landfill leachate by electro-Fenton method. *Journal of Hazardous Materials*, 106-111.
- Zhou, Oturan, & Sirés. (2018). *Electro-Fenton Process New Trends and Scale-Up*. Singapore: Springer.

## Characterization of Georgian natural phillipsites

Nanuli Dolaberidze<sup>1\*</sup>, Vladimer Tsitsishvili<sup>1</sup>, Marinela Panayotova<sup>2</sup>, Nato Mirdzveli<sup>1</sup>, Manana Nijaradze<sup>1</sup>, Zurab Amiridze<sup>1</sup>, Tekla Kapanadze<sup>1</sup>, Ketevan Virsaladze<sup>1</sup>

<sup>1</sup>TSU Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry, Tbilisi, Georgia.

<sup>2</sup>University of Mining and Geology, Sofia, Bulgaria.

\*Corresponding author e-mail: n\_dolaberidze@yahoo.com

### Abstract

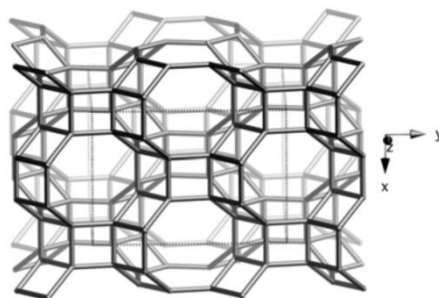
Phillipsite-containing Eocene rocks were discovered in Georgia at the northern fringe of the Akhaltsikhe depression, along with other zeolites, and in the Gurian range, near Shukhuti village. Zeolite phase of Akhaltsikhe deposit (PA) is not typical for the sedimentary tuffs from saline alkali lakes due to comparatively high content of calcium and magnesium, its content in rocks differs in a range of 60-70%, major impurities are chlorite and montmorillonite. The Shukhuti phillipsite (PS) is characterized by high content of potassium, zeolite phase content differs from 60% (lower plot) to 80% (upper plot), main impurity is heulandite. Powder X-ray diffraction patterns of PA and PS are in a good agreement with Breck's data for natural phillipsite from Nevada, USA, and with the pattern of synthetic sample (P). Water adsorption capacity of micropores ( $p/p_s=0.40$ , 20°C) is in the range of 5.2 (PS, upper plot) to 7.25 mmol/g (PS, lower plot), comparable with the capacity of the synthetic sample (7.83 mmol/g). The total pore volume in PA takes 0.32 cm<sup>3</sup>/g, pore system is well developed and differentiated: distribution curve  $V(r)$  shows maximums at 1000 (0.21 cm<sup>3</sup>/g) and 200 nm (0.06 cm<sup>3</sup>/g), a broad peak corresponds to the mesopores with radii in the range of 20-60 nm (0.035 cm<sup>3</sup>/g); PS samples are characterized by macropores (100-4000 nm, 0.28 cm<sup>3</sup>/g) and mesopores (4-100 nm, 0.02 cm<sup>3</sup>/g). Total ion exchange capacity (2.6-3.3 for PA, 2.2-3.2 meq/g for PS) is less than measured for P (4.5 meq/g), ion exchange isotherms prove high selectivity of both zeolites towards NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, but the selectivity series are different: K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> >> Ca<sup>+2</sup> > Mg<sup>+2</sup> for PA, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> >> Ca<sup>+2</sup> > Mg<sup>+2</sup> for PS. There are considerable differences between thermal properties of studied phillipsites: crystal structure of PA is destroyed at 400°C, PS samples preserve the metaphillipsite structure to 500-550°C.

**Keywords:** Microporous crystal structure, Mesopores, Metaphillipsite.

### INTRODUCTION

Application of zeolites described in recent reviews (Li et al., 2017; Bacakova et al., 2018) is based on the complex of their properties due to the chemical composition (M<sup>n+</sup><sub>x/n</sub>[(SiO<sub>2</sub>)(AlO<sub>2</sub>)<sub>x</sub>]·wH<sub>2</sub>O, were M=Na, K, Ca, Mg, etc.) and open framework uniform structures constructed from alternating SiO<sub>4</sub> and AlO<sub>4</sub><sup>-</sup> tetrahedrons (Baerlocher et al., 2007).

Zeolite phillipsite has crystal chemical formula [K<sub>2</sub> (Ca,Na<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>] [Al<sub>6</sub>Si<sub>10</sub>O<sub>32</sub>]-PHI and is structurally built up by layers of four- and eight-member rings (Fig. 1) forming double crankshaft chains, the framework contains three systems of channels parallel to a, b and c : [100] **8** 3.8 x 3.8\* ↔ [010] **8** 3.0 x 4.3\* ↔ [001] **8** 3.2 x 3.3\*.



**Figure 7.** Phillipsite framework viewed along [001]

Phillipsite was first recognized in the Pacific Ocean sediments during the expedition of the H.M.S. Challenger (1872-76). Phillipsite in the SE Pacific Ocean and in some areas of the Indian Ocean ranges from 3 to 12% (by weight) in siliceous sediments while in calcareous sediments phillipsite could be up to 50% (Iyer et al., 2018). According to chemical analyzes of different samples (Sheppard et al., 1970), oceanic phillipsites have Si/Al=2.3-2.8, while terrestrial hydrothermal phillipsites are low-silica (Si/Al=1.3-2.4) and phillipsites from

sediments of saline alkali lakes are high-silica ( $\text{Si}/\text{Al}=2.6\text{-}3.4$ ). The cationic composition of phillipsite varies over rather wide ranges, but it is one of the few zeolites in which potassium may be the most abundant exchangeable cation.

Application of phillipsite is not so wide comparing to clinoptilolite, but it was used for ammonia adsorption (Sherman and Ross, 1982) and removal of various heavy metals from waste waters (Kallo, 2001), the calcium-enriched phillipsites are found to exhibit the ability to adsorb humic acids (Bhatnagar, 2012), and it was shown that phillipsite is effective in removal of picolines from aqueous solution in the broad range of concentrations (Rawajfih et al., 2010). In our early research (Tsitsishvili et al., 2008), it was shown that unprocessed natural phillipsite from Shukhuti is inert to *E. coli* and *Staphylococcus aureus*, while acid-treated samples show high bactericidal activity, recently we prepared silver- and zinc-containing bactericidal phillipsites (Dolaberidze et al., 2018). Pylev et al. (1980) reported on the carcinogenicity of phillipsite, but the International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluated their study as inadequate (Anonymous, 1997).

Phillipsite-containing Eocene rocks were discovered in Georgia firstly at the northern fringe of the Akhaltsikhe depression, along with other zeolites, and then in the Gurian range (Skhirtladze, 1997). Chemical composition of the Akhaltsikhe phillipsite is not typical for the sedimentary tuffs from saline alkali lakes due to comparatively high content of calcium and magnesium. Zeolite phase content in rocks of Akhaltsikhe deposit, upper and lower Tsinubani plots, differs in a range of 60-70%, major impurities are chlorite and montmorillonite (Tsitsishvili et al., 1999). The Shukhuti phillipsite is characterized by high content of potassium like other K-series rocks of the Gurian range. Zeolite phase content differs from 60% (lower plot) to 80% (upper plot), main impurity in yellow-green samples is heulandite.

Adsorption and thermal properties of the phillipsite samples were described earlier (Tsitsishvili et al., 1998), but research continued, and the purpose of our contribution is to give a more complete characterization of the natural phillipsites of Georgia.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Phillipsite samples were collected at the lower Tsinubani plot of the Akhaltsikhe deposit and named PA, samples from the upper and lower plots of the Shukhuti manifestation are named PSu and PSI, respectively. The mechanical grinding of tuff in the planetary micro mill (Pulverisette 7, Fritsch Laboratory Instruments, Idar-Oberstein, Germany) to obtain necessary fractions was followed by washing of crushed and sieved rock in diluted HCl solution (0.025 N) to remove clay and other impurities.

### Instrumentation

Chemical composition of samples was determined by elemental (atomic absorption spectrometer 300, Perkin-Elmer, UK) and energy dispersive (ED) X-ray analyses. Powder X-ray diffraction patterns were obtained from a modernized Dron-4 X-ray diffractometer (Russia) employing the Cu-K $\alpha$  line and scanning in the 2 $\theta$  range of 5° to 50° with a 0.02° step at a scanning speed of 1°/min. FTIR spectra were collected by a 10.4.2 spectrometer (Perkin-Elmer, UK) over the range of 400–4000 cm<sup>-1</sup> with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup> using the KBr pellet technique for sample preparation. Thermal analyses were performed on a OD-102 thermal analyzer (Paulik-Paulik-Erdei, Hungary), at a heating rate of 10°C/min. A mercury porosimeter (PA-3M-1, Russia, measuring range from 3.1 to 35000 nm) was used to characterize the porosity of materials. The surface morphology of the samples was observed by scanning electron microscope JSM6510LV (Jeol, Japan) equipped with X-Max 20 analyzer (Oxford Instruments, UK) for ED spectra. Nitrogen adsorption-desorption isotherms were measured at 77 K using an ASAP 2020 Plus physisorption analyzer (Micromeritics, Norcross, GA, USA), after evacuation of the samples at 350°C during 2 hours; water adsorption capacity was measured under static conditions.

## RESULTS

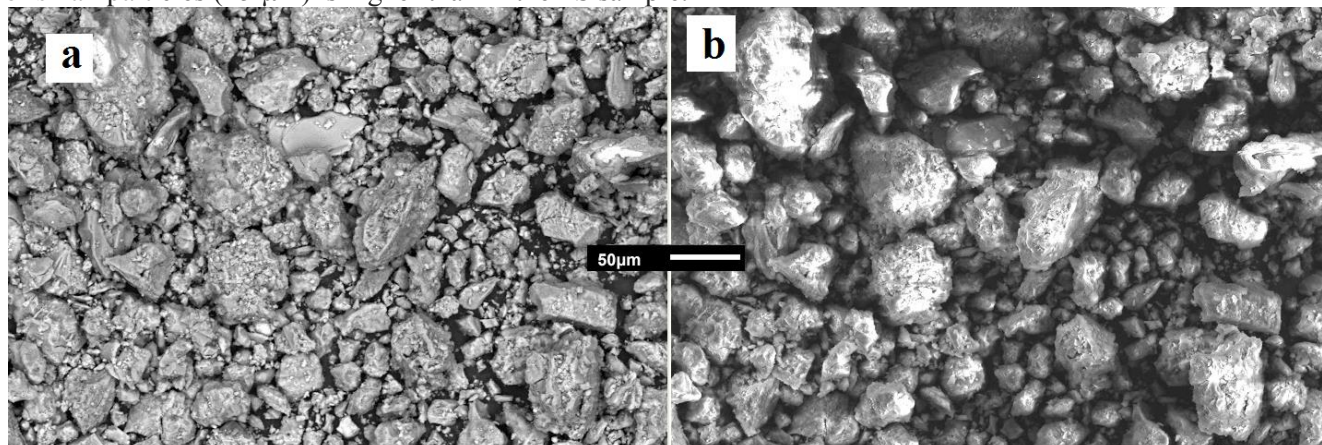
### Chemical composition

According to the data of analyzes and EDS, chemical composition of PA is described by empirical formula  $(\text{Na}_{1.36}\text{K}_{0.7}\text{Ca}_{0.7}\text{Mg}_{0.32})\text{Me}_{0.10}[\text{Al}_{4.2}\text{Si}_{11.5}\text{O}_{32}]\cdot 11.2\text{H}_2\text{O}$ , Me =  $\frac{1}{3}\text{Fe}^{3+}$ ,  $\frac{1}{2}\text{Cu}^{2+}$ ,  $\frac{1}{2}\text{Mn}^{2+}$ , etc.

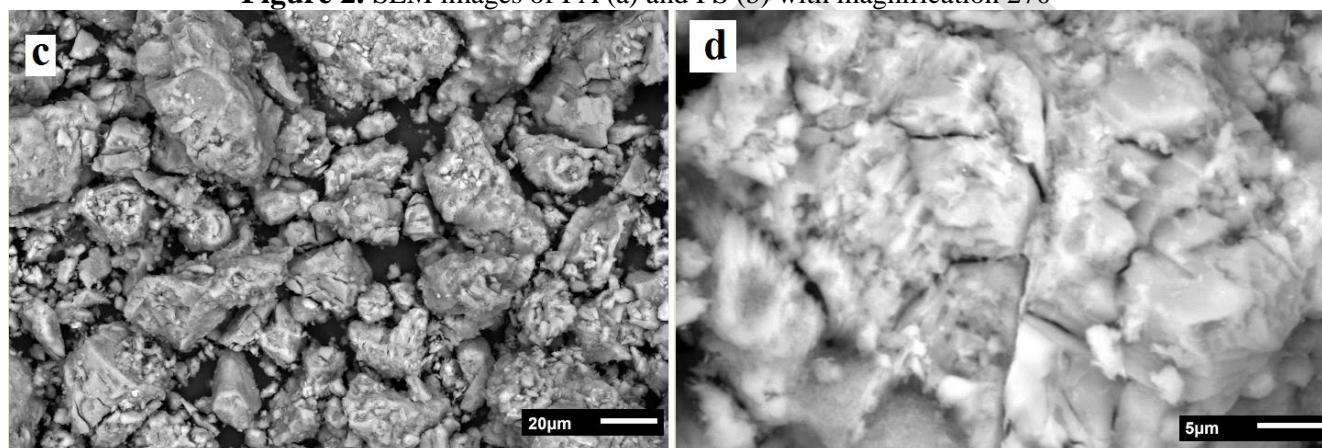
Chemical composition of PS corresponds to formula  $(\text{Na}_{1.30}\text{K}_{2.0}\text{Ca}_{0.30}\text{Mg}_{0.25})\text{Me}_{0.10}[\text{Al}_{4.50}\text{Si}_{11.80}\text{O}_{32}]\cdot 11.4\text{H}_2\text{O}$ . The Si/Al ratio value (2.6-2.7) and relatively high sodium content in both samples indicate the sedimentary origin of the rock; water content is in a good accordance with accepted crystal chemical formula with 12H<sub>2</sub>O molecules.

### SEM images

SEM images of mechanically ground samples are shown in Figure 2. Dispersion degree of the material is rather high, especially for the PA sample: the size of the largest crystallites does not exceed 50  $\mu\text{m}$ , and the amount of small particles ( $<5 \mu\text{m}$ ) is higher than in the PS sample.



**Figure 2.** SEM images of PA (a) and PS (b) with magnification 270

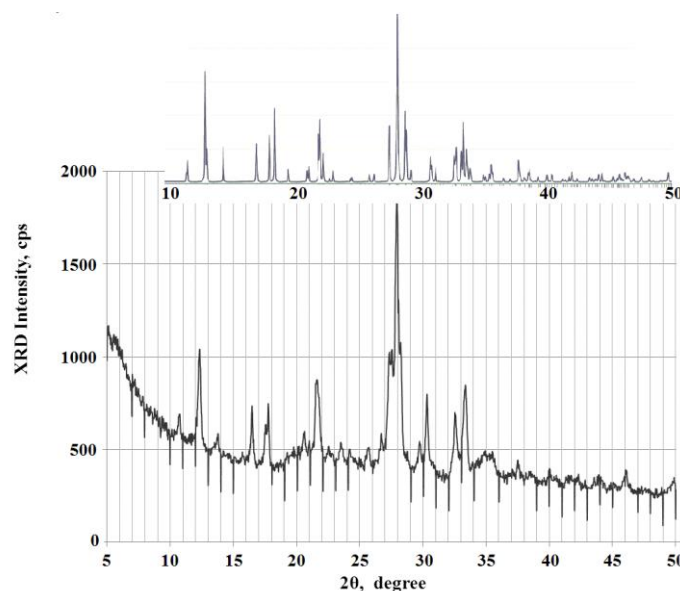


**Figure 3.** SEM images of PS with magnification 550 (c) and 2700 (d)

The size of the largest crystallites in PS is up to 100 – 120  $\mu\text{m}$ , but they are built from relatively small ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) aggregated crystallites (Figure 3).

### X-ray diffraction patterns and IR spectra

Powder X-ray diffraction patterns of Georgian phillipsites are in a good agreement with Breck's data for natural phillipsite from Nevada, USA (Tsitsishvili et al., 1998), and with the simulated pattern taken from the "Database of Zeolite Structures" of the International Zeolite Association Structure Commission (Figure 4), X-ray diffraction characteristics are given in Table 1.



**Figure 4.** X-ray diffraction pattern of PS with magnification 550 (c) and 2700 (d)

**Table 1.** Miller indices,  $2\theta$  angles, and relative intensities in powder XRD patterns of phillipsites

hkl	$2\theta$ ( $^\circ$ )	PA	PSu	PSI
-101	10.9	12	<10	<10
001	12.3	43	56	73
011	13.8	30	23	18
120	16.5	23	<10	45
-201 + 021	17.9	56	36	28
-211	19.0	15	<10	<10
-112 + 111	21.6	28	15	61
-221	21.8	14	<10	<10
140	27.2	37	35	40
022+041	27.9	100	100	100
-311	28.5	40	53	37
-321	30.5	30	<10	28
102	32.4	35	46	<15
112+150	33.0	27	48	23
-223	33.4	<10	16	16

FTIR spectra show the peak at  $440\text{ cm}^{-1}$  assigned to internal T-O bend vibration, peaks at  $530$  and  $600\text{ cm}^{-1}$  (double ring vibration), peaks between  $660$ - $800\text{ cm}^{-1}$  and  $1000$ - $1200\text{ cm}^{-1}$  assigned to symmetric and asymmetric T-O-T stretching vibration, broad band in the region of  $3200$  –  $3600\text{ cm}^{-1}$  – asymmetric stretching of OH group and the bend at  $1650\text{ cm}^{-1}$  – bending vibration of H-OH, all typical for the zeolite structure.

#### Sorption properties and mesopores

Room temperature water adsorption capacity of micropores at the “plateau” pressure ( $p/p_0=0.40$ ) is in the range of  $0.094\text{ cm}^3/\text{g}$  (PSu) to  $0.130\text{ cm}^3/\text{g}$  (PSI), comparable with the capacity of the synthetic sample ( $0.140\text{ cm}^3/\text{g}$ ). Total water adsorption capacity ( $p/p_s=1$ )  $0.285\text{ cm}^3/\text{g}$ , which is close to the total pore volume  $0.278\text{ cm}^3/\text{g}$ , determined from the low-temperature  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherms.

The total volume of meso and macropores measured by mercury porosimetry is higher and takes  $0.32\text{ cm}^3/\text{g}$  for the PA sample, and  $\sim 0.30\text{ cm}^3/\text{g}$  for the PS samples.

According to the mercury porosimetry data, a system of the macropores in PA is well developed and differentiated: distribution curve  $V(r)$  shows maximums at the radius of  $1000\text{ nm}$  (total volume in the range of  $800$ - $2000\text{ nm}$  is  $0.21\text{ cm}^3/\text{g}$ ) and at the radius of  $200\text{ nm}$  ( $0.06\text{ cm}^3/\text{g}$ ), a broad peak on this curve corresponds to the mesopores with radii in the range of  $20$ - $60\text{ nm}$  taking comparatively small total volume of  $0.035\text{ cm}^3/\text{g}$ . On contrary, the PS samples having nearly the same total volume of meso and macropores, are characterized by a broad distribution of macropores in a range of  $100$ - $4000\text{ nm}$  with specific volume of  $0.28\text{ cm}^3/\text{g}$ ; the total volume of mesopores with radii in the range of  $4$ - $100\text{ nm}$  also is rather low – of  $0.02\text{ cm}^3/\text{g}$ .

The nitrogen adsorption-desorption isotherms on PS samples (Dolaberidze et al., 2018) demonstrate a hysteresis loop with a jump at  $p/p_0 = 0.4-0.5$  indicating the presence of mesopores. According to common definitions (Sing et al., 1985), observed H<sub>3</sub> type hysteresis loop corresponds to slit-shaped pores in non-rigid aggregates of particles, but at high pressures the hysteresis looks like H<sub>1</sub> type loop associated with filling of well defined cylindrical pore channels. Average pore diameter of mesopores, calculated by the Barrett-Joyner-Halenda method using adsorption and desorption isotherm, is 22.0 and 54.4 nm, respectively.

#### Ion exchange properties

The total ion exchange capacity evaluated from the results of chemical analysis is in the range of 2.6-3.3 meq/g for PA, and 2.2-3.2 meq/g for PS, at least by 30% lower in comparison to 4.5 meq/g for the synthetic sample P applied for preparation of surfactant-modified material (Tsitsishvili et al., 2003).

Cation exchange capacities of sodium-, potassium-, and ammonium-enriched forms prepared from natural phillipsites are given in the Table 2; the sample PS characterized by high content of potassium in nature, demonstrates the highest capacity not only in relation to potassium.

**Table 2.** Cation exchange capacities (CEC) of phillipsite cationic forms

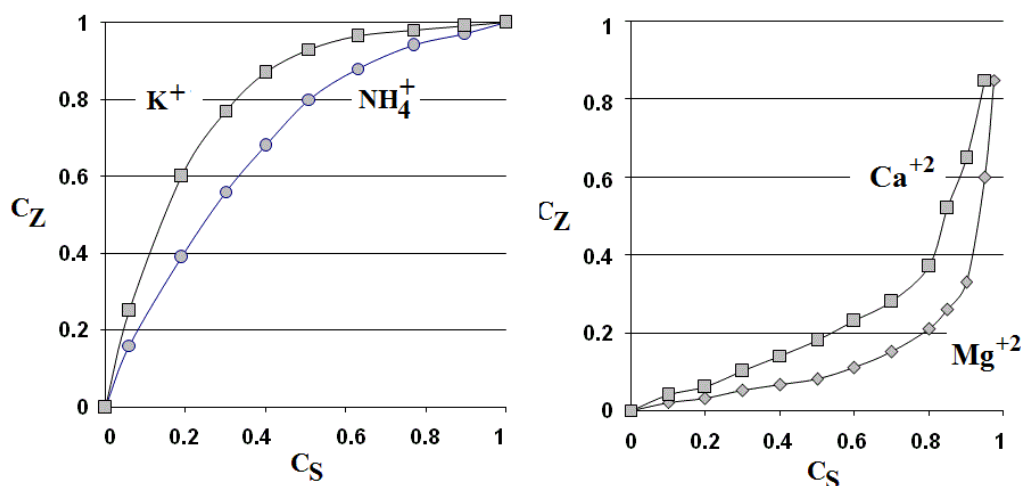
Sample	CEC of Na-form (meq/g)	CEC of K-form (meq/g)	CEC of NH <sub>4</sub> -form (meq/g)
PA	1.5	1.9	2.2
PS	2.0	3.3	3.2

Cationic composition of sodium-, potassium-, and ammonium-enriched forms of natural phillipsites is given in the Table 3; impurity compensating metals are removed out during ion exchange treatment, bivalent ions are not involved in the process of exchange of monovalent ions.

**Table 3.** Cationic composition in phillipsite sodium-, potassium-, and ammonium-enriched forms

Sample	Na-form	K-form	NH <sub>4</sub> -form
PA	Na <sub>3.5</sub> Ca <sub>0.16</sub> Mg <sub>0.24</sub>	K <sub>3.3</sub> Ca <sub>0.2</sub> Mg <sub>0.3</sub>	Ca <sub>0.30</sub> Mg <sub>0.25</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>3.2</sub>
PS	Na <sub>3.6</sub> K <sub>0.3</sub> Ca <sub>0.1</sub> Mg <sub>0.2</sub>	Na <sub>0.1</sub> K <sub>3.9</sub> Ca <sub>0.1</sub> Mg <sub>0.15</sub>	Na <sub>0.1</sub> Ca <sub>0.1</sub> Mg <sub>0.25</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>3.7</sub>

The ion exchange equilibrium was qualified by isotherms – a graphical representation of the correlation between the equilibrium and experimental terms at constant temperature. The most common ion exchange isotherm represents solidarity between ionic composition of two phases: the ion exchange material and solution (Zagorodni, 2006), the isotherm is a function  $C_Z = f(C_S)$ , where  $C_Z$  is concentration of the ion in zeolite, and  $C_S$  is its concentration in solution; the shape of isotherm contains information about selectivity towards ions participating in the ion exchange. The ion exchange isotherms obtained experimentally on PA (equilibrium at 20°C justified by constant concentration of solution, a solid:liquid ratio of 1:20) are shown in Figure 5.



**Figure 5.** Ion exchange isotherms on PS



Ion exchange isotherms for the  $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{K}^+$  and  $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$  reactions belong to the **a**-type (according to Breck's (1974) classification) and prove high selectivity of both zeolites towards  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$ ; participation of bivalent ions results in the **b**- and **c**-type isotherms pointing for the dependence of the selectivity on the degree of saturation.

The selectivity sequences depend on the origin of zeolite:  $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ \gg \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$  for PA with low content of potassium and high content of calcium and magnesium, and  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ \gg \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$  for PS with comparatively high content of potassium.

#### **Thermal properties**

It is known (Tsitsishvili et al., 1992) that in the temperature range 140-180°C phillipsite is transformed into metaphillipsite, and the thermal stability of metaphillipsite depends strongly upon the composition of the original material: calcium, low-silica samples are decomposed at 300°C whereas (Na,K)-high-silica samples preserve the metaphillipsite structure to 450-500°C; after cooling, metaphillipsite is easily hydrated in air over some hours, and the initial structure is recovered.

As a rule, complex curves of differential thermal analysis (DTA) are characteristic of phillipsites. There are considerable differences between DTA curves of PA and PS phillipsites. No less than four endothermic peaks associated with the release of water can be discerned in the DTA curve of the PAKh samples [3]. First narrow peak (maximum loss at 140°C) can be associated with the release of water from macropores. Second peak (180°C) is comparatively broad, maximum loss corresponds with the temperature range of transformation into metaphillipsite. Mentioned peak is followed by two broad peaks with maximum loss at 300°C and 400°C. X-ray diffraction patterns show decomposition of the PA samples at approx. 400°C. For the PS samples the first endothermic peak is rather broad, it is shifted to low temperatures (120°C) and the second peak looks like a shoulder shifted to higher temperatures (190°C). Small broad peak is observable at 390°C, narrow peak – at 560°C. X-ray data proves that the PS samples preserve the metaphillipsite structure to 500-550°C.

## **DISCUSSION**

The studied natural zeolites have the phillipsite type crystal structure (confirmed by X-ray diffraction patterns and FTIR spectra) and almost the same value of the silicate module ( $\text{Si}/\text{Al}=2.74$  for PA, and 2.62 for PS), which usually determines general properties of microporous molecular sieves. However, the difference in cationic composition (sodium and calcium prevail in PA, potassium in PS) leads to significant differences in thermal stability and ion exchange characteristics. In addition, the samples differ in crystallite morphology and large (meso and macro) pore systems, although it is difficult to say how this is related to the cationic composition and other conditions of hydrothermal crystallization of phillipsites.

## **CONCLUSION**

Georgian phillipsites have been studied, and detailed information on their structure, composition and properties is presented. It can be concluded that phillipsites from Akhaltsikhe and Shukhuti can be used in all industrial, agricultural, and medical applications of zeolites as adsorbents and ion exchangers.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors gratefully acknowledge the financial support from Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (Project FR-18-2600 “Scientific feasibility of creating nanocrystalline bactericidal sorbents on the basis of Georgian natural zeolites and the study of corresponding mechanisms”). Authors thank Prof. Giorgi Tsintsikaladze for help in the FTIR study, Dr. Manana Burdjanadze for help in water sorption measurements, and Mr. Vakhtang Gabunia for technical assistance and help in the X-ray diffraction studies.

## **REFERENCES**

- Anonymous 1997. Zeolites other than erionite (Group 3). IARC Monographs, 68: 307-333.
- Bacakova L, Vandrovцова M, Kopova I, Jirka I 2018. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. Biomaterials Science, 6: 974-989.
- Baerlocher Ch, McCucker LB, Olson DH 2007. Atlas of zeolite framework types. Sixth revised edition. Amsterdam: Elsevier, 398 pp.
- Bhatnagar A 2012. Application of adsorbents for water pollution control. Bentham Science Publishers, Sharjah, Oak Park, Bussum, p. 363-381.
- Breck DW 1974. Zeolite molecular sieves: structure, chemistry, and use. New York : John Wiley & Sons, 782 pp.

- Dolaberidze NM, Tsitsishvili VG, Khutsishvili BT, Mirdzveli NA, Nijaradze MO, Amiridze ZG, Burlanadze MN 2018. Silver- and zinc-containing bactericidal phillipsites. *New Materials, Compounds and Applications*, 2(3): 247-260.
- Iyer SD, Pinto SM, Sardar AA 2018. Characteristics and genesis of phillipsite grains in a sediment core from the Central Indian Ocean Basin. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 47: 1121-1131.
- Kallo D 2001. Applications of natural zeolites in water and wastewater treatment. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 45: 519-550.
- Li Y, Li L, Yu J 2017. Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem*, 3: 928-949.
- Pylev LN, Kulagina TF, Grankina EP, Chelishchev NF, Berenstein BG 1989. Carcinogenicity of zeolite phillipsite. *Gigiena i Sanitaria*, 8: 7-10 (in Russian).
- Rawajfih Z, Al Mohammad H, Nsour N, Ibrahim K 2010. Study of equilibrium and thermodynamic adsorption of  $\alpha$ -picoline,  $\beta$ -picoline, and  $\gamma$ -picoline by Jordanian zeolites: phillipsite and faujasite. *Microporous and Mesoporous Materials*, 132: 401-408.
- Sheppard RA, Gude AJ 3<sup>rd</sup>, Griffin JJ 1970. Chemical composition and physical properties of phillipsite from the Pacific and Indian Oceans. *American Mineralogist*, 55: 2053-2062.
- Sherman JD, Ross RJ 1982. Phillipsite-type zeolites for ammonia adsorption device for elementary analyses. USA Patent No. 4344851A.
- Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouqu  rol J, Siemieniowska T 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57: 603-612.
- Skhirtladze N 1997. Genetic groups of Georgian zeolites, their main deposits and manifestations. Tbilisi: Tbilisi State University Press, 27 pp.
- Tsitsishvili GV, Andronikashvili TG, Kirov GN, Filizova LD 1992. Natural zeolites. New York: Ellis Horwood, pp. 53-55.
- Tsitsishvili GV, Skhirtladze NI, Andronikashvili TG, Tsitsishvili VG, Dolidze AV 1999. Natural zeolites of Georgia: occurrences, properties, and application. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 125: 715-722.
- Tsitsishvili V, Alelishvili M, Dolaberidze N, Nijaradze M, Mirdzveli N 2003. Surfactant-modified clinoptilolite and phillipsite. *Bulletin of Georgian Academy of Sciences*, 167: 457-459.
- Tsitsishvili V, Dolaberidze N, Alelishvili M, Tsintskaladze G, Sturua G, Chipashvili D, Nijaradze M, Khazaradze N 1998. Adsorption and thermal properties of zeolitic rocks from newly investigated deposit plots in Georgia. *Georgian Engineering News*, 2(6): 61-65.
- Tsitsishvili V, Tsitsishvili G, Dolaberidze N, Alelishvili M, Chipashvili D, Tsintskaladze G, Sturua G, Nijaradze M, Gigolashvili N, Mirdzveli N 2008. Characterization of Georgian natural zeolites. In: *Chemistry of Advanced Compounds and Materials*, New-York: Nova Science Publishers, pp. 123-131.
- Zagorodni A 2006. Ion exchange materials: properties and applications. Oxford: Elsevier Science, 496 pp.

## Investigation of some heavy metal contents of multi-floral honeys and bee pollens collected from The Central Asia

Mehmet Rüştü Karaman

Afyon Kocatepe University, Department of Medical and Aromatic Plants, Afyon, Turkey

Corresponding author e-mail:rkaraman2000@hotmail.com

### Abstract

The quality of bee products is dependent on the type of flowers from which the bees collect the nectar. Thus, the composition and chemistry of bee products is not standardized. Additionally, they might become contaminated with antibiotics, pesticides, and heavy metals. Thus, it is possible to rely on bee products such as honey and pollen to determine the extent of mineral pollution in specific areas. Therefore, monitoring of heavy metal contaminations of honey has a great importance to consumer's health. The present study aimed to investigation of heavy metal contents of multi-floral bee honeys and pollens collected from the Kyrgyzstan and Turkey which are Countries of Central Asia. For this purpose, a total of twenty honey and pollen samples were collected directly from honey beekeepers in different geographic regions of Kyrgyzstan and Turkey. The concentrations of some heavy metals like iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), lead (Pb), cadmium (Cd), nickel (Ni) and chromium (Cr) were determined in the honey samples. Statistical differences between honey samples from different geographic regions were tested by analysis of variance. According to the results of study, some of them were higher than standard levels and some were lower than those. No significant differences were observed in heavy metal levels in the honey samples collected from Kyrgyzstan. However, the concentrations of metals such as Fe, Cu and Pb in the samples collected from Turkey were higher than that of the samples collected from Kyrgyzstan. This observation can be related to various factors, such as industry, mining, emission of automobile exhaust gases, and different botanical origins.

**Keywords:** Honey, bee pollen, heavy metals, contamination, Central Asia

### 1. INTRODUCTION

Bee products such as honey, pollen, bee bread, propolis have a great nutritional importance with high antioxidant capacity, bactericidal and fungicidal effects (Biesega and Pyrzyńska, 2013). They have also many beneficial effects that affect the human health in a positive manner. Bee products include many biochemical components that can be found on almost all functional foods. Proteins, saccharides, fatty acids, prebiotics, probiotics, fibre phytochemicals, bioactive peptides, mineral matters vitamins and organic acids can be shown as examples to these components (Küçük et al., 2007; Doğaroğlu et al., 2015). However, the quality of bee products is dependent on the type of flowers from which the bees collect the nectar. Thus, the composition and chemistry of bee products is not standardized. Additionally, they might become contaminated with antibiotics, pesticides, and heavy metals. Thus, it is possible to rely on bee products such as honey and pollen to determine the extent of mineral pollution in specific areas. It has also been stated that, bee and bee products may be used as a bioindicator in determining environmental pollution and presence of heavy metals (Nispet et al., 2013; Dalal, 2017).

Elements are minor constituents of honey that may threaten the human health in excess concentrations. Mineral elements are considered to be the smallest components of bee products, and their levels vary according to the source of the flowers that collected nectar and pollen (Silva et al., 2009). Honey contains a variety of macro- and microminerals that are the minor constituents of honey present in the range 0.02–1.03%. Elements such as Se, Cu, Mn, Fe, Ni, and Zn are essential for normal metabolism (Altundag et al., 2015) but above tolerance limits they should be environmental pollutants that are hazardous for human health and trace elements such as Pb, Cd, and Al are considered as toxic and should damage the human metabolism (Samiullah, 2006; Altundag et al., 2015). While honey forms the energy source of the bee colony, pollen is the bees' main source of the other important nutrients: proteins, minerals, fats and other substances (Human and Nicolson, 2006).

Pollen collected by honey bees (bee-pollen) is promoted as a health food with a wide range of nutritional and therapeutic properties. Thus, metal pollution of pollen can produce a higher content of metals in pollen like aliment and in honey due to bee's activity, whereas flower bee pollen should be safe for consumers and of natural quality characteristics (Kazafy et al., 2017). Dima et al. (2012) have found that the concentrations of Fe in pollen samples from industrial and urban sites were in the range 52–123 ppm and in the range 21–45 ppm in samples collected from rural and non industrial sites.

The heavy metals like Fe, Mn, Cu and Zn can be essential in small quantities for plants, animals and humans, but becomes toxic in high quantities. Other heavy metals such Cr, Ni, Pb are very toxic (Gergen et al., 2006). Thus, areas with intensive industry are associated with heavy metal pollution of the environmental, which is a first step of contamination of food sources. Determining the metals in bee products such as honey and pollen will help their quality control as a food product (Palczak et al., 2015). Therefore, monitoring of heavy metal contaminations of bee products such as honey and bee pollen has a great importance to consumer's health, taking into consideration the large application of honeybee products in human nutrition and their possible contamination with toxic metals (Dhahir and Hemed, 2015). Honey bees and their products are also a bio-indicator of environmental pollution with heavy metals (Naggar et al., 2013). The present study aimed to evaluate and detect the concentrations of some heavy metals like iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), lead (Pb), cadmium (Cd), nickel (Ni) and chromium (Cr) in the honeybee and pollen samples collected in different locations of Central Asia.

## 2. MATERIALS AND METHODS

A total of 20 honey samples were collected directly from honey beekeepers in different geographic regions of Kyrgyzstan and Turkey. Total of 20 pollen samples were also collected directly from honey beekeepers in different geographic regions of Kyrgyzstan and Turkey. The botanical origin of unifloral and multifloral honey samples were presented in Table 1.

Table 1. Botanical origin of honey samples.

Bee Products	Number of Samples	Province
Honey Type		
Multifloral	20	Kyrgyzstan
Multifloral	20	Turkey
Pollen Type		
Multifloral	20	Kyrgyzstan
Multifloral	20	Turkey

Honey and pollen samples were digested with intense hydrogen peroxide (30% concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nitric acid (65% concentration of HNO<sub>3</sub>). The concentrations of some heavy metals like iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), lead (Pb), cadmium (Cd), nickel (Ni) and chromium (Cr) were determined in the honey samples. The mineral contents were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after microwave-assisted acid digestion. ICP-MS is a good technique with simultaneous determinations of elements, high sensitivity, capability, and wide linear range (Döker and Uslu, 2014). Statistical differences between honey samples from different geographic regions were tested by analysis of variance.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Elemental concentrations of honey samples collected from Turkey and Kyrgyzstan were presented in Table 2.

The heavy metals of Fe, Cu, Zn and Mn were the most abundant heavy metals while Ni, Cr, Pb, Cd were the lowest heavy metals in the honey samples collected from Turkey. However, the lower concentrations of Fe, Cu, Zn and Mn were determined in the honey samples collected from Kyrgyzstan which attributed to the uncontaminated environment in this region. In the region of Kyrgyzstan, the main sources of livelihood are animal breeding and agriculture so this area is not heavily industrialized. Hence, no significant differences were observed in heavy metal levels in the honey samples collected from Kyrgyzstan.

The mean Fe, Zn, Cu and Mn concentrations for the samples in Turkey were 3.21, 0.23, 0.54 and 0.08 ppm, whereas the mean Fe, Zn, Cu and Mn concentrations for the samples in Kyrgyzstan were 1.17, 0.09, 0.18 and 0.09 ppm, respectively. The results of this study showed that the highest contamination level among the heavy metals in question was the Fe and Cu in Turkey. In the honey samples collected from Turkey, the highest Fe and Cu concentrations were 9.365 ppm and 0.316 ppm, whereas in the samples collected from Kyrgyzstan were 1.567 ppm and 0.235 ppm, respectively.

Elemental concentrations of bee pollen samples collected from Turkey and Kyrgyzstan were presented in Table 3. The highest total mineral content of bee pollen was observed in samples from the region of Turkey (5.6%), followed by those from Kyrgyzstan (1.72%). The results showed that metal levels in the pollen samples in Turkey were higher than the limits of international standards in pollen in Kyrgyzstan. The concentrations of metals were compared with recommended limits for foods. Some of them such as Cu and Pb were higher than

standard levels and some were lower than those. The contents in iron for analysed bee pollen samples are between 29.67 and 91.54 ppm in Turkey, whereas the contents are between 18.42 and 77.66 ppm in Kyrgyzstan.

Table 2. Elemental concentrations of honey samples.

Element	Minimum	Maximum	Mean ± SD
<b>Turkey</b>			
Fe	<1 ppb	9.365 ppm	3.21 ± 1.62 ppm
Zn	<1 ppb	0.316 ppm	0.23 ± 0.09 ppm
Cu	<1 ppb	0.842 ppm	0.54 ± 0.73 ppm
Mn	<1 ppb	0.196 ppm	0.08 ± 0.01 ppm
Pb	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cd	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Ni	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cr	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
<b>Kyrgyzstan</b>			
Fe	<1 ppb	1.567 ppm	1.17 ± 0.54 ppm
Zn	<1 ppb	0.142 ppm	0.09 ± 0.02 ppm
Cu	<1 ppb	0.235 ppm	0.18 ± 0.06 ppm
Mn	<1 ppb	0.188 ppm	0.09 ± 0.01 ppm
Pb	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cd	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Ni	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cr	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb

The contents in copper for analysed bee pollen samples are between 8.75 and 37.16 ppm in Turkey, whereas the contents are between 5.34 and 18.31 ppm in Kyrgyzstan. The maximum Pb content of bee pollen collected from Turkey was 2.19 ppm. Especially, lead is not an essential element for life and it is very toxic for the nervous system and the kidneys. This observation can be related to various factors, such as industry, mining, emission of automobile exhaust gases, and different botanical origins. However, other factors, such as geographical conditions, are also expected to affect the mineral content.

Table 3. Elemental concentrations of bee pollen samples.

Element	Minimum ppm	Maximum Ppm	Mean ± SD ppm
<b>Turkey</b>			
Fe	29.67	91.54	71.3 ± 46.2
Zn	24.84	89.41	48.2 ± 22.5
Cu	8.75	37.16	17 ± 8.6
Mn	19.33	102	54.4 ± 41.1
Pb	<1 ppb	2.19	0.51 ± 0.23
Cd	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Ni	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cr	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
<b>Kyrgyzstan</b>			
Fe	18.42	77.66	52.8 ± 33.4
Zn	21.75	67.93	35.6 ± 31.6
Cu	5.34	18.31	7.58 ± 4.7
Mn	21.60	77.67	51.9 ± 19.8
Pb	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cd	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Ni	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Cr	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb

#### 4. CONCLUSION

Because of the nutritional value and high medical honey and bee pollen for humans so it was necessary to appoint metals of great importance. High concentration of essential metals and heavy metals in the bee products such as honey and pollen can be toxic both to man and animals. Considering nourishing and healing properties of bee products, it is important to know their contamination. The present study aimed to evaluate and detect the mineral element and pollution levels of honeybees and their product, honey and pollen, by heavy metals. The findings were in high differences in mineral contents between bee products coming from different locations. The results showed that metal levels are within the limits of international standards in honey and pollen in Kyrgyzstan, whereas the results of this study showed that the higher contamination levels among the heavy metals in question was the Fe and Cu in Turkey. The pollution of bee products with toxic elements is mostly related to human industrial and agriculture activity. It was established that the concentrations of such elements as Fe, Cu, Pb reach relatively high values in bee products coming from polluted areas of Turkey.

Dalal Musleh Aljedani, Determination of Some Heavy Metals and Elements in Honeybee and Honey Samples from Saudi Arabia, *Entomol Appl Sci Lett*, 2017, 4 (3), pp:1-11

Dalal Musleh Aljedani, Determination of Some Heavy Metals and Elements in Honeybee and Honey Samples from Saudi Arabia, *Entomol Appl Sci Lett*, 2017, 4 (3), pp:1-11

Dalal Musleh Aljedani, Determination of Some Heavy Metals and Elements in Honeybee and Honey Samples from Saudi Arabia, *Entomol Appl Sci Lett*, 2017, 4 (3), pp:1-11

#### References

- Altundag, H., Albayrak, S., Dundar, M.S., Tuzen, M., Soylak, M. 2015. Investigation of the influence of selected soil and plant properties from Sakarya, Turkey, on the bioavailability of trace elements by applying an in vitro digestion model. *Biological Trace Element Research*, 168(1):276-285.
- Biesega, M. and Pyrzynska, K. 2013. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136 (1):46-54.
- Dalal, M.A. 2017. Determination of some heavy metals and elements in honeybee and honey samples. *Entomol Appl. Sci. Lett.* 4(3):1-11.
- Dhahir, S.A. and Hemed, A.H. 2015. Determination of Heavy Metals and Trace Element Levels in Honey Samples From Different Regions of Iraq and Compared with Other Kind. *American Journal of Applied Chemistry*. 3(3): 83-92.
- Dima, G., Popescu, I., Dinu, S., Nătescu, O., Stirbescu, R. 2012. Heavy metals in pollen samples collected from the dambovită county analysed by edxrf method. *Rom. Journ. Phys.* Vol. 57, Nos. 9–10, pp.1411-1416, Bucharest.
- Doğaroğlu, M., Kolaylı, S., Yücel, B., Yıldız, O., Hotaman, H., Topal, E., Kösoğlu, M.. 2015. Bioactive qualifications and characteristics of cherry honey, pollen and bee bread. 44th International Apicultural Congress, September 15–20, Daejeon-Korea: p. 456.
- Döker, S. and Uslu, M. 2014. Aerosol dilution technique for direct determination of ultra-trace levels of Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, and Zn in edible salt samples by collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectro. (CRC-ICP-MS),” *Food Analytical Methods*, 7 (3):683-689.
- Gergen, I., Gogoasă, I., Simona, D., Diana, M., Monica, H. 2006. Heavy metal status in fruits and vegetables from a non-polluted area of Romania (Banat County), *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology*, Gârban Z., Drăgan P. (Eds. Symp. Series), Tome VII, Publishing House Eurobit, Timișoara, pp. 149-165.
- Human, H. and Nicolson, S.W. 2006. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (*Asphodelaceae*). *Phytochemistry* 67:1486-1492.
- EL-Kazafy A. Taha, Ahmed M. Al-Jabr, Saad N. Al-Kahtani. 2017. Honey Bees, Bee-collected Pollen and Honey as Monitors of Environmental Pollution at an Industrial Cement Area in Saudi Arabia. *Journal of the Kansas Entomological Society* 90(1):1-8.
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C. and Candan, F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100:526-534.
- Naggar, Y., Naiem, A., Seif, A., Mona, M. 2013. Honey bees and their products as a bio-indicator of environmental pollution with heavy metals. *Mellifera* 13-26:10-20.
- Nispet, C., Guler, A., Yarim, G.F., Ardali, Y. 2013. Relationship between environmental and flora change with mineral content of honey bee products. *Turkish J. of Biochemistry*, 38(4):494-498.
- Palczak, E.S., Kalembkiewicz, J., Galas, D. 2015. Evaluation of the content of selected heavy metals in samples of polish honeys. *J. Ecol. Eng.* 16(3):130-138.
- Silva, L.R., Videira, R., Monteiro, A.P., Valentao, P. and Andrade, P.B. 2009. Honey from Luso region: physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchem J.* 93:73-77.

## Tekstil atık sularından elektro-Fenton prosesi ile KOİ ve renk giderimi

Kübra Kuru\*, Nevzat Beyazıt

\*<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: kbra.kuru@hotmail.com

### Özet

Tekstil sanayi atık suları yüksek düzeyde toksikolojik özelliklere sahip boya kimyasalları içermektedir. Bu nedenle alıcı ortama verilmeden önce verimli ve ekonomik arıtma teknikleri ile arıtılmaları gerekmektedir. Bu çalışmada, tekstil atık suyundan elektro-Fenton (EF) prosesi ile KOİ ve renk giderim optimizasyonu ile optimum deneysel şartların belirlenmesi amaçlanmıştır. İşletme parametreleri olarak sırası ile pH (2.5, 3, 3.5, 4), akım yoğunluğu (80, 100, 120, 140 A/m<sup>2</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu (1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 mg/L) seçilmiştir. Optimum çalışma şartlarında (Anot: Demir, katot: Çelik, karıştırma hızı: 250 rpm, pH=3, akım yoğunluğu 140 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 2000 mg/L) 20 dakikalık EF süresi sonunda 20.dk'da maksimum %91 KOİ giderim verimi elde edilirken 0,601 kg/m<sup>3</sup> anot ve 14,32 kWh/m<sup>3</sup> lük elektrik enerjisi tüketimi saptanmıştır. Maksimum renk giderim verimi ise 5.dakikada %88 olarak bulunmuştur ve 0,15 kg/m<sup>3</sup> anot ve 4,015 kWh/m<sup>3</sup> lük elektrik enerjisi tüketimi elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Elektro-Fenton, tekstil atık suyu, KOİ, renk, giderim

### COD and color removal from textile wastewater by electro-fenton process

#### Abstract

Textile industry wastewater contains dye chemicals with a high level of toxicological properties. Therefore, they must be refined with efficient and economical refining techniques before being given to the receiving environment. In this study, it is aimed to determine the optimum experimental conditions by optimizing COD and color removal with electro-fenton (EF) process from textile wastewater. pH (2.5, 3, 3.5, 4), current density (80, 100, 120, 140 A / m<sup>2</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 mg / L) were selected as operating parameters, respectively. Under optimum operating conditions (Anode: iron, cathode: steel, mixing speed: 250 rpm, pH = 3, current density 140 A / m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration 2000 mg / L). At the end of 20 minutes EF maximum 91% COD removal efficiency was obtained while 0,601 kg / m<sup>3</sup> anode and 14,32 kWh / m<sup>3</sup> electrical energy consumption were determined. The maximum color removal efficiency was found to be 88% in the 5th minute and 0.15 kg / m<sup>3</sup> anode and 4,015 kWh / m<sup>3</sup> electrical energy consumption were obtained.

**Keywords:** Electro-fenton, textile wastewater, COD, color, decolorization

### GİRİŞ

Tekstil, deri, kozmetik, baskı ve plastik gibi birçok sektörde kullanılan boyalar, çevre sağlığı için oldukça büyük problem olmuştur. Boyaların çoğu, toksik, kanserojen ve mutajenik özellikleri nedeniyle su ve insan sağlığına zararlıdır. Bundan dolayı, temiz sulardan uzaklaştırılmaları yüksek önceliğe sahiptir(Do ve ark., 2017).

İleri oksidasyon prosesleri (İOP), güçlü organik kirleticilerin hidroksil radikalleri (OH<sup>•</sup>) ile oksidasyon yoluyla etkin bir şekilde uzaklaştırılması için geliştirilmiş arıtma teknolojileridir. İOP'lerin son yıllardaki gelişimi, klasik arıtma yöntemlerine göre oldukça önemli bir yere sahip olup, İOP'ler arasında uygulanabilirliği, basitliği, yüksek performansı nedeniyle elektro-Fenton prosesleri özellikle renkli suların arıtımında dikkat çekmektedir.

Elektro-Fenton yönteminde atık suya hidrojen peroksit eklenir. Demir tuzunun varlığında, mevcut organik bileşiklere göre güçlü bir şekilde oksidatif olan türler üretilir. Hidroksil radikalleri (OH<sup>•</sup>) elektro-fenton işlemlerinde önemli oksitleyici türler olarak kabul edilir.(Deng ve Englehardt, 2006)

Fenton sisteminin ana mekanizması, en güçlü oksidanlardan biri olan OH' ın oksidasyonuna dayanır. Bir

Fenton sisteminde OH, homojen bir Fenton reaksiyonu (Denk. 1) ile üretilir ve zincir Fenton reaksiyonlarının (Denk. 1-5) başlangıç reaksiyonu olarak işlev görür



Bununla birlikte, bir dizi rekabetçi reaksiyon da oksidasyon işlemini olumsuz yönde etkileyebilir (Eşit. (6) - (9)):



Elektro-Fenton (EF) prosesinde, Fenton'un reaktifinin kütle içindeki reaktif etkisiyle birlikte anot yüzeyindeki anodik oksidasyon kirletici maddeler yok edilir. Elektro-Fenton işlemi, Fenton'un reaktif ilavesine veya oluşumuna bağlı olarak dört kategoride sınıflandırılır. Tip 1'de, hidrojen peroksit ve demir iyonu sırasıyla kurban anot ve oksijenle yayılan bir katot kullanılarak üretilir. Tip 2'de, demir iyonu kurban anottan üretilirken hidrojen peroksit harici olarak eklenir. (Eşit.10)



Tip 3'te, demir iyonu dışarıdan eklenir ve oksijenle yayılan bir katot kullanılarak hidrojen peroksit üretilir. Tip 4'te, bir elektrolitik hücrede Fenton reaktifi kullanılarak hidrosil radikali üretilir ve katot üzerindeki demir iyonlarının indirgenmesiyle demir iyonu yeniden üretilir (Akbal ve Gümüş, 2016).

Bu çalışmada, tekstil üretiminden kaynaklanan yüksek düzeyde KOİ ve renk içeren atık suların elektro-Fenton (EF) yöntemiyle arıtılabilirliği incelenmiştir. Bu kapsamda, farklı işletme parametrelerinin (pH, akım yoğunluğu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi) yöntemin arıtma verimine etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, yöntemde olası büyük ölçekli uygulamalara temel oluşturacak optimum işletme koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların uygulanabilirliği açısından maliyet analizi yapılmıştır. toplam maliyet ve kg/KOİ başına oluşan maliyet analizleri sunulmuştur.

## MATERYAL VE METOT

### Atık su ve Özellikleri

Deneyleerde kullanılan tekstil atık suyu, Ordu ili Fatsa ilçesinde kurulu bulunan kumaşlar üzerine baskı ve boyama şeklinde kimyasal ve fiziksel proseslerin gerçekleştirildiği tekstil fabrikasından temin edilmiştir. Deneyleerde kullanılan tekstil atık suyuna ait karakteristik özellikler Tablo 1' de gösterilir.

Tablo 1. Sızıntı Suyu Karakterizasyonu

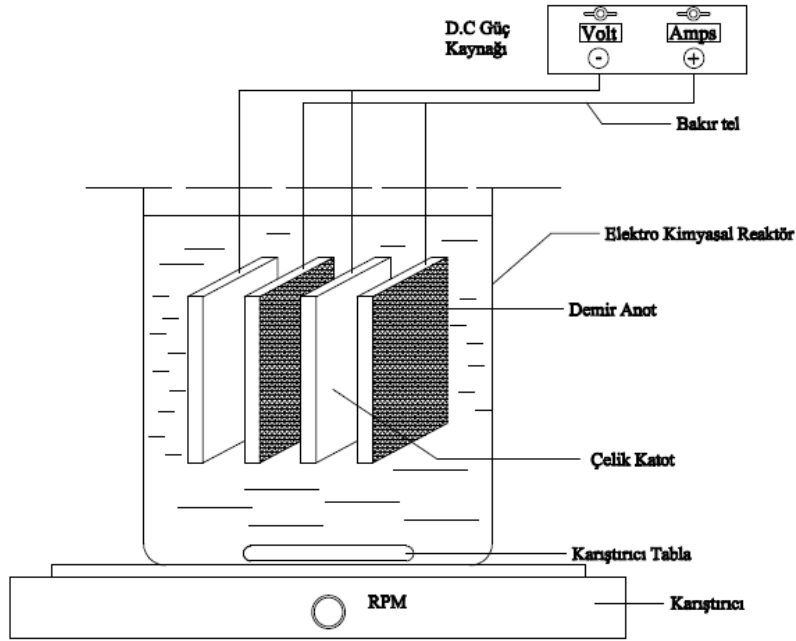
Parametre	Değer
pH	6 - 6.30
KOİ(mg/L)	2,500-8,000
Renk(Pt-Co)	800-2000

### Elektro-Fenton Deney Düzenegi

Yapılan deneyleerde aside dayanıklı plexiglas malzemeden yapılmış dikdörtgen kesitli bir reaktör kullanılmıştır. Reaktörde kullanılabilen atıksu hacmi 750 ml'dir. Deneyleerde monopolar paralel bağlı elektrotlar kullanılmıştır. Elektrotlar arası mesafe 9 mm ve tamamen elektrolite batmış burumdadır. Elektrotların eni 4,1 cm boyu 5,5 cm olarak belirlenmiş birbirine bağlantıları sonsuz dişli tij ve civatalar ile sağlanmıştır. Deneyleerde anot olarak demir, katot olarak çelik elektrotlar kullanılmıştır. Anot olarak kullanılan 2 adet demir plakanın toplam yüzey alanı 93,04 cm<sup>2</sup> 'dir. Akım ve voltaj kontrolü DC güç kaynağı (MarxLow



PS-305 D) ile sağlanmıştır. Deneylerdeki karıştırma işleminde manyetik karıştırıcı (RCT) kullanılmıştır. KOİ deneylerinde, Spectroquant Nova 60 fotometre cihazı kullanılmıştır.



Şekil 1. Deneysel Düzenek

### Deneysel Yöntem

Elektrofenton işleminde elektrotlar reaktöre yerleştirildikten sonra, reaktör içerisine 750 mL atıksu konulmuştur. Güç kaynağı üzerinde istenen akım ayarlaması yapıldıktan ve istenen karıştırma hızı ayarlandıktan sonra deney başlatılmıştır. Deneyler kapsamında; pH etkisi (pH=2.5, pH=3, pH=3.5 ve pH=4), akım etkisi (80, 100, 120, 140 A/m<sup>2</sup>) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu (1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 mg/L) olarak denenmiştir.

Ham tekstil atıksuyunun pH ayarlaması yapıldıktan sonra KOİ ve renk parametresini belirlemek için ham numuneden santrifüj tüpüne yeterli miktarda ayrılmıştır. Şekil 1'de olduğu gibi Elektro-Fenton deney düzeneği oluşturularak, yeterli miktarda elektrotlara akım verilmiştir. Zamana bağlı olarak (2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 dakika) numuneler alınmış ve her zaman aralığında sistemin pH ve akım değişimi kaydedilmiştir.

Santrifüj tüpüne alınan numuneler sonrasında santrifüj cihazına konularak 10 dakika süreyle ve 9000 rpm hızında karıştırılmış olup, karıştırıldıktan sonra her bir numuneden KOİ kitlerine 3 ml alınıp 2 saat süreyle 148°C'de ısıtılması suretiyle termoreaktöre yerleştirilmiştir.

Termoreaktörden alınan kitler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilerek soğumaya bırakılmıştır. KOİ kitlerinin soğumaya bırakıldığı işlemde sonra Nova60 Spektrofotometre'sinde mg/L olarak KOİ parametresi değerleri ölçülmüştür.

Renk parametresini belirlemek için ise santrifüj tüplerinde bulunan farklı zamanlardaki numuneler kuvars küvete yeterli miktarda alınarak Nova60 Spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülüp, gerekli hesaplamalar yapılarak renk ölçü birimi (Pt-Co)'ne çevrilerek sonuçlar kaydedilmiştir.

### Hesaplamalarda Kullanılan Eşitlikler

**Akım Yoğunluğu:** Katodun yüzeyinden birim olarak geçen akıma denilir. Akım yoğunluğu aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$J = \frac{I}{A} \quad (11)$$

Burada; J: Akım yoğunluğu, mA/cm<sup>2</sup>, I: Akım şiddeti, mAmper, A: Aktif anot yüzey alanı, cm<sup>2</sup>, dir.

**Akım Verimi:** Anotta çözünecek maddenin mol miktarı elektrolizin Faraday kanunuyla hesaplanır ve m ile

gösterilir.

$$m = \frac{I \times t}{n \times F} \quad (12)$$

Burada; I: akım şiddeti, amper, t: zaman, s, n: iyon yükü, F: Faraday sabiti (96485 C mol<sup>-1</sup>) olarak tanımlanır.

**Enerji Tüketimi:** Harcanan elektrik enerjisi Watt-saat (Wh) cinsinden aşağıdaki gibi hesaplanmıştır;

$$E = V \times I \times t \quad (13)$$

Burada; E: Elektrik enerjisi (Wh), V: volt, I: akım şiddeti (A), t: zaman (saat) dir.

**Faraday/m<sup>3</sup>:** Faraday aşağıdaki eşitlik ile hesaplanır.

$$\frac{\text{Faraday}}{m^3} = \frac{I \times t}{F \times V} \quad (14)$$

Burada, I: Akım şiddeti, Amper, t: Zaman, s, v: Elektrolit hacmi, m<sup>3</sup>'dür(Alver, 2012).

**KOİ giderim verimi** aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$KOİ \text{ Giderim}(\%) = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100 \quad (15)$$

Burada C<sub>0</sub> ve C sırasıyla t=0 ve t anındaki mg/L olarak boya derişimidir(Yamaç, 2016).

### Maliyet Hesabı

Optimum çalışma şartlarında (Anot: demir, katot: çelik, karıştırma hızı: 250 rpm, pH=3, akım yoğunluğu 140 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 2000 mg/L) 20 dakikalık EF süresi sonunda 20.dk'da maksimum %91 KOİ giderim verimi elde edilirken 0,601 kg/m<sup>3</sup> anot ve 14,32 kWh/m<sup>3</sup> lük elektrik enerjisi tüketimi saptanmıştır. Maksimum renk giderim verimi ise 5.dakikada %88 olarak bulunmuştur ve 0,15 kg/m<sup>3</sup> anot ve 4,015 kWh/m<sup>3</sup> lük elektrik enerjisi tüketimi elde edilmiştir. Hesaplama atık suyun pH ayarlaması için kullanılan kimyasallar dahil edilmemiştir. Dolar kuru 1\$ = 5,90 TL olarak ele alınmıştır. EPDK tarafından 2019 yılı nisan ayı tek terimli mesken aboneleri için görevli tedarik şirketi kullanıcılar için 0,434451 TL/kWh olarak belirlenmiştir (Enerjiportalı, 2019).

14,32 kWh/m<sup>3</sup> x 0,434451 TL/kWh=6,2213 TL/m<sup>3</sup>=1,054\$/m<sup>3</sup> ;Anotta tüketilen demir miktarı 0,601 kg/m<sup>3</sup> hesaplanmış ve gr Fe (>%99.9 demir) fiyatı 0,0006\$ (Ozyonar ve Karagozolu, 2014) =0,0003 \$ olarak hesaplanmıştır.

$$0,601 \text{ kg/m}^3 \times 0,0006\$ = 0,00036\$/m^3$$

1 L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı 130 TL'dir. Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 mg/L=5,05 ml

Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı fiyatı:

$$5,05 \text{ ml için } 0,65 \text{ TL/L} \times 1000\text{L} = 650 \text{ TL/m}^3=110,16 \text{ \$/m}^3$$

Toplam maliyet= 111,214 \$/m<sup>3</sup> ve 1 kg KOİ için 21,98 \$ olarak hesaplanmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Giriş pH'sinin KOİ ve Renk giderimi Üzerine Etkisi

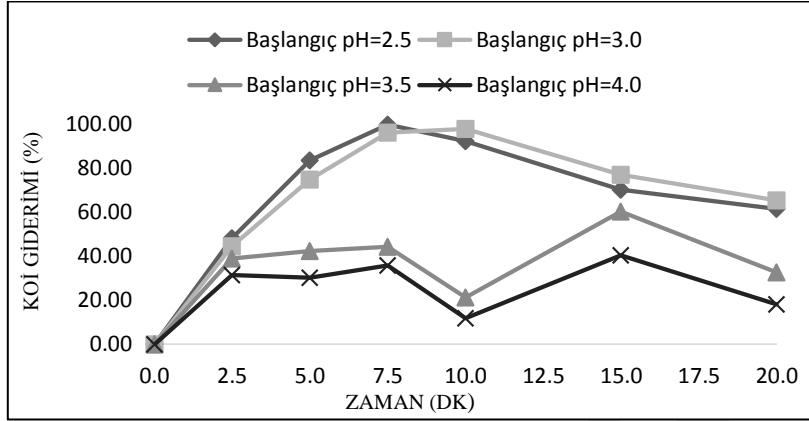
Fenton proses reaksiyonlarının gerçekleşmesinde pH parametresi oldukça önemli bir öneme sahiptir. Örnek olarak vermek gerekirse, sızıntı sularının arıtımında uygulanan Fenton reaksiyonlarında en iyi pH aralığının 2-4 arasında gerçekleştiği bilinmektedir.( Zang ve ark., 2005).

Ancak en iyi sonuçların gözlemlendiği oksidasyon uygulamalarında seçilecek pH değeri, atıksuların karakteristiğine göre farklılık göstermektedir. Yapılan çalışma kapsamında, gerçek tekstil endüstrisi sularının EF ile arıtımında, en uygun pH değerinin belirlenmesi için PH 2.5, 3.0, 3.5 ve 4.0 seçilerek EF deney düzeneği oluşturulmuş ve elde edilen KOİ giderim verimleri Şekil 2'de sunulmuştur.

Şekil 2'den de gözlenebildiği gibi, ilk 7,5 dakika içerisinde, organik maddelerin parçalanma hızı oldukça yüksektir. Sonrasında, parçalanma hızı yavaşlamaktadır. Bu durum, reaktördeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin anodik olarak ortama salınan Fe<sup>+2</sup> ile gireceği reaksiyon dolayısıyla hızla parçalanması ve ortamda oldukça fazla miktarda hidroksil radikali oluşturmasından kaynaklanmaktadır.

Şekil 2'den çıkarılabilecek bir diğer sonuç ise, başlangıçta uygulanan pH değeri arttıkça oksidasyon veriminin azalmasıdır. Bu durum, atıksu çözelti pH'sinin zamanla artması ve etkin Fenton oksidasyonu için gerekli pH aralığının (2-4 arası) dışına çıkılmasından kaynaklanmaktadır. pH değerinin 4 ün üzerinde olması atıksuda flokların oluşmasına neden olmuştur. Bu durumda sistemde Elektro-Fenton yerine koagülasyon meydana

geldiği görülmektedir. Bu da istenmeyen bir durumdur.

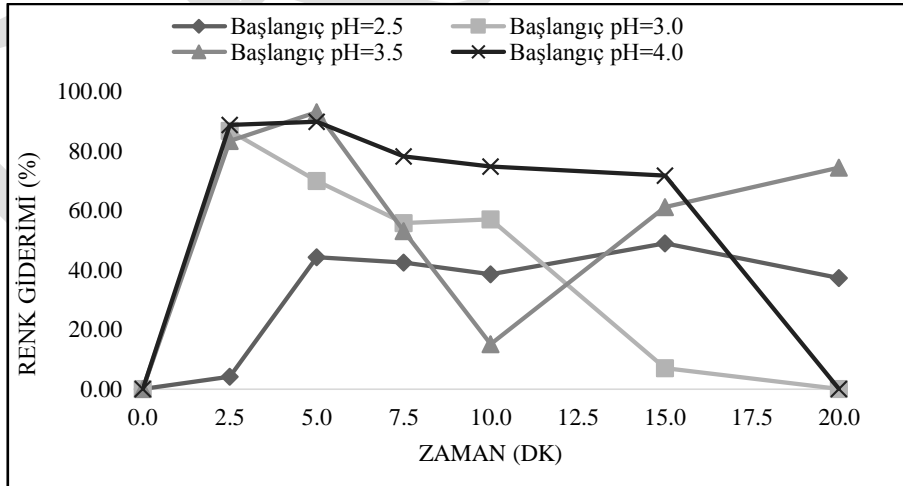


Şekil 2. Giriş pH'nın KOİ giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:100 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, Elektrotlar arası mesafe:10mm)

Aynı zamanda, asidik koşulları daha yüksek pH değerlerinin, OH<sup>-</sup> radikallerini, HO<sub>2</sub>'ye dönüştürdüğü ve oluşan reaksiyona göre radikallerin, Elektro-Fenton işlem verimliliğini azalttığını göstermiştir (Oturan ve Aaron, 2014).

Elektro-fenton prosesleri ile yapılan deneylerde renk gideriminde ortam pH'sinin önemi büyüktür. pH etkisinin incelenmesi için yapılan deneylerde akım, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı, süre ve karıştırma hızı sabit tutulmuştur. Yapılan deneylerin her biri; 250 rpm karıştırma hızında, 100 A/m<sup>2</sup> akımda, 20 dk sürede yapılmıştır. pH ayarlamasında 1 M NaOH ve 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılmıştır.

pH değeri Şekil 2'de görüldüğü gibi pH=2.5 değerinde %99'un üzerinde olmasına rağmen, Şekil 3'deki grafiğe bakılarak renk giderim verimi pH=2.5'da düşük olduğundan pH=2,5 değeri tercih edilmemiştir. Arıtımın işletme maliyetleri göz önüne alınarak Elektro-Fenton prosesinde, pH 3'de KOİ giderim verimi %95,9 iken renk giderim verimi %86'dır. Bu nedenle en uygun pH aralığı 3'dür ve diğer koşulların optimize edilmesinde, pH değeri 3 ile devam edilecektir.



Şekil 3. Giriş pH'nın Renk giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:100 A/m<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, Aktif elektrot yüzey alanı:93,04 cm<sup>2</sup>)

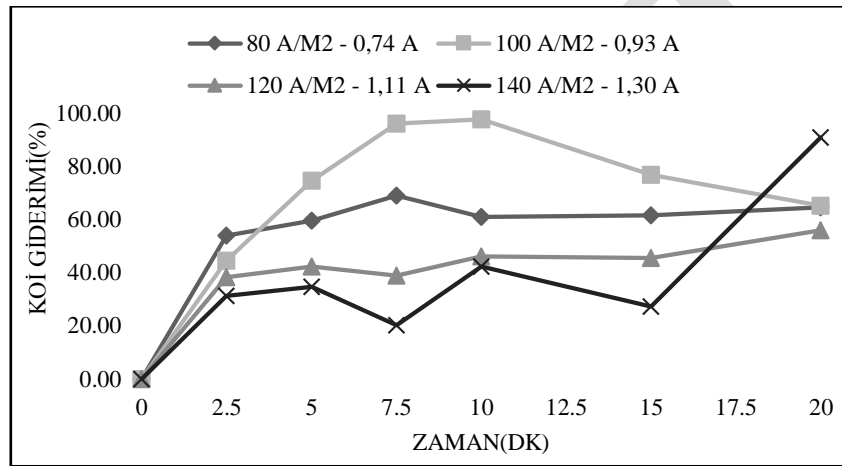
### Akım Yoğunluğunun KOİ ve Renk giderimi Üzerine Etkisi

Elektro-Fenton proseslerinde uygulanan elektrik akım şiddeti, proseste anot elektrotta yer alan demirin çözünürlüğünde, Fe<sup>2+</sup>'nin rejenere edilmesinde, sistemdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ayrışmasında önemli bir etkiye sahiptir. Aynı zamanda uygulanan akım yoğunluğuna bağlı olarak sistemin doğrudan işletme maliyetine etki eden

oldukça önemli bir parametredir. Elektrotlara verilen akım büyüklüğü arttıkça Fenton prosesi için gerekli olan ve anot yüzeyinde bulunan  $Fe^{+2}$ 'nin sisteme girişi artmakta ve uygulanan akımın yoğunluğu arttıkça enerji tüketim maliyeti de artmaktadır(Yıldırım,2007).

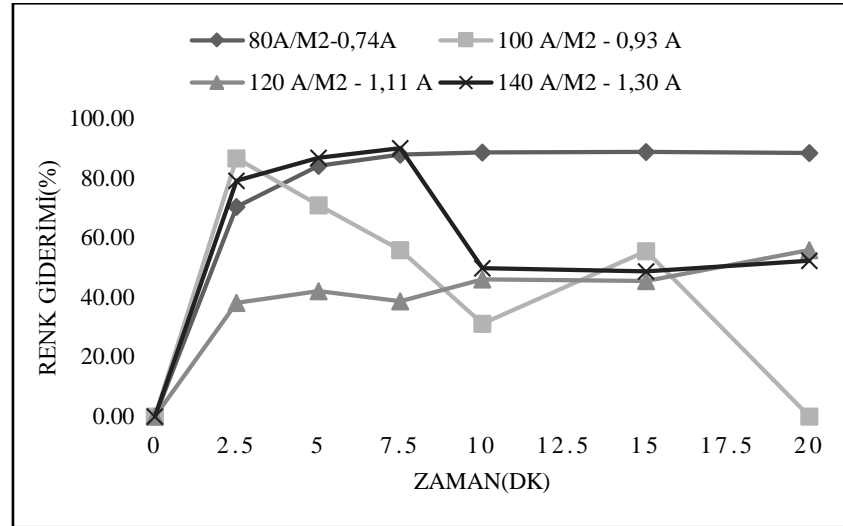
Yüksek DC uygulamaları ise anottaki  $Fe^{+2}$ 'nin fazla üretilmesinin bir sonucu olarak OH radikallerinin sistemde hızlı tüketimine yol açar ve zamanla ortamda  $Fe^{+2}$ 'nin aşırı oluşmasından dolayı sistemdeki reaksiyon verimi önemli ölçüde azalarak, ortamda kimyasal çamurun birikmesine neden olur(Şahinkaya, 2017). Bu durum da sistemin arıtma kalitesini bozar. Bütün bu nedenlerden ötürü sistemdeki enerji maliyetinin fazla olmaması için, uygulanacak olan akım yoğunluğu iyi seçilmelidir(Atmaca, 2009).

Yapılan çalışmalarda akım yoğunluğuna bağlı olarak atıksuyun arıtma verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle demir anot, çelik katot elektrot çifti ile yapılan deneyler sırasında pH, karıştırma hızı ve karıştırma süresi sabit tutulmuştur. 80 ile 140 A/m<sup>2</sup> aralığında çeşitli akım yoğunlukları uygulanmıştır. Deneylerde kullanılan sabit koşullar; pH=3, karıştırma hızı 250 rpm ve karıştırma süresi 20 dk 'dır. Elde edilen sonuçlar şekil 4 ve şekil 5' de verilmiştir.



Şekil 4. Akım yoğunluğunun KOİ giderimi üzerine etkisi (pH=3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, Elektrot yüzey alanı:93,04 cm<sup>2</sup>, Elektrotlar arası mesafe:10mm)

Şekil 4' de gösterilen Elektro-Fenton deney sonuçlarında uygulanan akım şiddetinin zamana bağlı olarak KOİ giderim verimine olan etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sistemde 80 A/m<sup>2</sup> uygulanan akım yoğunluğunda KOİ giderim verimi %69'a kadar ulaşabilirken, 140 A/m<sup>2</sup>'de uygulanan akım yoğunluğunda ise KOİ giderim verimi %91'e ulaşmıştır. Uygulanan akım şiddeti arttıkça KOİ giderim verimi de önemli derecede arttığı görülmüştür. 20.dk'dan daha fazla sürelerde alınan numunelerde ise KOİ giderim verimi oldukça azalmıştır. Bunun nedeni sistemde uygulanan akım yoğunluğunun artmasına bağlı olarak, ortama salınan  $Fe^{+2}$ 'nin sistemde fazla yüklenmesi ve demir iyonlarıyla reaksiyona girecek olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, yeteri kadar sistemde var olmaması KOİ giderim verimini önemli derecede azaltırken, sistemde oluşan çamurun artmasına ve çamurun bloklaşarak dibe çökmesine sebep olmuştur.



Şekil 5. Akım yoğunluğunun renk giderimi üzerine etkisi (pH=3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2000 mg/L, Elektrot yüzey alanı:93,04 cm<sup>2</sup>, Elektrotlar arası mesafe:10mm)

Şekil 5’de ise elde edilen sonuçlara göre en yüksek renk giderim verimi 80 A/m<sup>2</sup> ‘de %88 iken, 140 A/m<sup>2</sup>’de ise %91’dir. Akım yoğunluğundaki artış renk giderim verimini önemli ölçüde değiştirmeyen yasanına göre sistemdeki akım yoğunluğunun artmasına bağlı olarak sistemin enerji tüketimi artış göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda KOİ ve renk giderimi için en uygun akım yoğunluğu belirlenirken, sadece arıtma süresinin en az olduğu değer değil, aynı zamanda yüksek enerji tüketimi gerektirmeyen akım yoğunluğu da göz önünde bulundurulmalıdır(Yıldız ve ark., 2007).

Farklı akım yoğunlukları için yapılan çalışmada; akım yoğunlukları, reaksiyon süresi, verim ve voltajdaki artış göz önüne alınması gerektiğini göstermiştir. Bu durumda deneylerde uygulanan akım yoğunluğuna bağlı olarak voltaj değerinin artması doğrudan enerji tüketimini(kwh/m<sup>3</sup>) arttırdığını gösterdi. Ancak deney süresince uygun akım yoğunluğunda yüksek KOİ ve renk verimi sağlanmaya çalışıldı ve seçilen akım yoğunluğunda KOİ giderimi %91, renk giderimi ise 20 dakikalık sürenin sonunda %92,8 olduğundan akım yoğunluğu 140 A/m<sup>2</sup> değerinde, KOİ ve renk giderimi için istenilen verime ulaşıldığı gözlemlendi ve akım yoğunluğu 140A/m<sup>2</sup> seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.

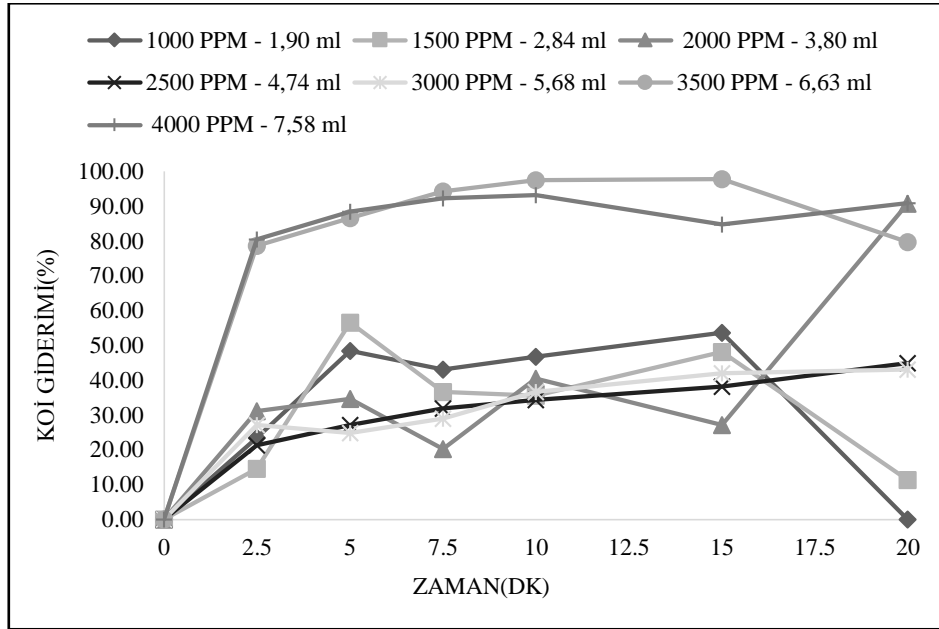
### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Miktarının KOİ ve Renk Giderim Verimi Üzerine Etkisi

Elektro-Fenton deneylerinde sistemde oluşması beklenen OH radikallerinin ana kaynağı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ‘dir. Tekstil atıksuları gibi kirlilik yükü fazla olan atıksularda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının optimum dozunun belirlenmesi Elektro-Fenton proseslerinde oldukça önemlidir.

Uygulanan hidrojen peroksit miktarının artmasıyla genellikle kirleticilerin parçalanma hızı artmaktadır (Kang ve Hwang, 2000).

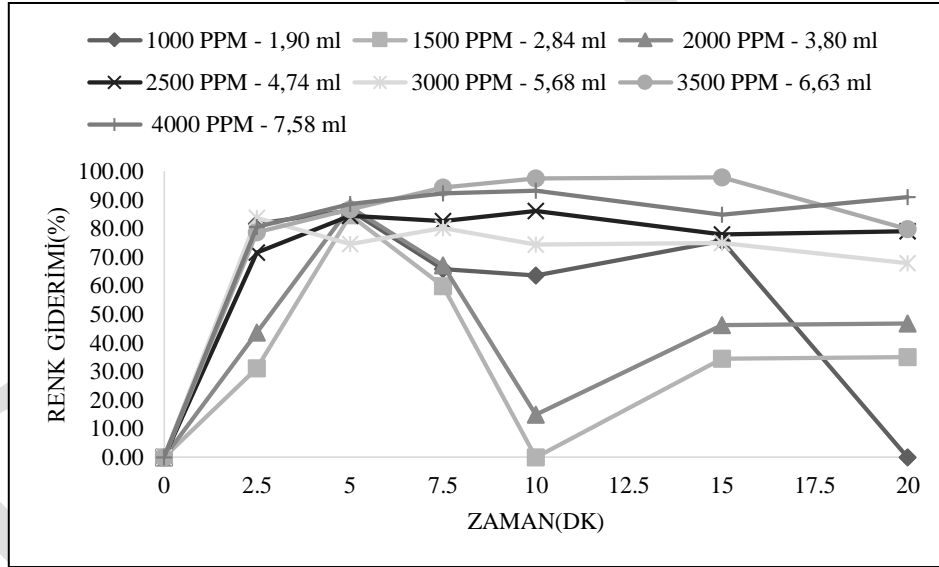
Ancak, fazla miktarda sisteme ilave edilen hidrojen peroksit konsantrasyonu durumunda, EF proseslerinin ana kaynağı olan hidroksil radikalleriyle reaksiyona gireceğinden tavsiye edilmemektedir. Aynı zamanda fazla hidrojen peroksit konsantrasyonu KOİ’nin artmasına da neden olmaktadır.

Uygun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi için 3. seri çalışma olarak yapılan çalışmalarda optimum pH = 3 ve akım yoğunluğu 140 A/ m<sup>2</sup>’de sabit tutulmuş, deney süresi 20 dk olarak belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi için 1000-4000 mg/L arasında değişen 7 farklı konsantrasyon ile çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda değişken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonlarında KOİ ve renk giderim sonuçları şekil 6 ve şekil 7’de verilmektedir.



Şekil 6. Giriş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun KOİ giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:140 A/m<sup>2</sup>, pH:3, , Elektrot yüzey alanı:93,04 cm<sup>2</sup>)

Şekil 6’da görüldüğü gibi sisteme eklenen yüksek konsantrasyonlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KOİ giderim verimini önemli derecede artırmaktadır. Ancak yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimleri, sistemin maliyetini de artıracığından optimum dozun belirlenmesi gerekir.



Şekil 7. Giriş H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun renk giderimi üzerine etkisi (Akım yoğunluğu:140 A/m<sup>2</sup>, pH:3, , Elektrot yüzey alanı:93,04 cm<sup>2</sup>)

Şekil 7’de ise, sisteme eklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı arttıkça renk giderim verimi de yüksektir. Ancak bu durum başlangıçtaki OH radikallerinin sistemdeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına bağlı olarak daha fazla üretilmesinin bir sonucudur.5.dk’dan sonra genel olarak renk giderim veriminde düzensiz durumlar yaşanmış ve zamana bağlı olarak azalma meydana gelmiştir. Bunun nedeni ise zamanla OH radikallerinin ayrışıp, istenmeyen ara ürünler meydana getirmesinden kaynaklanmaktadır.

Yapılan çalışmalara göre, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının yüksek konsantrasyonları KOİ giderimini önemli derecede artırırken, renk giderim verimi üzerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir.20 dakikalık EF süresi sonunda 20.dk’da maksimum %91 KOİ giderim verimi elde edilirken, maksimum renk giderim verimi ise 5.dakikada %88 olarak bulunan ve optimum değer olarak kabul edilen 2000 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonudur. Uygun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesinde KOİ ve renk giderim verimleri göz önüne alınmış ayrıca sistem maliyetleri de düşünülmüştür.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada kirlilik yükü yüksek tekstil atık sularından, bir ileri arıtım prosesi olan EF yöntemi ile KOİ ve renk giderimi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde Elektro-Fenton yöntemi diğer biyolojik arıtım metotlarına göre daha etkili olduğu, daha iyi KOİ ve renk giderimi sağlayabildiği görülmüştür. Ancak bu prosesin uygulanabilirliğini etkileyen birçok parametre mevcuttur. Bu nedenle uygun pH, uygulanacak akımın büyüklüğü, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi işletme parametrelerinin dikkatli seçilmesi gerekmektedir. Çalışmada, optimum işletme koşulları başlangıç pH 3, akım yoğunluğu 140 A/m<sup>2</sup> başlangıç H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi 2000 mg/L ve arıtım süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminin ve akım yoğunluğunun yüksek olması yöntemin büyük ölçekli uygulamalarını kısıtlar niteliktedir. İleride yapılacak çalışmalarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oluşum reaksiyonlarının geliştirilmesi ve atık suyun iletkenliğini artırılması sistemin maliyetini önemli derecede düşüreceği için, büyük ölçekli uygulamalara geçilmesinde fayda sağlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.MUH.1904.18.010 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Alver, Alper. Aksaray İli Düzenli Depolama Sahası Sızıntı Suyu Karakterizasyonu ve Elektrokimyasal Arıtılabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, 2012.
- Atmaca, E. (2009). Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method. *Journal of Hazardous Materials*, 109–114.
- Deng, Yang; Englehardt, James D. “Treatment of landfill leachate by the Fenton process”. *Water Research* 40 (2006) 3683 – 3694.
- Do, Thi May; Young Byun Ji; Hoon Kim, Sang, “An Electro-Fenton System Using Magnetite Coated Metallic Foams as Cathode For Dye Degradation”. *Catalysis Today* 295 (2017) 48–55.
- Enerjiportali. (2019, 4 16). <https://www.enerjiportali.com/>
- Gümüş, Dilek; Akbal, Feryal, “Comparison of Fenton and electro-Fenton processes for oxidation of phenol” , *Process Safety and Environmental Protection* 103 (2016) 252–258.
- Kang, Y.W. and Hwang, K. “Effect of reaction conditions on the oxidation efficiency in the fenton process. *Water Research*”. (10), 2786-2790.
- Oturan, A. and Aaron , J.J.2014. “Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications”. *A Review.Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44:2577–2641.
- Ozyonar, F., & Karagozolu, B. (2014). “Investigation of technical and economic analysis of electrocoagulation process for the treatment of great and small cattle slaughterhouse wastewater”. *Desalination and Water Treatment*, (52) : 74-87.
- Şahinkaya, S. (2017). Plastik geri dönüşüm tesisi atıksularının Fenton ve Elektro-Fenton prosesleri ile arıtımı. *Mühendislik Dergisi Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi*, 631-639.
- Yamaç, Duygu. Tekstil Boyar Maddesinin Sulu Çözeltilerinden Elektrokimyasal Yöntemler İle Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Şubat 2016
- Yıldırım, Ömür. Kağıt Endüstrisi Atıksularının Elektro-Fenton Prosesiyle Arıtılabilirliğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karaelmas Üniversitesi, 2007.
- Yıldız, Y.Ő., Koparal, A.S., İrdemez, ő. and Keskinler, B., “Electrocoagulation of synthetically prepared waters containing high concentration of iron using iron cast electrodes. *Journal of hazardous materials*”, (2007),139(2), 373-380.
- Zhang, H., Choi, H.J., Huang, C.P. (2005), “Optimization of Fenton Process for the Treatment of Landfill Leachate”, *Journal of Hazardous Materials*, 125, 166-174.

## Mechanization level of agricultural farms in three-irrigation plains of Çanakkale province

Sakine Özpınar<sup>1</sup> Pınar Gürgeç Irmaklı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Farm Machinery and Technologies Engineering, Agriculture Faculty, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, 17020, Turkey

<sup>2</sup>Branch Directorate Ankara of State Hydraulic Works, Ankara  
Corresponding author: sozpinar@comu.edu.tr

### Abstract

This study was conducted to determine farm structure and mechanization level in agricultural farms in the Bayramiç-Ezine-Kumkale irrigation plains located in Çanakkale province. For this purpose, a questionnaire was carried out randomly selected 401 farms of 30 villages according to farmers recording system in 3-irrigation plain. Results indicated that the agricultural farms had almost one-tractor regardless of power and brand on average 3-irrigation plain, but 19.20% of farms had more than one tractor which was highest in Bayramiç plain by 41.67% because there are different production branches such as field and horticulture crops as well as livestock production. This rate was 20.54% in Kumkale and 8.41% in Ezine. On the other hand, the highest tractor number (including both one and more than one tractors) was recorded in Kumkale (70.07%), followed by Bayramiç (11.97%) and Ezine (11.47%).

When the age of tractors was considered, 12.00% of tractors were determined as older than fourth-four years such as MF-135, Universal and Fiat (54C, 480). The most used tractor brands were determined as New Holland (32.15%) and it was respectively followed by Massey Ferguson (18.99%), Fiat (9.11%), Jon Deer (8.10%), Case (7.85%), Same (5.05%), Deutz (4.05%), Steyr (3.54%), and Valtraa (2.28%) and others such as Ford, Hattat, Erkunt, Başak, Tümosan, Universal, Kubato and Landini. Kumkale plain has more tractors with 60.00% than Ezine (31.65%) and Bayramiç (8.35%). On average 3-irrigation plain, 77.03% of the farms were purchased new tractors, 22.97% of the remaining farms have been used the second-hand type tractors. On the other hand, tractor per farm was 0.94 on average 3-plain, but it was the highest in Ezine (0.96) followed by Kumkale (0.93) and Bayramiç (0.92). Arable land per tractor were found 124 da/tractor on average 3-plain while it was the highest in Kumkale (134 da/tractor) followed by Bayramiç (116 da/tractor) and Ezine (101 da/tractor).

**Key words:** *Mechanisation properties, agricultural farms, agriculture systems*

### 1.INTRODUCTION

Çanakkale, located in the Southern Marmara Region, is one of the most important agricultural province with 331 633 hectares of arable land which has 1.39% rate within country (23 930 676 hectares). The agricultural area in the province shows different distributions according to its districts, for example Biga ranks first with 18.22% (60 422 hectares) within all districts. This is followed by Gelibolu (11.99%, 39 748 hectares), Lapseki (10.91%, 36 190 hectares), Ayvacık (10.03%, 33 256 hectares), Bayramiç (9.58%, 31 780 hectares), Yenice (8.53%, 28 303 hectares), Ezine (8.11%, 26 894 hectares), Çan (8.01%, 26 572 hectares), Centre (7.40%, 24 551 hectares), Eceabat (5.58%, 18 506 hectares), Gökçeada (1.01%, 3 350 hectares) and Bozcaada (0.60%, 2 061 hectares). There are 76.9% (255 025 hectares) of arable land with fallow area, that can be actively cultivated in the province, while others are 9.75% (32 340 hectares) olive groves, 6.13% (20 340 hectares) vegetable including greenhouse, 5.80% (19 246 hectares) horticulture, 1.41% (4 682 hectares) vineyard. Field crops is excessively grown in Biga, Çan, Gelibolu and Yenice, while fruits and vineyard are usually grown together with field crops in the districts of Bayramiç, Lapseki and Centre. In addition, olive cultivation is one of important occupation in the districts of Ayvacık, Ezine and Bayramiç with 32 340 hectares of olive groves where covered Ezine (35.20%), Ayvacık (36.10%) and Bayramiç (12.50%). On the other hand, vineyard is only one crop grown in Bozcaada island with 25.10% of the total of 4 682 hectares in the province.

The current number of agriculture farms in the province is around 49 thousand and the average size of the farms is 68 decares which is over in the country (61 decares). The small family farm group ranges from 0-50 decares where constitutes 66.76% of the total farms in the province. The small family agriculture farm group is divided into three-group as 0-10, 10-20 and 20-50 decares and the highest number of farms was recorded for 20-50 decares with 64.19%. This is followed by the smallest farm group (0-10 decares) with 20.80%, and then medium group (10-20 decares) with 15.00%. Medium-sized family farms vary between 50-200 decares and the share of farms in total is 31.23%, while 50-100 decares of farms with 69.43% is higher than 100-200 decares with 30.57%. The number of farms with 200 decares and above represents 2.00% and being the large group of farms. In general, dry farming was carried out commonly in 100 decares and above farms which are



usually grown with cereal crops. In recent years, the production of animal husbandry increased and this increased legumes growing with cereal crops in the area. On the other hand, vegetable and fruit are generally grown in small size parcels ranges from 0 to 50 decares. These parcel sizes consist of 33.60% (1 114 287 decares) of total agricultural land (3 316 330 decares) of the province, and their average size is 34.2 decares per farm. Farmers have 50-200 decares farm size that constitute 54.40% (1 804 084 decares) of the all lands when others represent 12.00% (397 960 decares) with 200 decares and above. 1 132 580 decares (34%) of the total cultivated agricultural land in the province tend to be irrigable when 797 400 decares of these lands were currently irrigated with the dams such as Bayramiç, pond and groundwater wells. 542 270 decares of these lands were irrigated with dams built by State Hydraulic Works (DSI) and the remaining 255 130 decares with the contribution of Special Provincial Administration. The largest irrigable lands were recorded in Biga (32.61.0%), followed by Bayramiç (15.83%), Yenice (12.59%), Center (11.02%), Ezine (8.96%), Lapseki (7.05%), Ayvacik (3.55%), respectively, and the remaining of 5.64% is located in the island districts, Bozcaada and Gökçeada. In all province agricultural areas, field crops were grown in 43 117 hectares (53.81%) of 801 230 hectares under the irrigable lands, paddy, maize, alfalfa, beans, while vegetables (tomato, pepper, melon, cabbage and others) were cultivated in 19 585 (24.44%) hectares of the total area, the remaining of 1 7421 (21.74%) hectares were cultivated for horticulture (apple, cherry, peach, pear, plum, etc.). In the province, animal production is one of important agriculture brands which were carried out together with crop cultivation, and recorded approximately 17 thousand heavy and 9 thousand small livestock farms. Farmers including both animal and crop production have registered in different organizations such as Agricultural Chamber (63.88%), Farmer Registration System (26.54%), Sheep-Goat Breeding Association (7.96%) and Beekeepers Association (1.61%).

Geographical structure and climatic characteristics of the province have favoured for both field crops and animal production which were lead to increase the number of agricultural machineries. Moreover, the presence of irrigable and dry farming (rainfed) is another factor that contributes to increase the number of agricultural machinery with the different type and capacity as well as different power size tractors. Therefore, there are a total of 25 498 tractors in the province regardless of brand, power size, model and axle characteristics. Considering the total agricultural area of the province, there was recorded 130 decares per tractor. On the other hand, different workable capacity of tillage and seed-bed preparation, sowing-planting, sprayer, harvesting machines have high level in the area. For animal production in the province, additionally, silage, bale-making, feed mixing and preparation, and milking machines also constitute an important of the machine park. In addition, in recent years, there has also been a significant increase in facilities and irrigation systems with the increase in the use of dams, ponds and underground water wells. This type of irrigation systems has increased particularly in Bayramiç, Ezine and Kumkale irrigation plains because there has been more dams and ponds or groundwater wells were already used to irrigate for the agriculture. In this respect, mechanization has an important role in producing more efficiently products per unit area as quality and quantity. The increased irrigation possibilities in the area, especially in 3-irrigation plain, it increased the variety of agriculture crops in similar to the many kind of agriculture machinery. This crop variety has occurred in both field and horticulture agriculture, main crops are corn, paddy, alfalfa, walnut, peach, nectarine, etc. In addition, the forage used in animal production along with irrigation has increased and this allowed animal production to become more popular. Therefore, with the increase of agricultural machinery, it has contributed to the addition of new agricultural crop varieties to the existing crop pattern and to provide higher yield from unit area. When a ranking is made in terms of production area throughout the province, wheat is the first crop with 798 676 decares under both rainfed and irrigable conditions. This was followed by olives (32 3403 decares), barley (259 378 decares), oats (277 491 decares), sunflower (218 798 decares) and silage-maize (153 885 decares), paddy (82 367 decares) and grain-maize (56 296 decares). In horticulture, olive is mostly grown crop while peach, apple, walnut, cherry and almond were among the most other grown crops. In vegetable cultivation, tomato, pepper, melon and other green-leaf winter vegetables such as lettuce are the most grown crops.

The potential of agricultural production is popular in the province when considering the geographical structure and climate characteristics of the province, and also the soil structure, crop pattern, cultivation systems under both dry-farming (rainfed) and irrigable conditions. In recent years, with the being of water resources into dams and ponds, as well as wells there has been an increase in the crop variety under irrigable conditions, and there is also an effort to achieve higher efficiency from unit area. For higher crop yield from unit area, the mechanization is one of most important factors which have effect on crop quality and quantity. For this reason, it is to determine the potential of agricultural production and the current-mechanization in the irrigation plains of Kumkale, Ezine and Bayramiç which are located in basins of Bayramiç Dam. A survey was conducted in the pre-determined agricultural farms by using the Farmer Registration System of the Provincial Directorate of Agriculture and Forestry. The questionnaire survey was completed by interviewing face-to-face with agriculture farmers in the villages of the three-irrigation

plain. The data obtained from the surveys were evaluated in Excel spreadsheet to achieve the results of the social status of the farmers, the agricultural structure and farm size, the mechanization properties of the farms.

## 2.MATERIAL AND METHOD

Çanakkale province (39°27'-40°45' N, longitude; 25°40'-27°30' E, altitude located in South Marmara Region. The province (331633 hectare) has approximately 1.39% of agriculture area of the country (23930676 hectare). There are 48747 agricultural farms in the province, 21999 farms (45.13%) are only under Farms Recording System. In recent, irrigated cropping systems of province increased by 3.00% instead of dry farming due to increasing irrigation dams or other water resources, especially in the arable area of 3-plain named Bayramiç-Ezine-Kumkale. The 70.41% of the total irrigable agricultural area are irrigated by irrigation systems such as dam and ground water wells in the province while this rate is 65.00% in the country. So the study was conducted in villages of 3-irrigation plains have irrigation water by Bayramiç Dam during 2017-2018 growing season. The size of required sample was determined using Neyman method in order to collect data from studied area (Yamane, 1967).

$$n = \frac{N^2 \cdot s^2 \cdot t^2}{(N - 1) d^2 + (s^2 \cdot t^2)} \quad (1)$$

where n is the required population (sample size), N is the number of olive farmers in the target population, s is the standard deviation, t is the t-value at 95% confidence limit (1.96), and d is the acceptable error. The permissible error in the sample size was defined to be 5% for 95% confidence. Based on this method of sampling, 401 farms were identified from the study area. 123 villages among 177 villages in three-plain were recorded while agriculture is the main occupation. 30 villages determined among 123 villages and questionnaire was conducted. The numbers of questionnaire were 11 of 34 villages in Bayramiç (Ağaçköy, Ahmetçeli, Çavuşköy, Doğanç, Pınarbaşı, Pıtreli, Saçaklı, Tülüler, Yahşeli, Türkmenli, Centre), 11 of 39 villages in Ezine (Akköy, Ballıklı, Güllüce, Kızılköy, Pazarköy, Taştepe, Yenioba, Üvecik, Mamudiye, Pınarbaşı, Centre) and 8 of 50 villages in centre of province covering only Kumkale plain (Dümrek, Gökçalı, Akçapınar, Kumkale, Halileli, Çıplak, Tefikiye, Kalafat). In the selection of the villages which are the basis of the questionnaire, a purpose of sampling method was applied so that the farmer characteristic of the plains remaining in the irrigation area. Farmers were interviewed face to face, researchers used the questionnaires to conduct personal interviews with farmers or workers known to use machinery intensively. Questions concentrated especially on the agricultural land, total parcel of agriculture land, parcel size in owned or hired type, farmer numbers as labour, their age and education level, machinery use. Data analysis was conducted to find out the required results of the study. All data obtained from the questionnaire were evaluated in Excel programme.

## 3.RESULTS and DISCUSSION

### 3.1.Social status of farmers and farm structure

The age distribution of the surveyed farmers ranged between 35-65 years (Table 1). After interviewing farmers, data clearly indicate that the majority of the farmers are belonging to middle-age (20-50 years), while age under 30-year and over 60-year is comparable very low. The average age of the farmers in the Ezine irrigation plain is 50-year old, while it was 46 and 42-year in Kumakle and Bayramiç plain, respectively. It was indicated that farmers occupied with agriculture in the plains of Kumkale and Bayramic are younger than in Ezine. The farmers covered a narrow of age groups with the least under 42 years in villages of Bayramiç. In recent years, the agricultural incentives provided by government for agricultural branches have increased the interest and efforts of the young agricultural engineers in agriculture. On the other hand, the increase in the use of mechanization in agriculture and the use of machines that require high technology knowledge which was known more by younger age farmers groups. In contrast, it was found that majority of the farmers were in the age of 41-50-year (Table 1). Considering over all, average age was around 47, and more middle-age group was occupied with agriculture activities. This shows that the income of the young people is mainly from non-agricultural sources. In addition, another study conducted in Europe, Asia, Africa where were observed similar results that the labour of age in agriculture was stated to be between 40 and 45 years (Matthews, 2008). Author found that 40-49 years old were more popular in European when the least farmers were under 40. In another research carried out in the same area by questionnaire for vineyard farmers (Aydın et al., 2017) found the highest rate in 41-50 age range by 31.20% followed by 51-60 age by 30.90%.

**Table 1.** Age of the farmers in the studied farms

Irrigation plain	All surveyed farms (nm.)	Age known farmers		Age ranges		
		Rate in all surveyed farms (nm.)	Rate in all surveyed farms (%)	Max. (year)	Min. (year)	Average (year)
Ezine	107	93	86.92	72	23	50.13±11.78 (23.50)*
Kumkale	258	187	72.48	76	23	46.39±10.92 (23.55)
Bayramiç	36	36	100.00	62	20	41.47±9.78 (23.59)
General	401	316	78.80	76	20	46.94±11.33 (24.14)

\*Mean age± standard deviation (coefficient of variation).

Sometimes labour by manpower were used to performed the agricultural activities, for example, such as hand-hoeing, harvesting, etc. (Table 2), but the intensity of use of human labour varies according to the person working in agriculture activities in each family. When all of the surveyed farms were taken into consideration, the number of person in the family changed between 2-5 person and it was found that it was 4-person on average (Table 2). Farmers are generally composed of middle-size families (4-5 persons per family). In a similar study conducted by Aydın et al. (2017) in the same area concluded middle-size family as 44.2% in total, while multi person family type (6 or more persons per family) is 21.3%. According to the gender status of the existing family population and the status of working in agriculture, the number of males working per farm is approximately 1.5 person, this was recorded for female as one-person. As seen in Table 2, although the use of mechanical energy in agriculture is increasing, human labour is still an important resource. Harvesting and other similar practices were still carried out by human in the area the fact that the labour force in agriculture is needed.

**Table 2.** The status of working in agriculture according to the number and gender of the person in the surveyed farm family

Irrigation plain	Total family person (nm.)	Rate in family (%)		Working status in agriculture according to gender	
		Male	Female	Male (nm.)	Female (nm.)
Ezine	3.64±1.69 (46.51)	58.12	41.88	1.39±0.87 (62.63)	1.34±0.85 (63.57)*
Kumkale	4.17±1.59 (38.15)	61.75	38.25	1.55±0.78 (50.27)	0.96±0.80 (83.22)
Bayramiç	3.75±0.76 (20.12)	53.93	46.07	1.33±0.53 (40.09)	1.14±0.35 (30.80)
General	4.00±1.57 (39.36)	39.84	60.16	1.49±0.79 (52.81)	1.05±0.79 (75.19)

\*Average family person number± standard deviation (coefficient of variation).

In the scope of the questionnaire, the farmers are conducted their activities under some organizations relation to agriculture, for example, the farmer registration system, agriculture association (irrigation, aquaculture, animal, etc.), dealers (agrochemical, machinery, seed, etc.), agricultural credit cooperative, the chamber of agriculture. Farmers usually prefer this type social organization in order to be able to carry out their agricultural activities and to benefit from the support given by government. It was determined that the farmers were mostly in the farmer registration system (FRS) within the Directorate of Agriculture and Forestry by 65.84% in total surveyed farmers (Table 3). According to the records of the Directorate of Agriculture and Forestry, a total of 22371 farmers were registered in the system and approximately 33% of them were found to be composed of farmers who were settled in Bayramic, Ezine and Kumkale irrigation plains. In field crop production, the FRS has an important role in the arrangement of agricultural policies, in the updating of farmer information and in the supervision of agricultural support programs. FRS was followed by others such as agricultural associations (51.87%) and the chamber of agriculture (31.92%). Registration rates such as other agricultural dealers, cooperatives, and small and medium-sized units (KOSGEP) were low and ranged from 3.99 to 2.99%. However, according to the recording system of the Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, it has been reported that the rate of organization in the agricultural area is high and the rate of cooperatives is 65.00% (372 cooperatives), and 37.00% in the country. 309 of cooperatives were based on agricultural development, 37 for irrigation and 26 for aquaculture. It has been reported that 14 agricultural developments, 1 irrigation and 5 aquaculture cooperatives were located in the Bayramic basin, while they were 13, 2 and 1, in Ezine basin and 18, 4 and 4 in the Kumkale basin, respectively. According to the data provided by the Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, a total of 100 agrochemical dealers and 50 agricultural machinery dealers, 126 seed dealers, (TARIS, agricultural chamber, agricultural credit have 6, 9 and 41, respectively) were recorded. However, despite the high rate of organization systems in the province, farmers' organizations

unfortunately cannot effectively arrangement on the marketing of the agricultural products as well as determining current prices. Although the cooperatives have little effect on marketing of fresh fruit and vegetables produced in all around the studied area, the facilities of the cold-air storage units have an important role to keep the agricultural products for long-time. On the other hand, it is revealed that the farmers registered in more than one organization have high level in the area. For example, a farmer with FRS was also found to have registered in the Agricultural Dealer, for example, cooperative and agricultural chamber at the same time. According to these results, it was seen that the farmers had a high tendency to register to the relevant agricultural organizations which registered their own information and kept their rights.

**Table 3.** Registration of agricultural organizations in the studied agricultural farms

Irrigation plain	NSF (nm.)	FRS (%)*	AA (nm.)	AA (%)*	AD (nm.)	AD (%)*	COOP (nm.)	COOP (%)	KOSGEP (nm.)	KOSGEP (%)*	AC (nm.)	AC (%)*	
Ezine	107	67	62.62	41	38.32	8	7.48	4	3.74	11	4.26	20	18.69
Kumkale	258	180	69.77	152	58.91	4	1.55	12	4.65	11	4.26	104	40.31
Bayramiç	36	17	47.22	15	41.67	3	8.33		1	2.78	4	11.11	
General	401	264	65.84	208	51.87	15	3.74	16	3.99	12	2.99	128	31.92

\*Percentage in number of surveyed farms. NSF, Number of surveyed farms; FRS, Farmer Registration System according to [Çanakkale Directorate of Provincial Agriculture and Forestry](#); AA, Agriculture Association; AD, Agrochemical dealer; COOP, Cooperative; AC, Chamber of Agriculture.

Access to information from farmer's registration of agricultural systems is more common and more practical (Table 4). It was indicated that the information accessing by phone as short message service (SMS) which provides practical opportunities such as realizing some agricultural practices on time such as weather forecast (rainfall, wind, frost warning), agricultural supports, information about agriculture, etc.

**Table 4.** The communication methods to reach information by the farmers

Irrigation plain	Number of surveyed farms (nm.)	Phone (nm.)	Phone (%)	Computer (nm.)	Computer (%)
Ezine	107	70	65.42	37	34.58
Kumkale	258	154	59.69	104	40.31
Bayramiç	36	20	55.56	16	44.44
General	401	244	60.85	157	39.15

### 3.2. Agricultural mechanization and its indicators in surveyed farms

#### 3.2.1. The relationship between agricultural area and tractor

According to the surveys of the farms per tractor, the average of the three irrigation plains was 124 da/tractor and this was found to be higher with 134 da/tractor in Kumkale plain (Table 5). This was below the general average in two other plains, 116 da/tractor for Bayramiç and 101 da/tractor for Ezine. On the other hand, when the current tractors per farm was considered, the average of three plains was 0.94 tractor/farm, it can be say that there was less than one tractor per farm. The numbers of tractor per farm was determined as 0.96, 0.93 and 0.92 tractors/farm in Ezine, Kumkale and Bayramiç, respectively. When these indicators of the surveyed farms were compared with the total number of land, farms and tractors in the registration system of the villages, some of the indicators considered for surveyed farms were showed a linear situation. For example, the agricultural area per tractor was 124 da/tractor in the surveyed farms while it was determined higher with 125 da/tractor for total agricultural area of village.

**Table 5.** Agriculture farms, agricultural area (owned+hired), tractors and their indicators in both the studied and all village farms

Irrigation plain	Total agriculture area, number of tractors and farms, indicators in the studied villages					According to Directorate of Agriculture and Forestry Farmer Registration System, total agriculture area, number of tractors and farms in each village, indicators				
	Agri. area (da)	Tractor (nm.)	Farm (nm.)	(da/trac.)	(trac./farm)	Agri. area	Tractor	Farm	(da/trac.)	(trac./farm)
Ezine				101	0.96	101500	936	754	111	0.81
Kumkale	32140	239	258	134	0.93	86895	1315	1169	75	1.30
Bayramiç	3840	33	36	116	0.92	72095	990	903	190	0.91
General	46412	375	401	124	0.94	260490	3241	2826	125	0.91

### 3.2.2. Availability Tractors and Brands

There were recorded 17-tractor brand in the study area in regardless of irrigation plains or villages (Table 6) while there are more than 30 brands in the country as local and foreign ones according to The Turkish Association of Agricultural Machinery and Equipment Manufacturers (TARMAKBIR, 2017). New Holland was recorded the highest brand with 32.15% in the surveyed farms followed by Massey Ferguson (18.99%), and then Fiat (9.11%), John Deer (8.10%), Case (7.85%), Same (5.06%), Deutz (4.05%), Steyr (3.54%), Valtraa (2.28%), Tumosan (2.53%), Basak (1.27%), Universal (1.27%), Hattat (0.51%) and Kubato (0.25%), etc. There are more NH and MF because there are sales dealers and service facilities for both tractor brands in the province. Service dealers of these two tractor brands can sometimes come across the province in sales departments because they offer tractors such as Hattat, Kubato, Valtra and Deutz. In addition, tractors such as Same, Universal, Steyr and Tumosan were sold as second-hand in the area due to no-sales and service facility (Table 6). In similar, Aybek and Sener (2009), they concluded that mostly used tractor type on farms were Massey Ferguson with the rate of about 36.3% regardless of model type. In contrast, others were found that the most popular tractor brands were Fiat, followed by New Holland and Massey Ferguson which were sold by Turk Tractor Company (Civelek, 2016).

**Table 6.** Tractors according to their brands in the studied farms

Plain	MF	NH	FR	HT	FI	SM	ER	BA	CS	ST	TM	JD	DTZ	UN	KB	LN	VLT	TN* (%)	
Ezine	24	35	4	1	26	7	1	1	12	2	3	4	5	0	0	0	0	125	31.65
Kumkale	38	89	3	1	10	12	1	3	16	10	6	23	10	4	1	3	7	237	60.00
Bayramiç	13	3	0	0	0	1	0	1	3	2	1	5	1	1	0	0	2	33	8.35
General	75	127	7	2	36	20	2	5	31	14	10	32	16	5	1	3	9	395	100
	18.99	32.15	1.77	0.51	9.11	5.06	0.51	1.27	7.85	3.54	2.53	8.10	4.05	1.27	0.25	0.76	2.28	100	

\*TN, tractor number in each irrigation plain. MF, Massey Ferguson; NH, New Holland; FR, Ford; HT, Hattat; FI, Fiat; SM, Same; ER, Erkunt; BA, Başak; CS, Case, ST, Steyr; TM, Tumosan; JD, John Deer; DTZ, Deutz; UN, Üniversal; KB, Kubato; LN, Landini; VLT, Valtra; MC, MC Cormic.

Table 7 and 8 show tractor number according to their brands in each surveyed village. According to the both Table 7 and 8, it was concluded that the surveyed farms have one tractor brand or more than one. 19.20% of farms have more than one tractor brands (Table 8), while 74.31% of farms have one tractor brand (Table 7). The single brand used in the farms are usually New Holland, Massey Ferguson and Fiat, followed by others such as Case, Deutz, etc. (Table 7), while the two or more tractor brands using together were NH+NH, NH+MF, NH+JD, NH+TM, NH+CS and others. In both cases, The New Holland can be said to be the most widely used brand and this is due to the existing its dealer and service facilities in the province. Considering each irrigation plains, 41.67% of farms have more than one tractor brands in Bayramiç plain, followed by Kumkale with 20.54% and Ezine with 8.41% (Table 8). The reason using of the higher rate one than more one tractor brands in Bayramiç plain was more occupation of agricultural branches such as field crops, horticulture as well as animal production.

**Table 7.** Number of farm having different tractor brands in each surveyed village of 3-irrigation plain, and the number of tractors/surveyed farms (%)

Plain	TSF	MF	NH	FR	HT	FI	SM	ER	BA	CS	ST	TM	JD	DTZ	UN	KB	LN	VLT	TF	TN/TSF (%)*
Ezine	107	3	9		1	12	2	1		4	1	2	2						37	34.58
Kumkale	258	38	86	2	1	10	12	1	3	15	9	6	23	10	3	1	3	5	228	88.37
Bayramiç	36	4	12				1		1	3	2	1	5	1	1			2	33	91.67
Gen. (nm)	401	45	107	2	2	22	15	2	4	22	12	9	30	11	4	1	3	7	298	74.31
(%)		15.10	35.91	0.67	0.67	7.38	5.03	0.67	1.34	7.38	4.03	3.02	10.07	3.69	1.34	0.34	1.01	2.35	100	

\*Farms have tractors for all surveyed farms according to tractor brands (TN/TSF). TN, tractor number; TSF, Number of all surveyed farms; TF, total farms having tractor with purchase criteria.

**Table 8.** Number of farm having more than one tractor brands in each surveyed village of 3-irrigation plain, and the number of tractors/surveyed farms (%)

Plain	TSF	NH+ NH	NH+ FI	NH+ MF	NH+ BA	NH+ SM	NH+ JD	NH+ TM	NH+ ER	NH+ CS	MF+ MF	MF+ FI	MF+ DTZ	JD+ JD	JD+ KB	TM+ STR	CS+ MC	TN	TN/TSF (%)*
Ezine	107	1	1		1	1	1				2	1					1	9	8.41
Kumkale	258	16	0	7	0	3	7	5	3	7	0	3	0	0	1	1	0	53	20.54
Bayramiç	36	2	0	7	0	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	15	41.67
Gen. (nm)	401	19	1	14	1	4	10	5	4	7	1	5	1	1	1	2	1	77	19.20
(%)		24.68	5.21	18.18	1.30	5.19	12.99	6.49	5.19	9.09	1.30	6.49	1.30	1.30	1.30	2.60	1.30	100	

### 3.3. Tractors owned by farms and the effects of factors on purchasing

The first-hand as new and second-hand purchasing of tractors are identified in all farms of villages (Table 9), but it was recorded only one in some farms, and two type purchasing in others. When considering the results, it is concluded that one of the way to have the tractors in farms is to purchase new tractor while this rate corresponds 77.03% for 3-plain. On the other hand, it was determined that the ratio of the tractor ownership in the second-hand was about 22.97%. It was concluded that with the change in agricultural production branches and crop pattern in irrigation plains, the tractors requirements with different characteristics has increased and it is appropriate to meet purchasing with second-hand tractors to continue without interruption of the farm operations. In addition, it is also say that standard type tractors are sufficient for the completion of the work in animal production, especially for forage feeding operations. For this purpose, it is also emphasized that it is more economical to purchase the second-hand type of tractors without active working properties. When considering the studied farms to have tractors, agricultural production branches has been identified as an important factor with availability of service facility, spare parts, while Özpınar and Çay (2018) concluded similar results for purchasing tractor for farms. They also reported that the tractor power was the more efficiently factor, followed by the service availability, PTO properties and others such as the bank loan, fuel saving, wheel and gear characteristics.

**Table 9.** Number and rates of new or second-hand tractors in surveyed farms in three-plain

Plain		MF		NH		FR		FI		SM		ER		BA		CS		TN	
		(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)
Ezine	NH	11	68.75	24	75.00			11	73.33	6	66.67	1	100.00			4	57.14	3	23.08
	SN	5	31.25	8	25.00	1	100.00	4	26.67	3	33.33					3	42.86	10	76.92
	Tot	16	100.00	32	100.00	1	100.00	15	100.00	9	100.00	1	100.00			7	100.00	13	100.00
Kumkale	NH	35	89.74	83	96.51	2	66.67	6	60.00	5	41.67	1	100.00	2	66.67	10	66.67	9	69.23
	SN	4	10.26	3	3.49	1	33.33	4	40.00	7	58.33			1	33.33	5	33.33	4	30.77
	Tot	39	100.00	86	100.00	3	100.00	10	100.00	12	100.00	1	100.00	3	100.00	15	100.00	13	100.00
Bayramiç	NH	1	33.33	11	100.00						1	100.00		1	100.00	2	100.00	2	100.00
	SN	2	66.67																
	Tot	3	100.00	11	100.00					1	100.00		1	100.00	2	100.00	2	100.00	
General	NH	47	81.03	118	91.47	2	50.00	17	68.00	12	54.55	2	100.00	3	75.00	16	66.67	14	50.00
	SN	11	18.97	11	8.53	2	50.00	8	32.00	10	45.45		0.00	1	25.00	8	33.33	14	50.00
	Tot.	58	100.00	129	100.00	4	100.00	25	100.00	22	100.00	2	100.00	4	100.00	24	100.00	28	100.00

**Table 9.** Number and rates of new or second-hand tractors in surveyed farms in three-plain (continue)

Plain		TM		JD		DTZ		UN		KB		LN		VLT		HT		TN	
		(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)	(nm)	(%)
Ezine	NH	4	80.00	4	100.00											1	100.00	69	65.71
	SN	1	20.00		0.00	1	100.00											36	34.29
	Tot	5	100.00	4	100.00	1	100.00									1	100.00	105	100.00
Kum	NH	6	85.71	9	42.86	8	80.00	3	100.00	1	100.00	2	66.67	7	100.00	1	100.00	190	80.85
	SN	1	14.29	12	57.14	2	20.00		0.00		0.00	1	33.33					45	19.15
	Tot	7	100.00	21	100.00	10	100.00	3	100.00	1	100.00	3	100.00	7	100.00	1	100.00	235	100.00
Bayramiç	NH	1	50.00	5	100.00	1	100.00		0.00					1	100.00			26	86.67
	SN	1	50.00					1	100.00									4	13.33
	Tot	2	100.00	5	100.00	1	100.00	1	100.00					1	100.00			30	100.00
General	NH	11	78.57	18	60.00	9	75.00	3	75.00	1	100.00	2	66.67	8	100.00	2	100.00	285	77.03
	SN	3	21.43	12	40.00	3	25.00	1	25.00			1	33.33					85	22.97
	Tot.	14	100.00	30	100.00	12	100.00	4	100.00	1	100.00	3	100.00	8	100.00	2	100.00	370	100.00

\*NH, first-hand (new) tractor; SH, second-hand (old) tractor; TN, total tractor number.

### 3.4. Applied methods to purchase the tractors for farms and effective factors

When the financial methods used in the purchasing of tractors for farms were considered, it was found that the highest system was agricultural loan system with 61.63%, whereas in cash purchasing was lower with 35.17% because loan system gives the farmers time opportunity to do their step-by-step re-payments (Table 10). It is determined that the loan system is generally pay with 5% cash in advance and the rest is repaid within next 20-60 months. Additionally, it is stated that the loan system is the most effective system to purchase the tractor for farms because it provides financial facilities for long-time period. In addition to this purchase method, it is stated that agricultural credit system is not preferred by farmers due to its low advantage compared to the loan

system due to higher interest rate. Moreover, it was also emphasized that the loan system facilitates provide to the farmers to purchase different type, varying power size, axle type and tractor brands, but this system is varying depending on bank loan system (Özpinar and Çay, 2018).

**Table 10.** Common purchasing methods to purchase tractors for the surveyed farms

Irrigation plain	Cash		Loan		Agricultural credit		Total	
	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)
Ezine	32	35.56	48	53.33	10	11.11	90	100.00
Kumkale	75	32.89	153	67.11	0		228	100.00
Bayramiç	14	53.85	11	42.31	1	3.85	26	100.00
General	121	35.28	212	61.63	11	3.20	344	100.00

Two factors have been emerged to be important to purchase the tractors for farms, one of which is the size of the agricultural land, and other is the appropriate or reasonable price of the tractor (Table 11). Therefore, when the Table 11 is considered, it was said that the size of the land is more effective factor to purchase a tractor when the 67.15% of the farms have preferred this type method. On the other hand, the rest of the farms, have encouraged the reasonable price in regardless of tractor brand, power size and axle number or type because they have emphasized that the reasonable price is sometimes the easy way system due to simple access way of tractors.

**Table 11.** Effective factors on purchasing of tractors for the studied farms

Irrigation plain	Land size		Reasonable price		Total	
	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)
Ezine	52	56.52	40	43.48	92	100.00
Kumkale	171	74.03	60	25.97	231	100.00
Bayramiç	11	39.29	17	60.71	28	100.00
General	234	67.15	117	32.85	351	100.00

### 3.5. The proficiency level of the current tractors in farms

Considering on average tractor number in 3-irrigation plains, 64.62% of farms have been found to be sufficient number of tractors to carry out their agricultural operation (Table 12). However, it is stated that the current tractors are not sufficient to carry out agricultural operations in 35.38% of farms which were occupied more than one agricultural branches such as field, horticulture and animal production. The common of animal production in the region together crop production has revealed the requirement for tractors with different power sizes and characteristics. On the other hand, in some villages of the Bayramiç and Ezine irrigation plains, where the province and the survey area were carried out, it was determined that the cultivation of the horticulture together with the field cultivation increased the requirement of the tractors in different power and brands. In addition, the absence of sharing farm machinery or tractor system in the region or province, it was determined that each farmer have to buy required tractor and machinery to carry out their agricultural operations on time. On the other hand, farmers borrow the machinery or tractors from neighbours that is traditionally sustainable system in the area.

**Table 12.** The proficiency level of the tractors in the farms

Irrigation plain	Sufficient		Insufficient		Total	
	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)
Ezine	49	56.32	38	43.68	87	100.00
Kumkale	156	67.53	75	32.47	231	100.00
Bayramiç	16	66.67	8	33.33	24	100.00
General	221	64.62	121	35.38	342	100.00

### 3.6. Varying and distribution of age statues of owned tractors by farms based on brands

The age characteristics of the tractor brands in the studied farms have been observed in similar the country farms (Table 13). Current tractors in the farms were classified according to their age on the basis of brand, and then they were divided into two groups as young (0-20-year) and old (20-year and over). The age grouping on the brand basis was done by selecting the youngest and oldest age tractors. When considered according to age groups; the age of tractors such as MF, Fiat and JD are quite high compared to other brands. For example, MF and JD were found to be in the age group of 44 years which is old age group category. However, although

there were found to be very old tractors for both tractor brands, the youngest tractors were also recorded for the same brands because of the reason of its long term using in the agriculture area. The other reason may be the presence of MF brand in the province due to the availability of seller gallery, service facility and spare-parts which were especially settled in Ezine district. On the other hands, some models of NH, Erkunt, Kubato and Valtra were found younger than MF and JD. For example, although NH brand was used in the country agriculture for long time, they were reasonably took place in young group range for the studied farms. It can be said that the existence of NH tractors in the farms as well in the province are depending directly on the availability of the seller gallery, service facility which provide an increase in the use of this brand. In the province, the NH tractors have progressively increased to use in the agriculture after the sellers and service facilities were served in the area from 2010-year. Therefore, NH has caused to be in the category of young age category as well as in the study area of the farms. Similarly, the same opportunities for young age brands have allowed to increase its sales and used widely in the area. Özpınar and Çay (2018) found similar results about tractors age in respect to brands. On the other hand, many tractors brands found within 15-year economic life age range, (Tezer and Sabancı, 1997). In a similar study, it was found that 45% of total tractors' economic life over our country is over than 15-year old (Civelek, 2016).

**Table 13.** Age group of tractors according to their brands in surveyed farms regardless of villages and irrigation plains

Tractor brand	Age group (year)		Young		Old		Tot. Trc. (nm.)
	Young	Old	(nm.)	(%)	(nm.)	(%)	
Massey							
Ferguson	7.29±4.61(63.25)*	44.33±15.63(35.25)	60	89.55	7	10.45	67
New Holland	4.88±3.52(72.15)	6.75±4.92(72.95)	120	94.49	7	5.51	127
Ford	6.75±4.92(72.95)	44.38±19.25(43.38)	3	75.00	1	25.00	4
Fiat	13.50±16.26(120.47)	27.50±15.31 (55.66)	21	84.00	4	16.00	25
Same	4.60±2.41(52.35)	12.50±10.97(87.73)	17	77.27	5	22.73	22
Erkunt	5.00±1.00(20.00)	6.00±2.00(8.00)	1	100.00	0.00		1
Başak	5.00±3.83 (76.59)	17.67±4.73(26.75)	2	40.00	3	60.00	5
Case	5.75±3.30(57.46)	10.33±8.04(77.82)	21	87.50	3	12.50	24
Steyr	18.20±12.85 (70.62)	24.00±3.46(14.43)	20	80.00	5	20.00	25
Tümosan	4.91±3.52(71.59)	8.33±4.93(59.19)	13	86.67	2	13.33	15
John Deer	4.00±4.24(106.07)	8.33±7.07(84.85)	24	80.00	6	20.00	30
Deutz	5.85±1.30(22.23)	15.50±20.21(130.37)	11	91.67	1	8.33	12
Universal	15.50±20.21(130.37)	35.75±6.88(19.25)	3	75.00	1	25.00	4
Kubato	4.91±3.52(71.59)	5.00±2.94(58.88)	1	100.00	0.00		1
Landini	3.00±1.00(33.33)	6.75±4.92(72.95)	3	100.00	0.00		3
Valtra	5.00±3.35 (66.93)	7.17±2.47(34.42)	8	100.00	0.00		8
Hattat	5.33±2.52(47.19)	15.50±20.51(132.30)	2	100.00	0.00		2
			330	88.00	45	12.00	375

\*Mean tractor age± standard deviation (coefficient of variation).

#### 4. CONCLUSION

The existence of the possibilities for the sustainability of agricultural production have crucial importance. Sometimes the existence of these possibilities is not enough for sustainable agriculture, but also they have to be used correctly. Therefore, it is necessary to know agricultural possibilities in an agricultural area and to determine them for to be planned for next projections. For this purpose, a questionnaire survey is conducted to make the necessary determinations about agriculture activities which were performed by mechanization possibilities and human sources. The questionnaire survey was carried out to determine the agriculture structure and mechanization for some villages of Bayramıç-Ezine-Kumkale irrigation plain in Çanakkale province. In surveyed farms, families generally have 4 persons on average, and the 2 male and 1 female person per family are working and occupying in the agriculture activities. Farmers have some organizations to keep their products right, for example; more popular was the farmer recording system followed by agriculture chamber, agrochemical dealers, and others. On the other hands, agricultural activities are conducted according to traditional production systems despite having enough tractor. Additionally, many tractor brands have been recorded in the studied farms that they were included different brands such as Massey Ferguson, New Holland, Ford, Valtra, Tümosan, Deutz, Kubato, Erkunt, Hattat, Case, but Massey Ferguson and New Holland were the highest because of existence of their service facilities in the province. Farms generally have more than one tractor brands due to existence of more than one agriculture occupation branches such as field crop, horticulture



and animal production. Tractor number per farm with 124 in surveyed farms was higher than in the province with 0.91 tractor/farm which were less than one tractor. Arable agricultural area per tractor was found higher in the surveyed farms by 401 da/tractor than in the province by 125 da/tractor that means is the lower tractor number or more agriculture are than in the province. Farmers were preferred the ways that is to purchase the tractor for farms using terming system (loan), which is ranges between 20-60 months compared with cash and agricultural credit systems. 88% of tractors recorded in farms were included in young group varying 0-20-year, while 12.00% were old, 20-year and over, particularly including old series of Massey Ferguson, Ford, Fiat.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was produced as a Part of Pınar Gürgeç Irmaklı's thesis which was financially supported by the Canakkale Onsekiz Mart University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project code: FYL-2018-2520).

#### REFERENCES

- Aybek A, Senel H 2009. Mechanization properties and users' evaluations of farm tractors in Eastern Mediterranean Turkey. *Journal of Agricultural Machinery Sci.* 5 (1), 21-27.
- Aydın B, Özkan E, Hurma H, Aktaş E, Azabağaoğlu Ö, Özdemir G 2017. Efficiency analysis of irrigation administration (Cases of Kırklareli, Edirne, Tekirdağ and Çanakkale Provinces). *Turkish J of Agricultural and Natural Sci.* 4(1):70-78.
- Civelek Ç 2016. Turkey's demand for agricultural tractors and machinery. *Scholars J of Agriculture and Veterinary Sci.*, 3(1), 51-57.
- Matthews GA 2008. Attitudes and behaviours regarding use of crop protection products-A survey of more than 8500 smallholders in 26 countries. *Crop Protection.* 27:834-846.
- Özpınar S, Çay A 2018. The Role of agricultural mechanization in farming System in a continental climate. *Journal of Tekirdag Agriculture Faculty (JOTAF).* 15(02), 58-72.
- Yamane T. *Elementary sampling theory.* New Jersey: Prentice-Hall Englewood Cliffs, Inc.; 1967.
- TARMAKBİR, 2017. <http://www.tarmakbir.org/en/news/1302-turkish-tractor-industry-as-of-august-2017.html>.
- Tezer E, Sabancı A 1997. *Agricultural mechanization.* I. Çukurova University Agriculture Faculty General Publication. No:44, Adana.

## Comparison of energy use in Mediterranean olive cultivation: A case study of Çanakkale olive orchards (Turkey)

Sakine ÖZPINAR

Agriculture Faculty, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, 17020 Turkey

Corresponding author:sozpinar@comu.edu.tr

### Abstract

The aim of this study was carried out on use of energy input and output olive production under traditional-flat/sloping olive orchards and intensive or full mechanized-flat orchards in Çanakkale province located south Marmara region, the one of the origin of olive growing in western Turkey. Data were collected from olive farms through personal interviews of farmers in all districts of province. The results show that olive yield per unit area was very low with Ayvalık variety, especially under sloping orchards and non-irrigated-flat orchards of traditional systems.

Total energy outputs from olive and its pruning residues was the highest for intensive-flat orchards by 36.55 GJ/ha due to fairly high olive and pruning yield because of receiving usually fertilising, irrigation, spraying, etc., but the energy output in the traditional-flat corresponds to almost the half of the intensive-flat with 19.73 GJ/ha, and followed by traditional-sloping with 10.50 MJ/ha. Total energy inputs, farm operations and machinery, was found 31.09, 13.22 and 7.38 GJ/ha for intensive-flat, traditional-flat and sloping olive orchards, respectively. Energy ratio were higher for intensive-flat by 1.46, while it is 1.32 and 1.31 in both flat and sloping of traditional, respectively. Energy productivity is the highest in the intensive-flat by 0.93 MJ/ha, and the lowest in traditional-sloping by 0.69 MJ/ha, while traditional-flat is 0.90 MJ/ha. Specific energy increased in traditional-sloping by 1.46 MJ/kg due to the lowest olive yield followed by traditional-flat with 1.11 MJ/kg and intensive-flat with 1.07 MJ/kg having the highest olive yield.

**Key words:** *Olive, production system, input-output energy.*

### 1.INTRODUCTION

Olive (*Olea europaea*) is a Mediterranean crop cultivated in many regions across the world. The origin of the cultivated olive tree lies rooted to legend and tradition. It started firstly about 5000-6000 years ago within coast of Mediterranean Sea. The production of the olive can bring two important products that are olive fruit and its oil; and also one important by-product named as pruning residues used sometimes as mulch as well as energy sources. In last decades, olive tree is cultivated in many countries across the world, but Mediterranean basin countries (Spain, Greece, Italy, Turkey, Tunisian, etc.) are the major olive and its oil producers in the world. Olive production recently increased, due to the introduction of innovations in the farming systems and cultivars. There are around 11 million ha throughout more than 35 countries, of which 95% are located in ten-country of Mediterranean basin (FAO, 2016). Turkey is sixth country of world with around 846 thousand ha. Only 8% of the olive areas are irrigable, but the majority of the olive orchards are situated in more than 15% slope. The Çanakkale province located in the south Marmara region, has most attribute in olive production and ranked as second producer province with 32,340 ha and about 173 thousand ton yield in Turkey (TUIK, 2017). In olive production, there are three main olive systems: traditional, semi-intensive and intensive or full-mechanized with 8 (73%), 2.9 (26%), 0.09 (1.0%) million ha, respectively, (FAO, 2016). In Çanakkale, traditional is typically located in remote mountainous and also frequently found on sloping lands with 40-100 tree ha<sup>-1</sup>, including 87% of the total area, very old trees and high labour input (TUIK, 2017). Weed control is maintained by grazing which is common without fertiliser, especially on sloping areas. Semi-intensive, known as traditional on flat areas, is more intensive than traditional on sloping, use of chemical fertilisers and pesticides, weed control by tillage or herbicides, occasional irrigation, semi-mechanized harvest. On the other hand, over the last decades, traditional olive production, especially on flat areas, has been converted to intensive systems, characterized by high tree density with irrigation practices while the conversion improves olive yield and quality by using high amount of input energy. Intensive system has very high tree density (more than 200 trees ha<sup>-1</sup>), high input of fertilisers and pesticides, and irrigation, mechanical harvest and pruning, but represent only a small percentage of the area of olive orchards. The varieties Gemlik and Ayvalık are dominant that adapt well to different conditions and covers most of the olive orchards. Gemlik is the most common table olive, covering 20% of all orchards. Ayvalık produces high quality olive oil, covering 95%.

Agriculture sector is an energy consumer and supplier (in the forms of biofuels) in many countries or regions. The most of agricultural operations consume energies in the form of non-renewable energies such as fossil fuels. Therefore, the energy analysis depending on the different countries and regions was required to optimize

the energy consumption for sustainable agriculture. However, input energy in each agricultural operation may vary according to the amount of input or production system. The input energy may vary greatly from one country to another, but also from one region to another within the same country, due to the local characteristics of plantations, production practices, socioeconomic structure, climate and sometimes cultural conditions. Kaltsas et al. (2007) investigated the energy analysis in different olive production systems in Greece of three different regions. They found that the energy of the fertilizer application was significantly higher in conventional than in organic olive systems. Guzmán and Alonso (2008) studied the input energy in conventional and organic olive production in Spain under three different regions. They showed that, the energy efficiency of irrigated area was lower as opposed to dry-area (i.e. non-irrigated) regardless of their type of production system. They also concluded that the organic olive systems have higher non-renewable energy efficiency in comparison with the conventional ones. So far there was no study about energy analysis of olive in Çanakkale province although it is one of the four biggest producer province of olive in the country. The purpose of this study was to determine inputs and outputs energy in two traditional (flat and sloping) and intensive (flat) olive production systems in the province located in Marmara region.

## 2.MATERIAL AND METHOD

**Experimental site.** Olive belt region of the Çanakkale province located in the northwest Turkey, the southern part of the Ida mountain (Figure 1), covering a total area of 993 thousand ha, all cropping area of 331,633 ha, 32,340 ha (9.75%) of them are olive, while 3.3% of total olive area is under organic farming. The number of olive trees are 5,139,962 (Table 1), which is a total of 2.94% of the number of olive trees in Turkey (17,4594,147 tree) while olive production is 67,013 ton, 3.19% of olive production of Turkey with 2,100,000 ton (TUIK, 2016). 67% of the olive orchards are cultivated from wild olive, but the rest of them is produced from cultivar varieties. The many farmers occupied with olive production, corresponds to 1.98% of the total farmers in Turkey. In the province, 80% of the olive orchards are located mountainous and slopes and are not easily approach, often ancient tree on nature terraces with high labour input, the remaining 20% are located in flats are accompanied by field crops in permanent or annual, only 8% of the olives in flats are irrigated (Saraycık, Geyikli villages), usually for newly planted trees. 35.38% of trees are grown in Ayvacık district followed by Ezine (32.77%) and Bayramiç (11.50%), while they are under monoculture in the Kuçukkuyu site-Ayvacık up to 250 m height of Ida mountain. Old orchard size was 2.5 ha, ranged usually from 0.4 to 10 ha. Olive yield is 18.2 kg/tree, but fruit oil content and yield vary depending on periodicity as influenced by typical “off” and “on” years and variety, while sometimes reached 70-75 kg/tree in productivity year and sometimes decreased 30-35 kg/tree under unfertile sloping lands. The pruning residues presented in Table 1 for productivity and non-productivity trees with 16.91 MJ/kg energy equivalent (Bilandzija *et al.*, 2012).

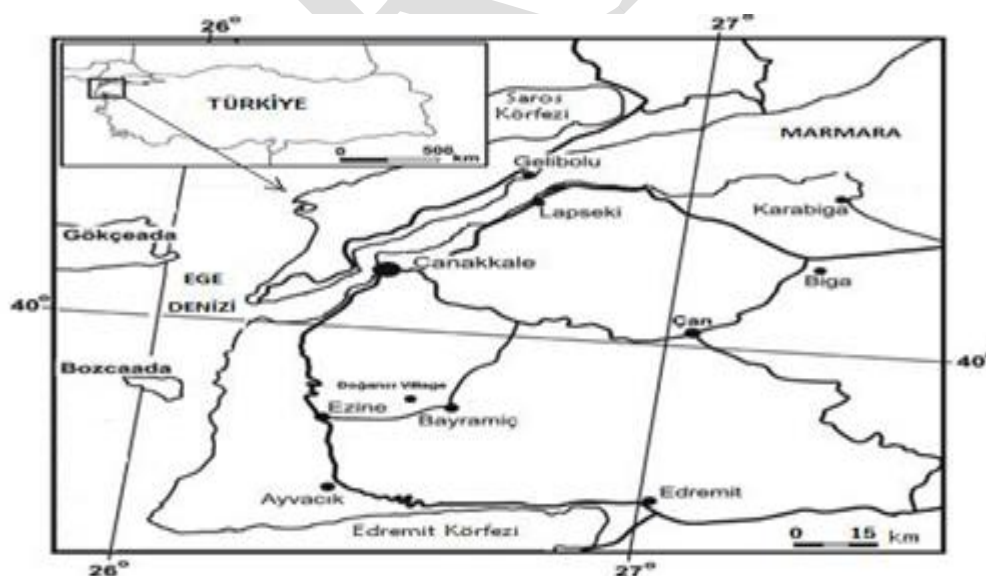


Figure 1. Location map of the study area

**Table 1** The number of tree and the weight of pruning residues for productivity and non-productivity olive trees in the province

District	Number of trees (x1000)			Total pruning (ton/year) <sup>a</sup>			Usable-pruning (ton/year) <sup>b</sup>		
	PRO	NPRO	Total	PRO	NPRO	Total	PRO	NPRO	Total
Ayvacic	1797	22	1819	16314	100	16413	11420	70	11489
Bayramiç	482	109	591	4374	497	4871	3062	348	3409
Biga	39	25	65	358	114	472	251	80	331
Bozcaada	33	17	50	297	77	374	208	54	262
Eceabat	494	16	509	4482	72	4554	3137	50	3188
Ezine	1456	228	1684	13225	1034	14258	9257	724	9981
Gelibolu	79	3	82	716	12	728	501	9	510
Gökceada	151	2	153	1374	8	1382	962	6	967
Lapseki	85	21	106	768	97	865	538	68	605
Centre	11	71	82	96	324	420	67	227	294
Total	4626	514	5140	42003	2334	44337	29402	1634	31036

<sup>a</sup> Weight of pruning residues on dry basis is 9.08 and 4.54 kg tree<sup>-1</sup> per year, respectively, for productivity and non-productivity trees. It assumed 0.70% of total pruning residues while 0.30% is not collected. PRO, productivity; NPRO, non-productivity.

**Data collection.** Data were collected from farmers who engaged with olive production on flat and sloping areas of all districts of Çanakkale. The study volume was determined by random sampling method by Hemmati *et al.* (2013). In this study area, input resources vary according to olive production systems and flat/sloping olive orchards. In traditional system on flats, inputs are human labour for all cultural practices (pruning, tillage, spraying, harvesting, diesel fuel, chemical fertiliser, farmyard manure, pesticides, water for irrigation, electricity, tractor with trailer for transportation), when machinery are used rarely for tillage to control weed, but sometimes herbicides are used instead of tillage operations and the output is only olive yield. Pruning residues are also assessed for energy generation varying type of olive trees, productivity and non-productivity. Traditional systems do not use chemical fertilisers, instead they had highest consumption rate of farmyard manure, especially in flats. There are similar inputs in traditional-sloping, except for transporting olives which were done by human labour and draft animal, and without farmyard manure, herbicides and tillage. Input resources of intensive olive production systems were human labour and machinery for all cultural practices.

**Energy sources.** The inputs and outputs are evaluated and then converted into energy values by using appropriate energy conversion factor. Energy conversion factors expressed the energy input expanded in the production and distribution of a unit physical material.

Machinery energy is indirect energy assumed to be contained in a piece of equipment resulting from its manufacture. Machinery weight is calculated by distributing its weight over the total economy life of it.

$$ME = \frac{cf W}{Fc L} \quad (1)$$

Where, ME is machinery energy (MJ/ha), Cf is the energy conversion factor of the machinery used (86.77 MJ/kg) (Pimentel *et al.*, 1973), W is the weight of the machinery (kg), Fc is the effective field capacity (ha/h) and L is the economic life of the machinery (h).

Fuel energy per unit area is a function of the type (diesel or petrol) and amount of fuel consumed by the machinery used to power engines and multiplied by an energy conversion factor.

$$FE = \frac{fcon fc}{A} \quad (2)$$

Where, FE is fuel energy (MJ/ha), fcon is the amount of fuel consumed (l), fc is the fuel energy conversion factor (47.78 MJ/l) (Kitani, 1999) and A is the farm area covered (ha).

Human energy expense in olive cultivation system was calculated based on the number of farm workers engaged in an operation per unit area and the time they spent in performing the operations multiplied by an energy conversion factor.

$$HE = \frac{n H lc}{A} \quad (3)$$

Where, HE is human energy (MJ/ha), n is the number of labours engaged in an operation, H is the time of operation (h), lc is the energy conversion factor for human labour (1.96 MJ/h) (Sing and Mital, 1992) and A is the cultivated area covered by olive (ha).

The energy contained in the pesticides is calculated based on the amount of the chemicals sprayed per unit area and multiplied by an energy conversion factor.

$$PE = \frac{Pq Pc}{A} \quad (4)$$

Where, PE is pesticide energy (MJ/ha), Pq is the weight of pesticides (kg), Pc is the pesticides energy conversion factor (120 MJ/kg) and A is the olive cultivated area (ha).

The energy contained in both chemical fertilizers and farmyard manure was calculated according to the amount of fertilizer used per unit area (kg/ha) and the percentage composition of the basic primary elements contained in the fertilizer and multiplied by an energy conversion factor for farmyard manure (Sing and Mital, 1992) and the compound chemical fertilizers with nitrogen, phosphorus, potassium element (Mudahar and Hignett, 1987).

$$FTE = \frac{FTq \sum_{i=1}^n FTi FTci}{A} \quad (5)$$

Where, FTE is fertilizer energy (MJ/ha), FTq is the weight of fertilizer (kg), FTi is the percent composition of ith element (decimal), FTci is the energy conversion factor of the ith fertilizer element (78.1, 17.1 and 13.7 MJ/kg, N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and K<sub>2</sub>O) and A is the olive cultivated area (ha).

Electricity energy refers to the electricity used to operate irrigation pump in the cultivation system. The output of electric motor was calculated by the product of the rated power of the electric motor, the time consumed in operation and load factor. The load factor is equal to actual electricity consumed during operation over electricity consumed at rated power.

$$EE = Fc Tc Cv Load\ factor \quad (6)$$

Where, EE is the energy output of the machine (kWh), fc is the fuel consumption of the machine (l/h), Tc is the time consumed in operation (h), Cv is the caloric value of the fuel (kWh/l) and load factor.

$$Load\ factor = \frac{Actual\ fuel\ consumed}{Fuel\ consumed\ at\ rated\ power} \quad (7)$$

The energy contained in water irrigation was calculated based on the amount of water used for irrigation (MJ/m<sup>3</sup>).

$$WE = \frac{Wq Wc}{A} \quad (8)$$

Where, WE is the water energy (MJ/ha), Wq is the amount of water (m<sup>3</sup>), Wc is the energy conversion factor (1.02 MJ/m<sup>3</sup>) (Rafiee et al., 2010) and A is the farm area (ha).

Energy requirements for transportation per unit area are calculated as energy intensity per weight and unit of distance travelled (assumed 10 km) and then multiplied by an energy conversion factor.

$$TE = \frac{Tq Td Tc}{A} \quad (9)$$

Where, TE is the transportation energy (MJ/ha), Tq is the weight (ton), Td is the distance travelled (km) (assumed 10 km), Tc is the energy conversion factor (9.22 MJ/(ton km) (Kitani, 1999) and A is the farm area (ha).

The draft animal (monkey and horse) energy expense in olive cultivation system was calculated based on the number of animals engaged in an operation per unit area and the time consumed in performing the operations and multiplied by an energy conversion factor.

$$AE = \frac{n H lc}{A} \quad (10)$$

Where, AE is the draft animal energy (MJ/ha), n is the number of animal labours engaged in an operation, H is the time of operation (h), lc is the energy conversion factor for labour of monkey-1.5 hp (4.04 MJ/h) and horse-3.8 hp (10.10 MJ/h) (Sing and Mital, 1992) and A is the cultivated area covered by olive (ha).

Total input energy (TIE) per unit area in each olive cultivation system was estimated as the summation of energy from all the sources.

$$\text{TIE} = \text{MEFE} + \text{HE} + \text{PE} + \text{FTE} + \text{EE} + \text{WE} + \text{TE} + \text{AE} \quad (11)$$

**Energy patterns.** The values of inputs and output energy and the yield per unit area were used for obtaining the following energy indices, Energy ratio (the energy use efficiency), energy productivity, specific energy and the net energy gain.

$$\text{Energy ratio (dimensionless)} = \frac{\text{Output energy (MJ/ha)}}{\text{Input energy (MJ/ha)}} \quad (12)$$

The energy productivity provides quantitative data on how much olive is obtained per unit of input energy. It was determined as the ratio of yield (kg ha<sup>-1</sup>) to input energy (MJ/ha).

$$\text{Energy productivity (kg/MJ)} = \frac{\text{Olive fruit yield (kg/ha)}}{\text{Input energy (MJ/ha)}} \quad (13)$$

The specific energy gives an indication of how much energy was used to produce a unit of olive yield, and it was determined as the ratio of input energy to the olive yield.

$$\text{Specific energy (MJ/kg)} = \frac{\text{Input energy (MJ/ha)}}{\text{Olive fruit yield (kg/ha)}} \quad (14)$$

Net energy gain is defined as the difference between the total output energy produced and the total energy used for obtaining it. It was obtained by subtracting input energy from output energy.

$$\text{Net energy gain (MJ/ha)} = \text{Output energy (MJ/ha)} - \text{Input energy (MJ/ha)} \quad (15)$$

There are two forms of input energy which are divided into direct and indirect. Direct energy is required to perform various tasks related to olive cultivation operations (tilling, fertilizing, spraying, irrigation, harvesting, transportation). Indirect energy consists of the energy used in the manufacture, packing and transport of fertilizers, plant protection products and farm machinery and it computed by summation of their energies used in performing the operations

### 3.RESULTS AND DISCUSSION

Human labour used commonly in production of olive orchards and it was higher in sloping orchards than in flat (Table 2). Considering sloping orchards, all practices were almost done by human, pruning, harvesting, transporting, etc. In the area, harvesting conducts in two ways by hand and mechanically, and consumes more inputs compared with other practices. However, sometimes it is conducted combination with harvester tools powered by electric or fuel oil is powered by human labour or tractor, and self-propelled harvester. Using both hand held shaker or self-propelled harvester reduced the production costs. The hand held shaker also increased the work productivity with doubled rate compared with harvesting by hand. When harvesting is done by hand, labour input at olive cost is around 70% of annual expenses, but when mechanical methods are used, this rate drops to around 50% (Tombesi *et al.*, 2002). However, human labour in this study is higher, especially in sloping by 91.94%, but it is lower in traditional and intensive orchards on flat, 8.66% and 3.10%, respectively (Table 2). Under traditional-flat, tillage, spraying, fertilising, etc., are done by machine under appropriate land conditions to operate machinery. Tillage is almost never done in traditional-sloping, but rarely in flat (85%) and rather high in intensive orchards. Movers and weed cutters are used as main equipment, but mouldboard plough sometimes used in autumn or early spring 2-3 times per year, while rotovator and disc harrow are being used more often. Disk harrow and cultivator are traditionally used for weed control, while herbicides have been used recently instead of tillage. The tillage operation is very difficult because nearly 80% of the olive orchards in Çanakkale are in arid and sloping areas. Spraying was 1-2 times per year. Orchards irrigated 15 times per year at Mid-May to Mid-September under intensive orchards. To improve soil structure, farmyard manure applied at the early spring season (March and April) during the rainy season, especially in traditional orchards. In the traditional-flat, manure applied by tractor with trailer, but it was usually transported and applied and incorporated to soil by human in the traditional-sloping. Similarly, under intensive-flat orchards, manure is applied at the same time and rate. In addition, a part of chemical fertilisers applied at spring (March and April) and the remaining part applied at summer season under irrigation conditions according to farmer statements or local expertise recommendation. The conditions of the olive orchards being flat or sloping, tree

density and cultural practices cause to make differences on their inputs usage. From the questionnaire, it was observed that the use of draft animal (horse and donkey) as power source was existence to transport harvested olive from slope orchards to collection area.

**Table 2.** Energy inputs and outputs in olive production orchards

Unit Input	Traditional-sloping		Traditional-flat		Intensive-flat	
	MJ/ha	%	MJ/ha	%	MJ/ha	%
Human labour	6786	91.94	1145	8.66	964	3.10
Diesel fuel	191.2	2.59	765	5.79	2876	9.25
Machinery	403.3	5.46	8238	62.32	22322	71.78
Chemical fertilisers	0		1848	13.98	2791	8.98
Nitrogen (N)	0		1562		2343	
Phosphorus (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0		122		174	
Potassium (K <sub>2</sub> O)	0		164		274	
Farmyard manure			1192	9.02	596	1.92
Pesticides	0		30	0.23	30	0.10
Water for irrigation	0		0		918	2.95
Electricity	0		600		600	1.93
Total energy input	7381	100.00	13218	100.00	31097	100.00
Output	10498		19732		36548	
Pruning	9608(91.52) <sup>a</sup>		10676(54.11)		12122(33.17)	
Olive	890(8.48) <sup>b</sup>		9056(45.89)		24426(66.83)	

<sup>a</sup> Percentage of pruning energy in total output energy. <sup>b</sup> Percentage of olive fruit energy in total output energy.

The highest share of energy output found for olive production with 66.83% compared with pruning energy with 33.17% in intensive-flat orchards (Table 2). However, it was obtained higher output energy from pruning residues than olive in conventional-flat (54.11%) and slope (91.52%) orchards. It was found that lower energy input in the traditional-flat and sloping orchards, due to the lower olive yield compared with intensive-flat. The results showed that human labour with 91.94% has highest total energy input for traditional-sloping because of using worker in all olive practices. Chemical fertiliser inputs found the highest with 13.98%, including nitrogen phosphate and potassium and followed by diesel fuel (5.79%) in traditional-flat, in regardless of machinery (62.32%) and human labour (8.66%). Under intensive flat, the highest input found with machinery (71.78%) due to self-propelled harvester followed by diesel fuel (9.25%) and chemical fertiliser (8.98%). It has also been reported that the energy input of chemical fertilisers has the biggest share of the total energy input in agricultural production (Hemmati *et al.*, 2013) in regardless of machinery. Intensive-flat were irrigated by drip irrigation system which pumping water from source to orchard requires more electrical power, therefore amount of consumed electric energy was high in total energy by around 600 MJ/ha. Energy ratio determined as 1.46, 1.32 and 1.31 for intensive-flat, traditional-flat and traditional-sloping orchards, respectively (Table 3). It says that to produce the olive under intensive-flat increase crop productivity. In similar studies, energy ratio was lower by 1.16 for apple (Rafiee *et al.*, 2010), and by 1.24 for olive (Hemmati *et al.*, 2013) who reported that energy ratio was increased by increasing olive orchard size. In contrast, Hemmati *et al.*, (2013) concluded that energy ratio was higher for flat and sloping orchards by 1.60 and 1.47, respectively. Energy productivity was 0.93 kg/MJ for intensive-flat orchards followed by traditional-flat and sloping orchards by 0.90 and 0.69 kg/MJ, respectively. It has been reported that energy productivity has lowest values for olive under similar flat and sloping olive orchards with 0.14 and 0.12 kg/MJ, respectively (Hemmati *et al.*, 2013) while it was found 0.11 kg/MJ by Hemmati *et al.* (2013). Net energy is shown the value of produced or consumed energy in a production system and it has been produced higher in both traditional and intensive orchards on flat lands compared with traditional-sloping (Table 3). Higher net energy and energy ratio and energy productivity of intensive orchards indicate that excessive use of inputs to produce higher level of yield. Traditional-sloping and intensive-flat were almost similar in use of direct energy, but both systems increased direct energy compared with traditional-flat. Considering intensive-flat, the more number of trees per hectare cause to consume higher amount of energy inputs such as diesel fuel, water for irrigation and electricity. Indirect energy was the highest in intensive-flat due to the highest machinery and chemical fertiliser

inputs, while it was the lowest in traditional-sloping because there are no inputs such as chemical fertilizer or pesticides, etc. This type of energy was half of intensive-flat orchards in the traditional-flat because of lower chemical fertilizer, pesticides or machinery using compared with intensive-flat orchards. Thus the rate of renewable energy in traditional-sloping by 84.35% was more than traditional-flat by 15.69%, while it was the lowest rate was in the intensive-flat by 7.97% due to using more human labour in the traditional-sloping. Non-renewable energy was obtained with highest rate by 93.16% in intensive-flat due to using more machinery, and also fertiliser and pesticides. This rate was 77.08% in traditional-flat using similar inputs as in intensive-flat, while it was 7.59% in the traditional-sloping due to using only hand type harvester tools (Table 3).

**Table 3.** Energy patterns in olive production systems

Energy pattern	Traditional-sloping		Traditional-flat		Intensive-flat	
		%		%		%
Energy ratio	1.31		1.32		1.46	
Energy productivity (kg/MJ)	0.69		0.90		0.93	
Specific energy (MJ/kg)	1.46		1.11		1.07	
Net energy (MJ/ha)	2454		4838		14333	
Direct energy <sup>1</sup>	6977	86.73	2510	16.85	5709	18.36
Indirect energy <sup>2</sup>	403	5.01	11308	75.92	25739	82.77
Renewable energy <sup>3</sup>	6786	84.35	2337	15.69	2478	7.97
Non-renewable energy <sup>4</sup>	595	7.39	11481	77.08	28970	93.16
Total energy	8045		14894		31098	

<sup>1</sup>Include human labour, diesel fuel, water and electricity. <sup>2</sup>Include machinery, fertilisers, farmyard manure and pesticides. <sup>3</sup>Include human labour, farmyard manure and water for irrigation. <sup>4</sup> Include machinery, diesel fuel, chemical fertilisers, pesticides and electricity.

#### 4. CONCLUSION

Total energy input in olive production was the highest in the intensive-flat (31.09 GJ ha<sup>-1</sup>) followed by traditional-flat (13.22 GJ/ha), and traditional-sloping (7.38 GJ/ha). Output energy was 36.55, 19.73 and 10.50 GJ/ha for intensive-flat, traditional-flat traditional-sloping, respectively. Chemical fertiliser found as most energy consumer input for both intensive-flat and traditional-flat due to excessive use of fertilisers, except machinery inputs. The most of energy inputs was machinery in both traditional-flat and intensive-flat orchards. Energy ratio was 1.46, 1.32 and 1.31 and energy productivity was determined as 0.93, 0.90 and 0.69 for intensive-flat, traditional-flat and traditional-sloping orchards, respectively.

#### REFERENCES

- Bilandzija N, Voca N, Kricka T, Matin A, Jurisic V 2012. Energy potential of fruit tree pruned biomass in Croatia. Spanish J of Agricultural Res, 10:292-298.
- FAO, 2016. Food and Agriculture Organization. Available from: www.fao.org.
- Guzmán GI, Alonso AM 2008. A comparison of energy use in conventional and organic olive oil production in Spain. Agric. Syst, 98:167-176.
- Hadi SH 2006. Energy efficiency and ecological sustainability in conventional and integrated potato production system. In Proceeding of the IASTED Conference on Advanced Technology in the Environmental Field. Spain.
- Hemmati A, Tabatabaeefar A, Rajabipour A 2013. Comparison of energy flow and economic performance between flat land and sloping land olive orchards. Energy, 61:472-478.
- Kaltsas, AM, Mamolos AP, Tsatsarelis CA, Nanos GD, Kalburtji KL 2007. Energy budget in organic and conventional olive groves. Agriculture, Ecosystems & Environment, 122:243-251.
- Kitani O 1999. CIGR handbook of agricultural engineering in energy & biomass engineering. 5. 2950 Nile Road, St Joseph MI, USA: ASAE Publication.
- Mudahar MS, Hignett TP 1987. Energy requirements, technology and resources in fertilizer sector. Energy in Plant Nutrition and Pest Control. Energy in World Agriculture. 2, ed. Helsel, Z. R., pp. 25-61. Amsterdam: Elsevier.
- Pimentel D, Hurd LE, Belloti AC, Forster MJ, Oka IN, Sholes OD, Whitman RJ. 1973. Food production and the energy crisis. Science, 182:443-449.



Rafiee S, Mousavi SH, Mohammadi A 2010. Modelling and sensitivity analysis of energy inputs for apple production in Iran. *Energy*, 35:3301-3306.

Singh S, Mittal JP 1992. *Energy in production agriculture*. New Delhi, India: Mittal Publications. p. 14-18.

TUIK (2016, 2017). Turkish Statistical Institute. Available from: [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr).

Tombesi AM, Boco M, Pill M, Farinelli D 2002. Influence of canopy density on efficiency of trunk shaker olive mechanical harvesting. *Acta Hort*, 586:291-294.

DRAFT

## 2,4-dimetilpirol ile hazırlanan bodipy temelli floresans Hg (II) sensörü

Ersin Güler, Emine Bağcı, Ahmed Nuri Kursunlu\*  
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ankursunlu@hotmail.com

### Özet

Metal iyonlarının tespiti için floresans sensörlerin kullanımı, yüksek seçicilik ve kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle tıp başta olmak üzere birçok bilim dalının gözde çalışma konusudur. Yakın-IR bölgede emisyon yapabilen moleküller, biyolojik ve tıbbi açıdan, dokuya kolaylıkla nüfuz ettiği ve dokuya daha az hasar verdiği için sensör olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Bu yüzden floresan özellik gösterebilen ve yakın infrared bölgede (NIR) emisyon yapabilen bileşiklerin tasarımı ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu bileşikler arasında BODIPY (boron-dipyrromethene) boyar maddeleri, bilinen ve en geniş kullanım alanına sahip, yakın infrared (NIR) bölgede emisyon yapabilen bileşiklerden biridir. Floresans bir bileşiğin herhangi bir pozisyonuna uygun fonksiyonel gruplar bağlanırsa kullanışlı floresans sensörler elde edilebilir. Sensör operasyonunun fotofiziksel mekanizması bağlanan grupların her birinin yerleşimi aynı reseptör için farklı özellikler gösterebilir. Seçimliliği artırabilmek ve kendi içerisinde enerji transferi yapabilen moleküller için anten tipi floresans bileşikler geliştirilmiştir. BODIPY bileşikleri ışık ve kimyasallara karşı dayanıklı floresans maddelerdir. Görünür bölgedeki ışınları yoğun olarak absorplarlar. Buna ilave olarak Bodipy türevleri sahip olduğu yüksek kuantum verimi, yapısal kararlılık, duyarlılık gibi üstün fotofiziksel özellikleri sayesinde birçok alanda kullanılmıştır. Bu çalışmada, önce atom ve organik gruplar içeren Bodipy türevi hazırlanacaktır. Bu bileşiğin emilim, emisyon ve uyarma özelliklerinde meydana gelen değişiklikler daha sonra bazı metal iyonlarının varlığında incelenecektir. Böylece, bu ölçümlerde, metal iyonunun seçici olması için planlanan nihai Bodipy türevinin olduğu tespit edilmiştir. Meydana gelen bedensel bileşik, farklı metal iyonlarıyla test edildi. Fakat sadece cıva metal için bir seçicilik gösterdi. Bileşik Hg (II) iyon için bir floresan sensör kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bodipy, sensör, floresans

### Bodipy Based Fluorescence Hg (II) Sensor Prepared with 2,4-Dimethylpyrrole

#### Abstract

The use of fluorescence sensors for the detection of metal ions is the subject matter of many disciplines, especially medicine, because of its high selectivity and easy applicability. The molecules capable of emission in the near-IR region have widespread use as sensors because they can easily penetrate the tissue and cause less damage to the tissue, both biologically and medically. Therefore, there are many studies on the design of compounds that can exhibit fluorescent properties and can emit near-infrared (NIR) emissions. Among these compounds, BODIPY (boron-dipyrromethene) dyes are known and capable of emitting in the near-infrared (NIR) region, which is the most widely used area. Useful fluorescence sensors can be obtained if the functional groups suitable for any position of a fluorescence compound are attached. The location of each of the groups that bind to the photophysical mechanism of the sensor operation may show different characteristics for the same receptor. Antenna type fluorescence compounds have been developed for increasing the selectivity and the ability to transfer energy in itself. BODIPY compounds are light and chemical resistant fluorescent substances. They intensely absorb the rays in the visible region. In addition, Bodipy derivatives have been used in many fields due to their superior photophysical properties such as high quantum yield, structural stability and sensitivity.

In this study, the Bodipy derivative containing atomic and organic groups will be prepared. Changes in the absorption, emission and excitation properties of this compound will then be investigated in the presence of some metal ions. Thus, in these measurements, it was determined that the final Bodipy derivative was planned to be selective for the metal ion. The resulting bodily compound was tested with different metal ions. But only mercury showed a selectivity for metal. A fluorescent sensor may be used for the compound Hg (II) ion.

**Keywords:** Bodipy, sensor, fluorescent

## GİRİŞ

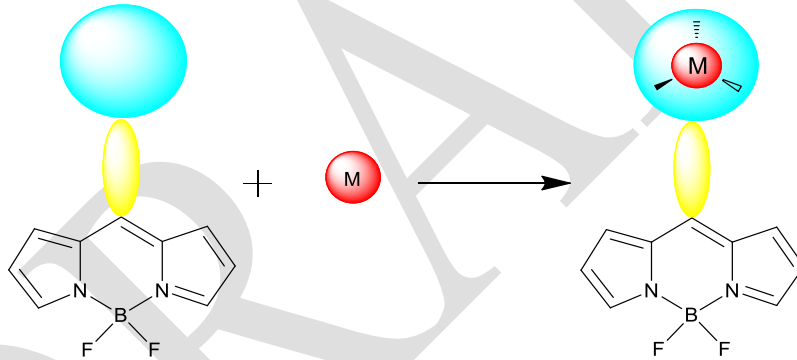
Son yıllarda dipirinlerin en önemli grubu olarak borondiflorodipirin (kısaca adıyla Bodipy) bileşikleri bilimektedir (Treibs ve ark., 1968). 1968'de Treibs ve Kreuzer öncülere boradiazaindacene florofor bileşiklerini sentezlemeyi başarmıştır. Sentetik yöntem, 2,4-dimetilpirolün bir elektrofilik süstitüsyonunun asetik anhidrit ile etkileştirilmesi ve BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O ile Lewis asidi olarak katalize edilmesiyle tarif edildi.

Bodipy'ye son yıllarda artan ilgi, diprometan-metal komplekslerine kıyasla daha yüksek kuantum verimi ve flüoresansa bağlanabilir. Bununla birlikte, Bodipy'nin yüksek stabilitesi bu tür reaksiyonlara olan ilgiyi arttırdı ve farklı türevler sentezlenmeye başladı. Bu stabilite eleklere delokalize edilir, bazen bor bazen nitrojen, bazen flor atomları ile sağlanır. Bu özellikler, lüminesans ajanı floresan uç kemosensör ve lazer boyaarı gibi birçok uygulamada Bodipy bileşiklerine potansiyel vermiştir.

Bodipy çekirdeği, çözücü ve pH'a bağlı olarak absorpsiyon ve emisyon değerlerinde önemli değişiklikler göstermemektedir. Ancak Bodipy çekirdeğine bağlanan süstitüe gruplar ile bu çekirdek arasında elektron aktarımı bulunması halinde, bu grubun fotofiziksel özelliklerinin değıştiği bilinmektedir. Bodipy çekirdeğine donör/akseptör özelliği bulunan fonksiyonel gruplar bağlanarak, asit-baz ve anyon/kasyon indikatörleri olarak kullanılmak üzere birçok Bodipy bileşigi sentezlenmiştir. Bodipy bileşikleri akıllı devre anahtarları, ışık toplama sistemleri, enerji transfer kasetleri, boyar madde ile duyarlaştırılmış güneş pilleri, polimerler, lazer boyaarı ve OLED uygulamalarında kullanılırlar.

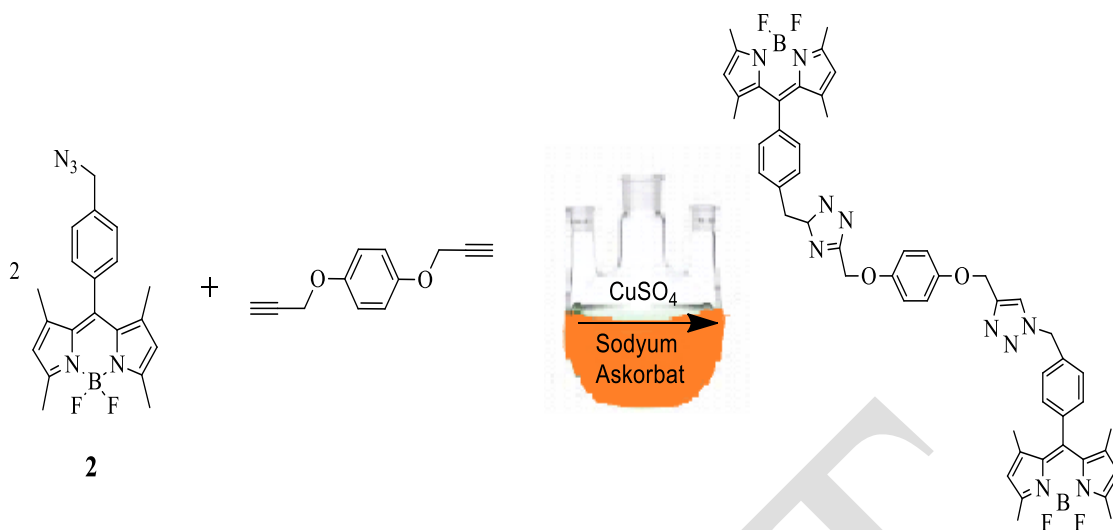
## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada ligand karakterli Bodipy türevi sentezlenmiş ve hazırlanan bu bileşigin NMR, IR, Kütle vb. cihazlarla karakterize edilmiştir. Belirlenen metal kasyonları varlığında hedeflenen Bodipy türevinin absorpsiyon, emisyon ve eksitasyon spektrumları alınmıştır. Veriler doğrultusunda hazırlanan Bodipy türevinin hangi metal kationuna seçici olduğu tespit edilmiştir.



Bu işlemler için gereken cihazların çoğu Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Spektroskopi Laboratuvarları ve İnorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'ndan alınmıştır.

**10-(4-((5-((4-((1-(4-(5,5-difloro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4l4,5l4-dipirol [1,2-c : 2' , 1'-f] [1,3,2] diazaborinin-10-il) benzil) -1 H-1,2,3-triazol-4-il) metoksi) fenoksi) metil) -3H-1, 2,4-triazol-3-il) metil) fenil) -5,5-difloro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4l4,5l4-dipirol [1,2-c: 2' , 1'f] [1,3,2] diazaborinin' in Sentezi**

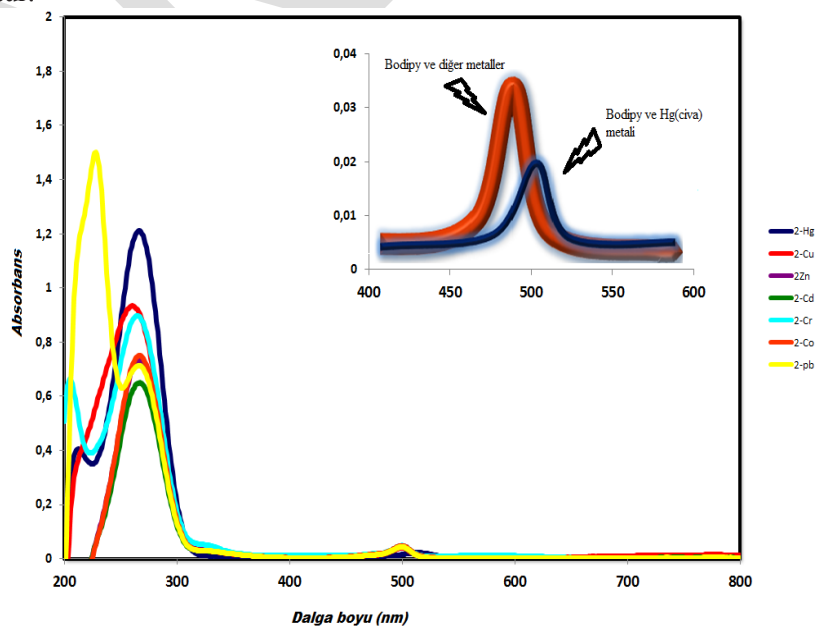


Etanol+su karışımı (45:10 mL) içinde 2 numaralı bileşik (170 mg) , 1,4 bis (propinil 1-oksi) benzen (85 mg) , CuSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (34 mg , 0,2 ekv.) , Na-askorbat (150 mg , 1,5 ekv.) manyetik karıştırıcı yardımıyla bir gece boyunca karıştırıldı. Kolon kromatografisiyle (petrol eteri-EtOAc; 4 : 1 oranında) saflaştırıldı ve turuncu bir katı halinde elde edildi.

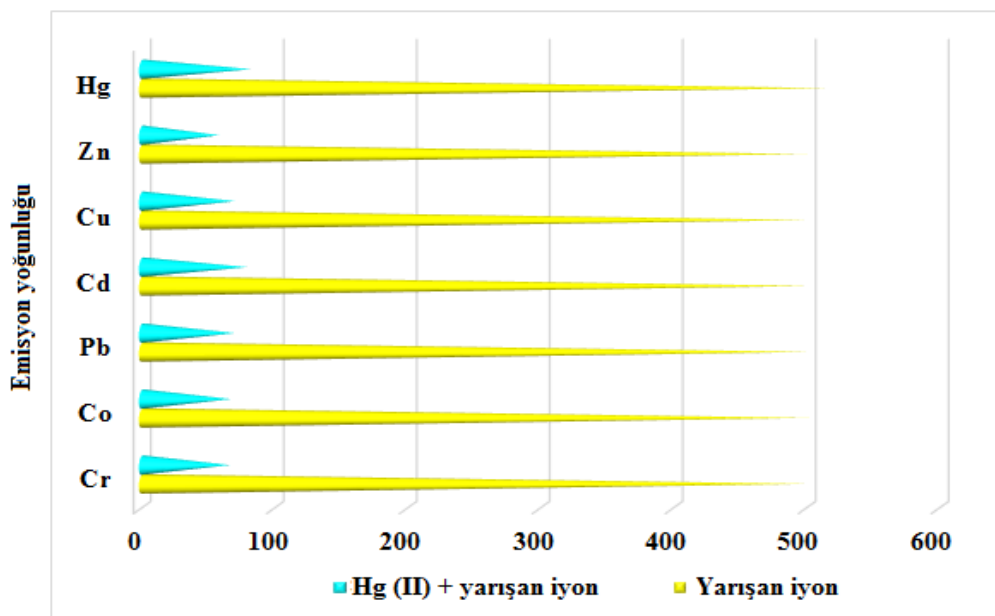
### Tablolar ve Şekiller

Bodipy bileşiği için yapılan absorpsiyon çalışmasında; metanolde, 1.10<sup>-6</sup> M konsantrasyonda ligand çözeltisi ve 1.10<sup>-5</sup> M konsantrasyonda metal tuz çözeltileri hazırlanmıştır. Bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılıp absorpsiyon, emisyon gibi spektroskopik uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Burada metal iyon kaynağı olarak belirlenmiş metal tuzları kullanılmıştır [Cr (III), Co (II), Cu (II), Zn (II), Hg (II), Pb (II), Cd (II)]. Metal tuzlarının ilavesinden sonra cıva (II) iyonu haricinde diğer metal iyonları Bodipy 'nin absorpsiyon spektrumunda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Fakat Bodipy çekirdeğinden cıvaya doğru bir yük transferi gözlemlenmiş ve Bodipy' nin Hg(II) hassasiyetini ortaya koymuştur.

Bodipy' nin Hg(II) iyonu diğer iyonlara karşı seçiciliğinin araştırılması amacıyla yarışan iyon deneyleri yapılmıştır. Sadece cıva iyonu seçiciliğini etkilemiştir. Genel olarak çalışılan diğer metal iyonları Bodipy 'nin Hg (II) seçiciliğini etkilememiştir. Buna göre, Bodipy 'nin Hg (II) sensörü olarak kullanılabileceğini net bir şekilde ortaya koymuştur.



Bodipy (1.10<sup>-6</sup> M) ve metal iyonları (1.10<sup>-5</sup> M) varlığında Bodipy 2 için absorpsiyon spektrumları



## SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ışın toplama özelliğine (anten) sahip farklı sentez metotları kullanılarak Bodipy türevi bileşik hazırlanmıştır. Bu Bodipy türevinin ise metal sensörü olabilme özellikleri spektroskopik metotlarla araştırılmıştır. Bu bağlamda öncelikle Bodipy çekirdeğini bulunduran temel Bodipy türevi elde edilmiştir. Daha sonra bu temel Bodipy türevi bileşik şelatlaşma etkisi gösterebilecek uygun organik gruplarla yeniden modifiye edilmiştir ve son ürün olarak Bodipy temelli ligand elde edilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan bu floresans bileşiğin Hg (II) sensörü olarak kullanılabilceği Sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma için maddi destek Selçuk Üniversitesi BAP tarafından sağlanmaktadır ve minnetle kabul edilmektedir.

## KAYNAKLAR

- A Treibs und F-H Kreuzer. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1968, 718(1): 208-223.
- G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman (2008) The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(7): 1184-1201.
- Kursunlu A. N., Guler E., 2014, The sensitivity and selectivity properties of a fluorescence sensor based on quinoline-Bodipy, *J. Luminescence*, 145, 608-614.
- Kursunlu, A.N.; Guler, E.; Ucan, H. I., Ross W. B.; 2012, A novel Bodipy-Dipyrrin fluorescent probe: Synthesis and recognition behaviour towards Fe (II) and Zn (II). *Dyes Pigments*, 94, 496-502.

## Naphthaldehyde-derived Schiff bases and Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Fe (II) and characterization of complexes

Aylin Çaliş, Ahmed Nuri Kurşunlu\*, Ersin Güler

Selçuk University, Science Faculty, Chemistry Department, Konya, Türkiye

\*Corresponding author e-mail: ankursunlu@hotmail.com

### Abstract

In this study, the chloro ethylamine hydrochloride salt was dissolved in ethylacetate. 2-Hydroxynaphthaldehyde was added thereto. Triethylamine was then added. Triethylamine hydrochloride salt precipitated. There was thus obtained (E)-1-(((2-chloroethyl)imino)methyl)naphthalen-2-ol Schiff base. The complexes of this obtained Schiff base with Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Fe (II) metals were prepared under suitable conditions.

In the preparation of the other ligand, the bromoethylamine hydrochloride salt was dissolved in ethylacetate and 2-hydroxynaphthaldehyde was added thereto. Triethylamine was then added. Triethylamine hydrochloride salt was precipitated to give the Schiff base (E)-1-(((2-bromoethyl)imino)methyl) naphthalen-2-ol. Further, complexes of this Schiff base with Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Fe (II) metals were obtained.

**Keywords:** Schiff base, metal, complex

### Naftilaldehitten türeyen Schiff bazlarının ve Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) ve Fe (II) komplekslerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonu

#### Özet

Bu çalışmada kloro etilamin hidroklorür tuzu, etilasetatta çözüldü. Üzerine 2-hidroksinaftaldehit ilave edildi. Daha sonra trietilamin ilave edildi. Trietilamin hidroklorür tuzu çöktü. Böylece (E)-1-(((2-kloroetil)imino)metil)naftalen-2-ol Schiff bazı elde edilmiş oldu. Daha sonra elde edilen bu Schiff bazının Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) ve Fe (II) metalleri ile kompleksleri uygun şartlarda hazırlandı.

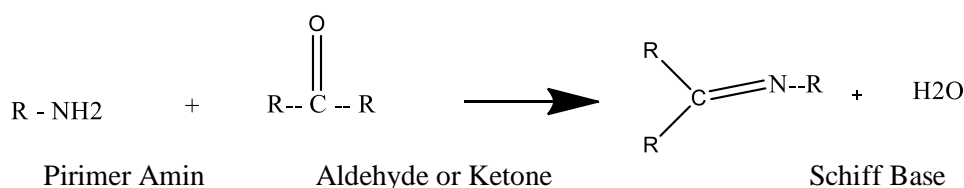
Diğer ligandın hazırlanmasında ise bromo etilamin hidroklorür tuzu, etilasetatta çözülerek üzerine 2-hidroksinaftaldehit ilave edildi. Daha sonra trietilamin ilave edildi. Trietilamin hidroklorür tuzu çöktürülerek (E)-1-(((2-bromoetil)imino)metil)naftalen-2-ol isimli Schiff bazı elde edilmiş oldu. Daha sonra bu Schiff bazının Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) ve Fe (II) metalleri ile kompleksleri elde edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Schiff Bazı, metal, kompleks

#### GİRİŞ

In general, Schiff bases are compounds obtained by reaction of primary amines with aldehydes. Schiff bases were first prepared by the German chemist Hugo Schiff in 1864. It was used as a ligand by Pfeiffer in 1930 because of its ability to form complexes.

Schiff's complexes are an important substance used in the production of certain medicines, in the electronics industry, in the plastics industry, in agriculture and in cosmetics. A Schiff base is obtained from the reaction of an aldehyde or ketone with amines. Here, the group C = O becomes C = N. This is indicated by the following reaction representation.



A primary amine may be aldehyde or ketone: R may be an alkyl or an aryl group. Aryl-containing Schiff bases are essentially more stable and easier to synthesize, while Alkyl-containing ones are relatively unstable. Schiff bases derived from aliphatic aldehydes are generally unstable and can readily polymerize. However, Schiff

bases with aromatic groups having an aldehyde of type 1,2 are more stable. The formation of a Schiff base from an aldehyde or ketones is carried out under reversible reaction and generally under acid or base catalysis or on heating. Schiff bases were first prepared by the German chemist Hugo Schiff in 1864. It was used as a ligand by Pfeiffer in 1930 because of its ability to form complexes.

In the last decade, there have been significant advances in the understanding of the chemistry of some metal complexes of Schiff derived from salicylaldehyde or the like (naphthylaldehyde) and  $\alpha$ -amino acids. Many of the design studies of such metal complexes have focused on the various types of binding of these ligands.

The complex structures of three-toothed Schiff base-based ligands were elucidated by X-ray crystal method. Binding of these complexes was achieved with carboxylate oxygen, imine nitrogen and phenolate oxygen. Metal complexes containing Schiff bases are the most basic chelating systems in coordination chemistry.

## MATERIALS VE METHODS

All chemicals used in our studies were obtained from Merck, Sigma-Aldrich and Fluka and all chemicals are analytical purities. All of the chemicals used in our studies are listed according to the places where they are used.

### Used Chemicals

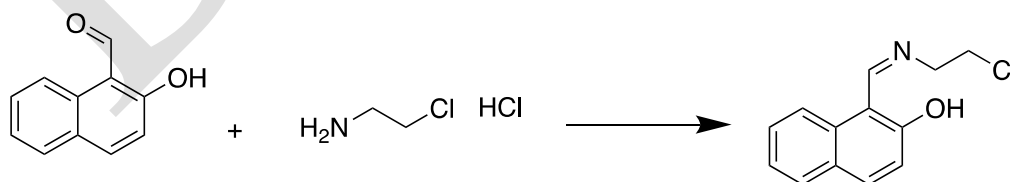
- Ethanol
- Methanol
- DMSO
- Chloroform
- 2-Hydroxynaphthaldehyde
- Chloroethylamine
- Bromoethylamine
- $M(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot n \cdot \text{H}_2\text{O}$

### Devices Used

- Many Magnetic Stirrer with Heater (Arex)
- Vacuum Oven (Core)
- Analytical Balance (0.0000 Accuracy) (Precisa)
- Ultra Pure Water Device (Millipo)
- pH-Meter (Orion ionmeter)
- Melting Point Determination Device: Gallenkamp brand device
- Magnetic Susceptibility

### Synthesis of Compounds

#### Synthesis of Compound 1



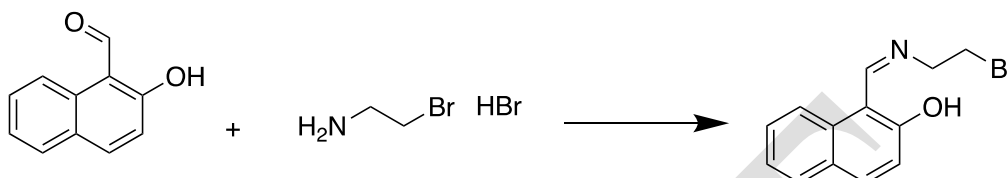
3.32 g (0.02 mol) of chloroethylamine hydrochloride salt was dissolved in 20 ml of ethylacetate. 1.7 ml of salicylaldehyde (0.02 mol,  $d = 1,166 \text{ g / ml}$ ) was added dropwise. It was then stirred for half an hour. 2.8 ml (0.02 mol,  $d = 0.728 \text{ g / ml}$ ) of triethylamine were then added slowly. The triethylamine hydrochloride salt precipitated in 10-15 min. After the precipitation was complete, it was filtered with the aid of filter paper. The solvent of the lower ethyl acetate phase was removed in the evaporator. The resulting bright yellow Schiff base crystals were dried in a vacuum oven. The crystals formed were dissolved in hot ethyl alcohol and recrystallized.

The resulting (E) -2 - [(2-chloroethylimino) methyl] phenol compound is soluble in hot ethyl alcohol, dimethylsulfoxide, chloroform, acetone.

Yield: 65,25 %

FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 1638 (C=N), 3461 (OH), 2869-2823 ( $\text{CH}_2$ ), 826 (Cl).

### Synthesis of Compound 2



5.52 g (0.02 mol) of 2-bromoethane-1-amine hydrobromide salt was dissolved in 20 ml of ethylacetate. 1.7 ml of salicylaldehyde (0.02 mol,  $d = 1,166 \text{ g / ml}$ ) was added dropwise. It was then stirred for half an hour. 2.8 ml (0.02 mol,  $d = 0.728 \text{ g / ml}$ ) of triethylamine were then added slowly. The triethylamine hydrobromide salt precipitated within 10-15 minutes. After the precipitation was complete, it was filtered with the aid of filter paper. The solvent of the lower ethyl acetate phase was removed in the evaporator. The resulting bright yellow Schiff base crystals were dried in a vacuum oven. The crystals formed were dissolved in hot ethyl alcohol and recrystallized.

The resulting (E) -2 - [(2-bromoethylimino) methyl]naphthylene compound is soluble in hot ethyl alcohol, dimethylsulfoxide, chloroform, acetone.

Yield: 75,25%

FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 1641 (C=N), 3378 (OH), 2888-2825 ( $\text{CH}_2$ ), 855 (Cl).

### RESULT AND DISCUSSION

In the first step of the study, two Schiff bases derived from naphthylaldehyde were obtained. First, the first Schiff base (E)-2-[(2-chloroethylimino)methyl]phenol compound was obtained from the reaction of naphthylaldehyde with chloroethylamine hydrochloride salt. The reaction of the -amine hydrobromide salt gave (E) -2 - [(2-bromoethylimino)methyl]naphthylene compound. The obtained Schiff bases were formed with Zn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II) and Fe (II) metals.

### THANKS

Author, Prof. for useful discussions. Dr. Ersin Güler. Financial support for this study was provided by Selçuk University BAP.

### REFERENCES

- Bagkesici, U., 2017, Amino Asitlerden Türetilen Bazı Schiff Bazlarının Sentezi Ve Metal Komplekslerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Desai, M. N., Desai, M. B., Shah, C. B. ve Desai, S. M., 1986, Schiff-Bases as Corrosion-Inhibitors for Mild-Steel in Hydrochloric-Acid Solutions, Corrosion Science, 26 (10), 827-837.
- Kocyigit, O. ve Guler, E., 2010, Synthesis of 1,3,5-tris(4-(4-nitrophenyliminomethyl)phenoxy)methyl benzene as a new Schiff base and its complexation properties with the (salen and salophen)-bridged Fe/Cr(III), Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 67 (3-4), 287-293.
- Kurşunlu, A. N., 2016, Bazı Klorlu Schiff Bazlarının Sentezi ve İmmobilizasyon Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kursunlu, A. N., Guler, E., Sevgi, F. ve Ozkalp, B., 2013, Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial studies of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) omplexes with Schiff bases derived from 5-bromo-salicylaldehyde, Journal of Molecular Structure, 1048, 476-481.



## Complex flow rheology analysis using magnetic resonance imaging (MRI)

Guler Bengusu Tezel<sup>1\*</sup>, Michael J. McCarthy<sup>2</sup>, Yusuf Uludag<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolu Abant Izzet Baysal University, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering Bolu, Turkey.

<sup>2</sup>University of California, Davis, Food and Technology Department, Davis, USA

<sup>3</sup>Middle East Technical University, Chemical Engineering Department, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: gulerbengusutezel@ibu.edu.tr

### Abstract

In this study, online and offline rheological measurements on complex fluid is presented in detail. Online measurements were performed with an MRI (Magnetic Resonance Imaging) at Food and Science Technology Department at University of California, Davis. Offline methods for rheological measurements such as cylindrical coquette, cone and plate geometries (conventional rheometries) generally used for the study of fluid motion in shear. However, obtained results from these types of geometries need to be verified with suitable online or inline methods. Especially, many industrial processes, such as extrusion, transfer processes involve established or developing flows in pipes or tubes. Therefore, online techniques based on the measurement of the velocity profile in a pipe flow using MRI, which is a non-invasive method, and simultaneously determining the pressure drop, are promising for use a product quality or rheology control tool during the fluid flow. In this study, the application of MRI rheometry on the measurement of complex fluid such as CMC (Carboxylmethyl cellulose, there is no linear relationship between stress and shear rate in simple shear flow, was described.

**Keywords:** MRI, complex flow, rheology

### INTRODUCTION

Magnetic resonance imaging (MRI) can be used as a viscometer, based on analysis of a measured velocity profile of fluid flowing in a tube coupled with a simultaneous measurement of the pressure drop driving the flow (McCarthy et al. 1992). This type of measurement is well suited for rheological characterization of non-Newtonian fluids. MRI is based on the interaction between nuclear magnetic moments and applied external magnetic fields. MRI can be used to measure composition, structure, molecular mobility, molecular diffusion, and bulk material motion. In an MRI experiment, a sample is placed in a magnetic field within a radio-frequency probe, energy is added in the radio-frequency range, and the response of the material to that energy is recorded in terms of its attenuation, frequency, and phase (Seymour et al. 1995).

MRI data can be made sensitive to a variety of variables including position, displacement, diffusion, velocity, density, relaxation times, or combinations of these. The MRI signal intensity,  $S$ , in the velocity-encoded images described in given by;

$$S(k_x, q_z; T) = \int [\rho(x) \exp(i2\pi k_x x) \int P(\Delta z, x; T) \exp(i2\pi q_z \Delta z) d\Delta z] dx \quad (1)$$

and is due to protons in the fluid, primarily from water. The expression for signal is composed of three components: a density component, a position component, and a displacement component. The variable  $k_x$  is the reciprocal space vector with units of 1/m and given by a product of the magnetogyric ratio ( $\gamma$ ), the phase encoding gradient duration, and the applied phase encoding gradient. The variable  $q_z$  is the reciprocal space vector of displacement with units of 1/m and is given by the product of  $\gamma$ , duration of the displacement encoding gradient, and the applied displacement gradient vector.

A two-dimensional Fourier transform with respect to  $q_z$  and  $k_x$  produces a map of  $P(\Delta z, x; T)\rho(x)$  with respect to displacement  $\Delta z$  and position  $x$ . The product  $P(\Delta z, x; T)\rho(x)$  is the conditional probability density that a nucleus at  $x$  will displace  $\Delta z$  within the pulse sequence time interval  $T$ , which is referred to as the flow time. The position-dependent density of spins attributed to each displacement is given by  $\rho(x)$ . The measurement of fluid velocity is accomplished through this displacement component ( $\Delta z$ ) by measuring the distance a volume of fluid has moved in a specific time ( $T$ ). When the motion is steady, the velocity is calculated from the ratio of the distance to the elapsed time. Details of the technique and applications are given by Callaghan (1999) and Huettel et al. (2004).

The MRI process viscometry requires that a well-defined flow field be established. To evaluate shear viscosity in tube (or capillary) flow, an incompressible fluid must undergo steady pressure-driven flow in the laminar regime. The conservation of linear momentum, which equates pressure forces to viscous forces, provides the relationship between the shear stress,  $\sigma$ , and radial position,  $r$ :

$$\sigma(r) = \frac{-\Delta P}{2L} r \quad (2)$$

where  $\Delta P$  is the pressure drop over the tube length  $L$ . In tomography-based methods, the shear rate is obtained at the same radial position using the velocity profile obtained from a flow image. The expression for the shear rate in tube flow is:

$$\gamma(r) = \frac{dv(r)}{dr} \quad (3)$$

where  $v$  is the axial velocity. Using Equations 2 and 3, the apparent viscosity  $\eta$  is determined by the ratio of shear stress to shear rate:

$$\eta(r) = \frac{\sigma(r)}{\gamma(r)} \quad (4)$$

## MATERIALS AND METHODS

The CMC, with nominal molecular weight of 250,000 g/mol was supplied from Sigma. Aqueous solutions of CMC were prepared by dissolving the appropriate amount of CMC powder in distilled water. The high CMC concentration solutions (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2% w/w.) were prepared by using water heated at 50 °C by gentle stirring with the sufficient time < 24 h.

## RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 1, flow image for an example of 0.5% CMC flow, can be seen with data processing window. The velocity profile is used to obtain shear rate distribution, while the pressure drop is used to calculate the shear stress distribution. By taking the ratio of these quantities at a radial position, local viscosity can be obtained within the shear rate range in the flow, zero at the center, and maximum at the wall, within minutes.

Figure 2 shows the flow curves of the CMC solutions at different concentrations. Instrument CVO rheometer (Bohlin Instruments) with a cone and plate rheometer (with a cone angle 4° and diameter 40 mm) at 22 °C was used for offline measurement. A steady state shear rate ramp from 0.085 to 10 s<sup>-1</sup> was performed in logarithmic mode with 10 points/decade. For MRI measurements at the different pump speed of flow loop and also measured using a conventional technique and the agreement between the results is satisfactory shown in Figure 2.

## CONCLUSION

MRI velocity measurements with a pressure drop measurements allows a relationship between shear rate and shear stress and yields a rheological parameters measurements. A rheological investigation of CMC flow of 0.5%, 1.0%, 1.5% was presented. Online and offline measurement results are good agreement with each other. MRI flow imaging is suitable for evaluations of rheological parameters of CMC solutions even in high concentration of 1.5 w/w CMC.

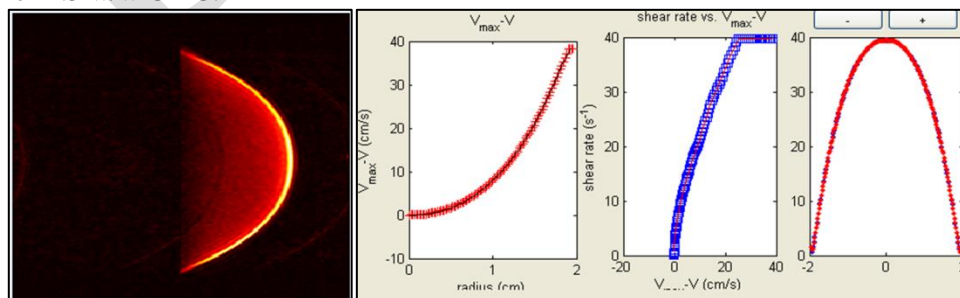


Figure 1. MRI Image for 0.5% CMC

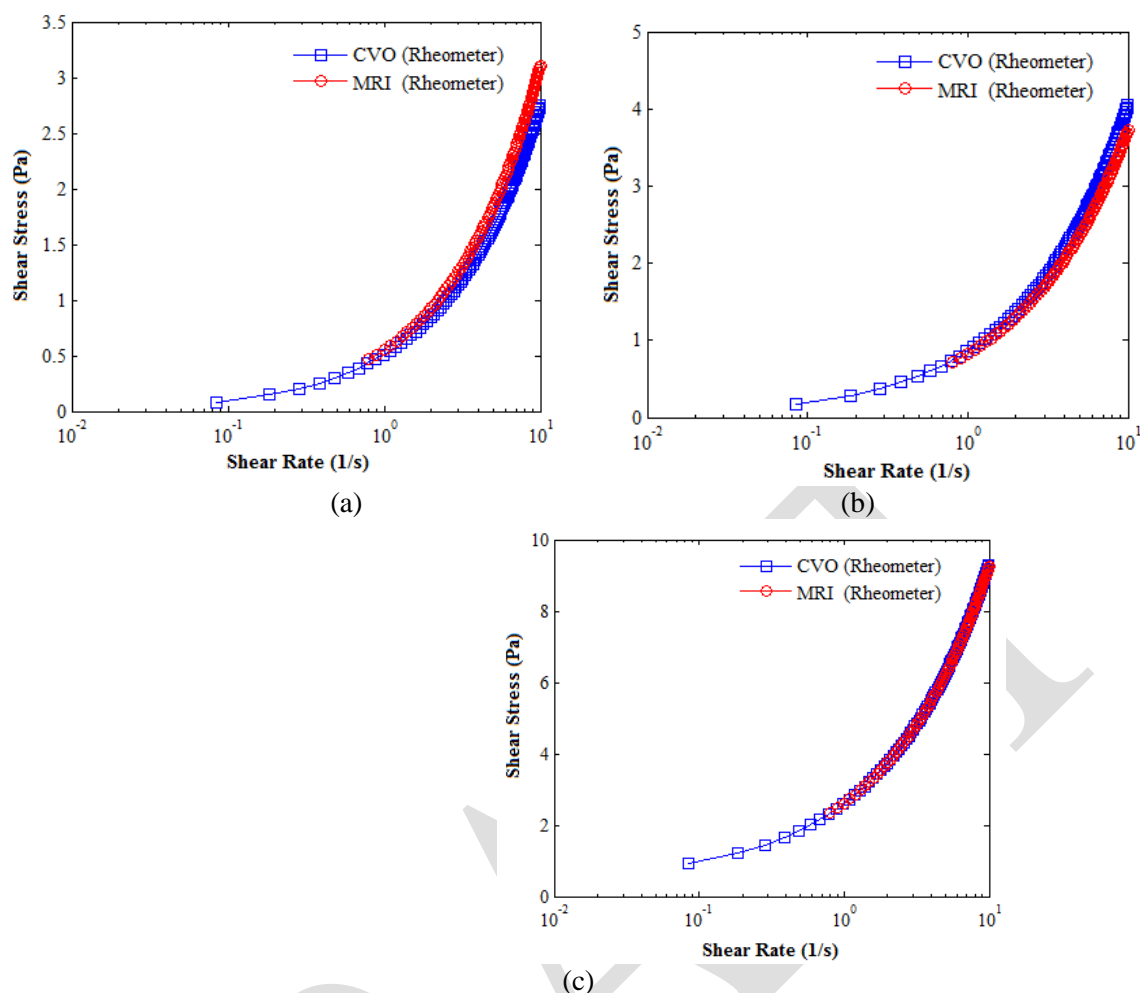


Figure 2. Shear stress v.s. Shear rate plot for (a) 0.5% CMC (b) 1.0% CMC (c) 1.5% CMC

## REFERENCES

- Callaghan, P. T. Rheo-NMR: nuclear magnetic resonance and the rheology of complex fluids. *Reports Prog. Phys.* 62, 599–670 (1999).
- Huettel, S. A., Song, A. W., McCarthy, G. *Functional magnetic resonance imaging. Magnetic Resonance Imaging* (2004).
- McCarthy, K. L., Kauten, R. J., McCarthy, M. J., Steffe, J. F. Flow profiles in a tube rheometer using magnetic resonance imaging. *J. Food Eng.* 16, 109–125 (1992).
- Seymour, J. D., Maneval, J. E., McCarthy, K. L., Powell, R. L., McCarthy, M. J. Rheological Characterization of Fluids Using Nmr Velocity Spectrum Measurements. *J. Texture Stud.* 26, 89–101 (1995).

## Using various assays to evaluate antioxidant activity of aqueous extracts of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) extracted by subcritical water extraction method

Erdal Yabalak\*, Firas Ibrahim

Mersin University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, TR-33343, Turkey

\*Corresponding author e-mail: yabalakerdal@gmail.com

### Abstract

The Subcritical Water Extraction (SWE) is an environment-friendly method and commonly used by researchers to investigate the extract of many matrices. Also, it was used to compare the content of the obtained extracts with the ones obtained in the other methods. In this study, SWE was used in evaluating the aqueous extracts of *Laurus nobilis* L. (Bay leaves). Bay leaves is a member of *Laurus* genus belonging to Lauraceae family. This species is widely found in the Mediterranean region and other regions in similar conditions. It is famous for its smell and leaves which takes place as a flavoring in Mediterranean cooking. The leaves used in the present work were obtained dried from local herb and spice shop. The leaves were ground to small particles for preparation of the extraction process. Then, their extracts were analyzed by different antioxidant activity assays to get a deeper view of its antioxidant role. Folin-Ciocalteu reagent was used to determine total phenolic content. It was found as 1148.74 mg of gallic acid (GA) equivalent in 100 g of dried leaves. DPPH assay was performed to determine the antioxidant activity of bay leaves. The IC<sub>50</sub> value of gallic acid was found as 0.02231 mg mL<sup>-1</sup>. The IC<sub>50</sub> value of subcritical water extract of bay leaves was found as 0.186 mg mL<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Antioxidant activity, bay leaves, DPPH, Folin-Ciocalteu, Subcritical Water Extraction.

### INTRODUCTION

With a long history, traditional medicine has been used by a human being in the maintenance of health and treatment of physical and mental illness. It is common almost all over the world (In some countries it is called complementary or alternative medicine) showing increased demand as a part of health services. Traditional medicine (represented by herbal medicines, traditional treatments, and traditional practitioners) is the main source of health care for many millions of people and sometimes is the only source. There was an increasing number of Member States of World Health Organization as the ones having traditional medicine policy, regulating herbal medicines and having national research institutes in this medicine (including those in herbal medicines) to show the increased importance given to it (WHO, 2013). Accordingly, the increased economic values of plants used in this medicine can be understood.

Lauraceae is a family of ever green trees or shrubs and most of them have great economic importance due to their uses in the construction timber, spice, essential oil, and medicinal plants. This family contains 2500-3000 species belonging to about 50 genera. Most of these species are woody plants (Davis, 1988; Filho Oliveira et al., 2015).

*Laurus nobilis* L. is a species of *Laurus* genus which belongs to Lauraceae family. *L. nobilis* is an aromatic ever green shrub or tree having leaves with a leather texture (coriaceous) (Davis, 1988). This species is known with different names such as “bay laural”, “defne”, “gar” and other local names (Kark et al., 2016). Even though *L. nobilis* is frequently used in essential oil and herbal researches, it still has less known properties in other fields to be researched for the better understanding of this plant (Nadeem et al., 2018). So, this study includes another attempt to draw attention to this plant’s undiscovered properties.

Subcritical water extraction (SWE), also known as superheated water extraction or pressurized hot water extraction, is one of the new extraction methods improved to reduce the use of organic solvents in extractions of plant materials. In this powerful method, temperatures between 100-374 °C and high enough pressure are applied to maintain the liquid state of water which get unique properties (such as high dielectric constant and high polarity) in this conditions (Haghighi and Khajenoori, 2013; Yabalak and Gizir, 2013).

Antioxidants founded in foods engage in preventing various disease and delaying the aging process. Therefore, the number of researches about antioxidants in foods has increased and so the number of methods measuring antioxidant capacity. For more accurate information about the antioxidant capacity of a material more than one measuring methods have to be applied. Widely reported and validated methods are preferable, such as total phenolic content analysis by Folin-Ciocalteu reagent, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical

scavenging capacity analysis and Cupric (II) Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) (Albayrak et al., 2010; Yabalak and Gizir, 2017).

In this study, bay leaves aqueous extract was obtained by SWE method. Its antioxidant capacity was analyzed using DPPH method and the total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu method.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Folin-Ciocalteu's phenol reagent and sea sand and Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid, GA), and DPPH were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 0.45  $\mu\text{L}$  syringe filter was supplied from Agilent (Wilmington, DE, USA). Millipore Milli-Q Advantage A10 was used to prepare ultra-pure water. The bay leaves used in the present work were obtained dried from local herb and spice shop.

### Instruments

Shimadzu UV-1601 spectrophotometer was used to determine antioxidant capacity. An experimental set-up (shown in the previous study) was used for SWE (Yabalak and Gizir, 2013). An empty cylindrical HPLC column was used as an extraction cell. Teledyne ISCO 260 D series syringe pump system (USA) was used to deliver water delivering and provide the required pressure.

### Sample Preparation

Dried bay leaves were ground to small particles (not powder) using spice and coffee grinder. Then it was packed in a closed bottle and kept in the dark.

### Extraction Method

The extraction process was performed using subcritical water extraction (SWE) method. Through SWE duration a temperature of 373-647 K and enough pressure were constantly applied to maintain water at a liquid phase. After 30 minutes of treatment, the extract was slowly collected for about 5 minutes at the same conditions. The process was triplicated for each experiment.

### Total Phenol Content Analysis Method

This analysis method was done according to a previous study (Yabalak and Gizir, 2017). Briefly, 1 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent was added to 1 mL concentrated extract solution in a test tube. The tube was slightly shaken and kept in a dark place for 5 minutes. After that, 2 mL of aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solution (50 g of solid  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dissolved in 250 mL of distilled water) and 2 mL of ultrapure water were added to the mixture. Next, the mixture was mixed well and again kept in a dark place for 30 min for completion of the reaction. Finally, the UV spectrophotometer was used to measure the blue color of the mixture at 700 nm. Same steps were applied to aqueous Gallic acid solutions (12,5-400 ppm) and the standard curve was obtained ( $r^2=0,995$ ) depending on the UV-Vis absorbance values. The results were given as milligram of Gallic acid equivalents (GAE)/100 g dry plant.

### DPPH Method

To measure the antioxidant activity of the bay leaves by DPPH analysis, used method was the one applied by Yabalak and Gizir (2017) as follow. Firstly, with a concentration of  $10^{-3}$  M DPPH stock solution was prepared and UV-Vis spectrophotometer was used to measure its absorbance at 515 nm. Aqueous extract solutions were prepared at gradually decreasing concentrations. Then, 2 mL of DPPH solution and 1 mL of these solutions were added into several test tubes and the obtained solutions were kept in dark for 15 min at room temperature. Finally, the absorbance of each one was measured at 515 nm using UV-Vis spectrophotometer. In the same way, the analysis was performed for aqueous solutions of Gallic acid (6,25-80 ppm) instead of extract and obtained values were used as references. Percentages of scavenging activity (I) was calculated using Eq. (1). Whereas, the absorbance of the samples and DPPH stock solution were  $A_s$  and  $A_0$ , respectively.

$$I = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} * 100 \quad (1)$$

DPPH scavenging activity results were expressed as inhibition capacity ( $\text{IC}_{50}$ ) whose value meets sweeping of 50% of the stock DPPH solution.

## RESULTS AND DISCUSSION

Some researches in literature showed that bay leaves had been extracted by different methods such as ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction (Franco-Vega et al., 2019; Muñiz-Márquez et al., 2013; Taban et al., 2018). In parallel to these, obtained extracts had been analyzed by different analysis methods. In some cases, same analysis methods were used but the applied steps were modified which could be the reason of results' difference (Ishtiaque et al., 2015; Simić et al., 2003; Vinha et al., 2015).

## Total Phenol Content Analysis

The extraction method and plant material affect the chemical composition of essential oils which deeply effect the antioxidant activity as stated in several reports (Franco-Vega et al., 2019). In determining food antioxidant capacity total phenolic content method is simple, repeatable and reliable. The total phenolic content of bay leaves' extract attained 1148,74 mg GAE/100 g on a dried weight basis. Ishtiaque et al reported the total phenolic content of bay leaves as 550 mg GAE/100 g (Ishtiaque et al., 2015). Yabalak et al. reported the total polyphenol content of *Allium kharputense* Freyn Et. Sint. as 257 gallic acid/100 g on the dried basis (Yabalak and Gizir, 2017). Considering these results, it can be said that the total phenolic content of bay leaves considerably high and can obtain higher value by using subcritical water extraction.

## Antioxidant Activity Analysis of DPPH Method

Due to its practicability, rapidity and susceptibility DPPH free radical scavenging analysis is increasingly desirable among researchers (Yabalak and Gizir, 2017). It was used to measure the radical scavenging capacity of aqueous extract from bay leaves. Obtained DPPH free radical scavenging activity percentages (inhibition rates) were given against concentration of extracts as shown in Figure 1.

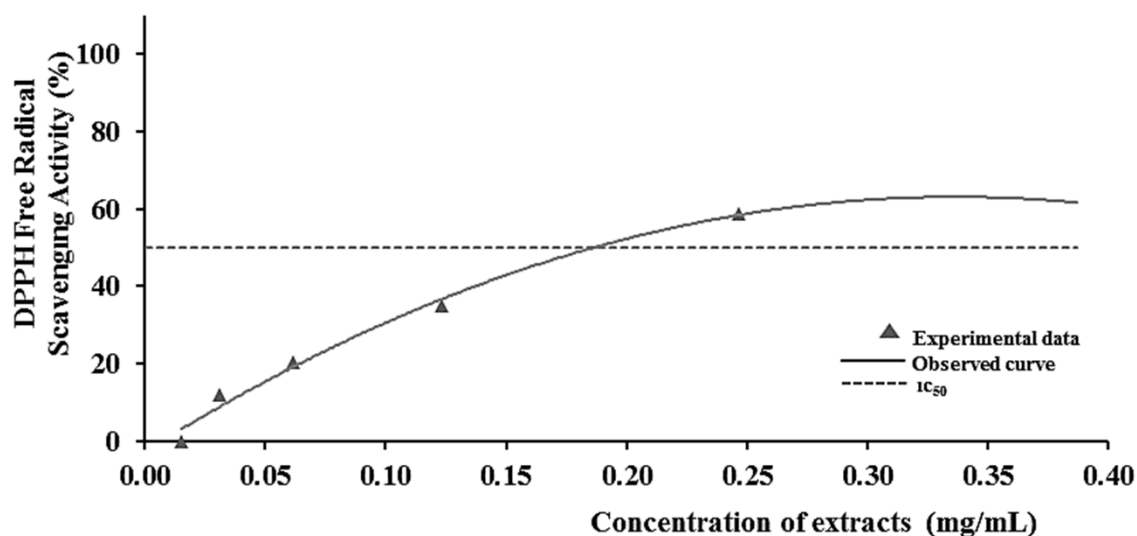


Figure 8. DPPH free radical scavenging activity rates of subcritical water extract of bay leaves.

IC<sub>50</sub> value, the concentration meets 50% scavenged of DPPH, was found as 0.186 mg/mL for the subcritical water extract from bay leaves. Ishtiaque et al reported IC<sub>50</sub> value of bay leaves extract was obtained as 0.15 mg/mL. Thus, DPPH free radical scavenging activity results of bay leaves obtained as close to the ones reported in literature which employed different extraction method.

## CONCLUSION

Subcritical water extraction of bay leaves showed a considerable increase in total phenolic content but the close value of DPPH scavenging activity compared to results reported in literature. The obtained high value in the presented work can be attributed to the performance of subcritical water in the extraction process.

## REFERENCES

- Albayrak S, Sağdıç O, Aksoy A 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4): 401–409.
- Davis P (Ed.), 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, volume 7. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Filho Oliveira AA, Fernandes HMB, Assis TJCF 2015. Lauraceae's Family: A Brief Review of Cardiovascular Effects. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 7(1): 22–26.
- Franco-Vega A, Ramírez-Corona N, López-Malo A, Palou E 2019. Studying microwave assisted extraction of *Laurus nobilis* essential oil: Static and dynamic modeling. Journal of Food Engineering, 247: 1–8.
- Haghighi A, Khajenoori M 2013. Subcritical Water Extraction. In: Nakajima H (Ed.), Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling. InTech.

- Ishtiaque S, Naz S, Soomro N, Khan K, Siddiqui R 2015. Antioxidant Activity and Total Phenolics Content of Extracts from *Murraya Koenigii* (Curry Leaves), *Laurus Nobilis* (Bay Leaves), and *Camellia Sinensis* (Tea). *Quaid-E-Awam University Research Journal of Engineering, Science & Technology*, 14: 20–25.
- Karık Ü, Çiçek F, Oğur E, Tutar M, Ayas F 2016. Türkiye’de Yayılış Gösteren Defne (*Laurus nobilis* L.) Populasyonlarının Meyve Özellikleri. *Anadolu Journal of AARI*, 26(1): 1–16.
- Muñiz-Márquez DB, Martínez-Ávila GC, Wong-Paz JE, Belmares-Cerda R, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN 2013. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20: 1149–1154.
- Nadeem MA, Aasim M, Kırıcı S, Karık Ü, Nawaz MA, Yılmaz A, Maral H, Khawar KM, Baloch FS 2018. Laurel (*Laurus nobilis* L.): A Less-Known Medicinal Plant to the World with Diffusion, Genomics, Phenomics, and Metabolomics for Genetic Improvement. In: Kumar N (Ed.), *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*. Singapore: Springer Singapore pp. 631–653.
- Simić M, Kundaković T, Kovačević N 2003. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia* 74: 613–616.
- Taban A, Saharkhiz MJ, Niakousari M 2018. Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) essential oil and its chemical composition, antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9: 12–18.
- Vinha AF, Guido LF, Costa ASG, Alves RC, Oliveira MBPP 2015. Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different *Laurus* sp. *Food & Function*, 6: 1944–1949.
- WHO, 2013. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. Geneva: World Health Organization. Available at: [https://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm\\_strategy14\\_23/en/](https://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/) [06.05.19]
- Yabalak E, Gizir A 2017. Evaluation of Total Polyphenol Content, Antioxidant Activity and Chemical Composition of Methanolic Extract from *Allium Kharputense* Freyn et. Sint. and Determination of Mineral and Trace Elements. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, 4(3): 691–691.
- Yabalak, E., Gizir, M., 2013. Subcritical and supercritical fluid extraction of heavy metals from sand and sewage sludge. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(7): 1013–1022.

## Fenton ve foto-Fenton yöntemleri ile tekstil endüstrisi atıksularından KOİ ve renk gideriminin incelenmesi

Hande Karaca\*, Nevzat Beyazıt

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Samsun, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: handekrc03@gmail.com

### Özet

Tekstil endüstrisi atıksuları boyama ve yıkama prosesleri sonucu açığa çıkan yüksek renk ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerine sahip atıksulardır. Tekstil endüstrisi atıksularındaki boyar maddeler, kanserojenik ve toksik yan ürünler ürettiklerinden büyük ölçüde çevre kirliliğine neden olabilirler. Bu tür atıksuların arıtılması için ileri oksidasyon proseslerinin etkinliği literatürde yer almaktadır. Bu çalışmada, tekstil boyar maddeler ile boyama yapılan bir tesise ait atıksudan KOİ ve renk kirlenici parametrelerinin Fenton ve foto-Fenton yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak giderimi incelenmiştir. Deney koşulları olarak pH, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) derişimi, demir (Fe<sup>+2</sup>) derişimi ve reaksiyon süresinin farklı değerleri seçilmiş olup bu parametrelerin giderim verimleri üzerine olan etkileri tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fenton, foto-Fenton, KOİ ve renk giderimi, tekstil endüstrisi atıksuyu, UV

### Investigation of COD and color removal from textile industry wastewaters by fenton and photo-fenton methods

#### Abstract

Textile industry wastewater has high color and chemical oxygen demand (COD) value as a result of dyeing and washing processes. Dyestuffs in textile industry wastewater can produce carcinogenic and toxic by-products, which can cause considerable environmental pollution. The effectiveness of advanced oxidation processes for the treatment of such wastewater has been reported in the literature. In this study, the removal of COD and color pollutant parameters from a wastewater, in which textile dyestuffs have been used, was investigated comparatively with Fenton and photo-Fenton methods. Different values of pH, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration, iron (Fe<sup>+2</sup>) concentration and reaction time were selected as experimental conditions, and the effects of these parameters on the removal efficiencies were discussed.

**Keywords:** Fenton, photo-Fenton, COD and color removal, textile industry wastewater, UV

### 1.GİRİŞ

Endüstrinin hızla gelişmesi ve kentleşme sonucu temiz su ihtiyacı ve çevre kirliliği gibi sorunlar ortaya çıkmaya başlamıştır. Yeryüzündeki suyun kirlenmesi, işlenmemiş ve/veya kısmen işlenmiş endüstriyel atıksuyun kontrolsüz bir şekilde boşaltılmasından kaynaklanmaktadır (Pouran vd., 2015). Atıksu arıtımında biyolojik arıtım, fiziksel ve fiziko-kimyasal arıtım gibi klasik atıksu arıtım teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin atıksudaki özellikle parçalanması zor organik kirlenicilerin giderilmesinde yetersiz kalabildiği durumlar olabilmektedir (Bethi vd., 2016). Organik bileşikler, toprak ve sudaki mikrobiyolojik bozunmaya karşı çeşitli derecelerde dirençli kimyasallar olarak bilinirler (Pouran vd., 2015). Bu organik bileşikler, insan sağlığı üzerinde kanserojen ve toksik etki gösterebilirler (Babuponnusami ve Muthukumar, 2014). Bu sebeplerden dolayı atıksulardaki organik kirlenicilerin uzaklaştırılması büyük bir önem taşımaktadır. Atıksulardaki bozunması güç organik bileşikleri gidermek ileri oksidasyon prosesleri (AOP), son yıllarda tercih edilen alternatif arıtım yöntemlerinden biri haline gelmiştir. İleri oksidasyon prosesleri hidroksil radikallerinin üretimi nedeniyle çok yönlü teknolojiler olarak adlandırılırlar. Ayrıca organik kirlenicilerin bozunması sırasında daha az toksik ara ürün üretir ve klasik arıtma tekniklerine göre daha verimlidirler (Bethi vd., 2016). Bununla birlikte, hidroksil radikalleri ile organik bileşikler arasındaki reaksiyon süreleri biyolojik arıtma proseslerine göre daha düşüktür ve böylece kirlenicilerin uzaklaştırılması daha kısa sürede gerçekleştirilir. Tekstil endüstrisi, kumaş üretiminden elyaf üretimine kadar çok sayıda prosesi içermektedir. Tekstil imalatının artmasıyla birlikte tekstil endüstrisi atıksu miktarı da hızla artmaktadır. Tekstil endüstrisi atıksuları boyama ve yıkama prosesleri sonucu açığa çıkan yüksek renk ve KOİ değerine sahip atık sular olup çoğu toksik olarak kabul edilir (J.M. Aquino vd., (2014). Ayrıca, tekstil atıksularının klasik ve biyolojik atıksu arıtım yöntemleri kullanılarak arıtılması genellikle zordur ( H. Wu, S. Wang, 2012). Bu açıdan bakıldığında ileri oksidasyon proseslerinin değerlendirilmesi uygun gözükmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 FENTON PROSESİ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup>)

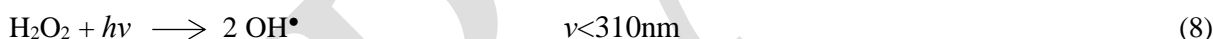
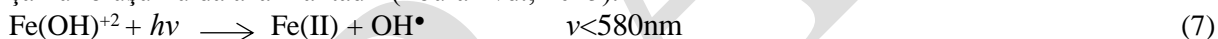
Fenton prosesi; asidik koşullar altında hidroksil radikalleri OH• oluşturan homojen bir katalitik oksidasyon işlemidir (Türel, 2008). Hidrojen peroksitin ayrışması için demir tuzları bir katalizör görevi görür ve hidroksil radikali üretirler (Rahmani, 2017). Fenton prosesi reaksiyon adımları aşağıdaki denklemlerde görülmektedir (Nikravan, 2015).



Fenton işlemi pH 2-5 aralığında etkilidir ve genellikle pH 2.8-3.0'de en etkili verimlere ulaşılmaktadır (Pignatello 1992). Çok düşük pH değerlerinde, oluşan [Fe(H<sub>2</sub>O)]<sup>+2</sup>, hidrojen peroksit ile daha yavaş reaksiyona girerek daha az OH• oluşturur ve düşük pH değerleri, Fe<sup>+3</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> arasındaki reaksiyonu engelleyebilmektedir (Deng ve Englehardt, 2006). pH 2'nin altında, Fenton reaksiyon hızında bir düşüş meydana getiren Fe<sup>+2</sup> ile daha az reaktif olan peroksiyum iyonu (H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) ve kompleks demir türlerinin oluşumu vardır. pH 4 ten yüksek değerlerde ise ferrik hidroksitin (Fe(OH)<sub>3</sub>) çökmesi meydana gelir (Zhou vd., 2018; Baiju vd., 2018). pH 4'ün üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oksidasyon reaksiyonlarına herhangi bir katkı yapmadan farklı bir şekilde ayrışır. Alkali koşullar altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herhangi bir hidroksil radikali üretmez (Umar vd., 2010). Sonuç olarak Fenton prosesleri; oksidan olarak hidroksil radikallerinin üretimi ve atıksudaki organik kirleticilerin oksidanlarla olan reaksiyonlarından oluşur (Oturun ve Aaron, 2014). Bu ileri oksidasyon prosesinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oksidan olarak kullanılması, nispeten ucuz, bol ve suda çözünür olması avantajına sahiptir.

### 2.2 FOTO-FENTON PROSESİ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup>/UV)

Fenton'un UV ışığıyla (180–400 nm) tepkimesi, yani genel olarak adlandırılan foto-Fenton işlemi, daha fazla OH• üreterek tepkimeyi artırır. Bununla birlikte, toplam demir kullanımı azaldığından reaksiyon sonunda çamur oluşumu da azalmaktadır (Pouran vd., 2015).



Fenton reaksiyonunda (karanlıkta) Fe<sup>+2</sup> nin Fe<sup>+3</sup> e tam dönüşmesinden sonra radikal üretimi yavaşlar. UV varlığında ise, Fe<sup>+3</sup> fotolitik olarak kullanılarak yeniden Fe<sup>+2</sup> iyonlarını oluşturarak ortamda daha fazla radikal oluşturmak mümkündür.



Homojen ileri oksidasyon prosesleri;

- ✓ Ortam basıncı ve sıcaklığında çalıştırma,
- ✓ Demir tuzu ve hidrojen peroksitin ucuz kimyasallar olması,
- ✓ Kütle transferi kısıtlamaları bulunmaması,
- ✓ Geniş bir organik bileşik yelpazesinde ayrışma sağlanması,
- ✓ Toksik olmaması,

gibi önemli avantajlara sahiptir (Nikravan, 2015; Rahmani, 2017).

Bu çalışmada, tekstil boyar maddeler ile boyama yapılan bir tesise ait atık sudan kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ve renk kirletici parametrelerinin Fenton ve foto-Fenton yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak giderim çalışmaları yapılmıştır. Deney koşulları olarak pH, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) derişimi, demir (Fe<sup>+2</sup>) iyonu derişimi ve reaksiyon süresi belirlenmiş olup, bu parametrelerin etkileri incelenmiştir. Arıtılan organiklerin (KOİ) kg maliyeti hesaplanmıştır.

## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1 ATIK SU VE ÖZELLİKLERİ

Deneyleerde kullanılan tekstil endüstrisi atık suyu, Ordu'nun Fatsa ilçesinin organize sanayi bölgesinde kumaş ve tekstil ürünlerine baskı yapılması hizmetleri (giyim eşyası dahil) konularında faaliyet gösteren bir işletmenin boyama işlemi çıkış suyundan temin edilmiştir.

**Çizelge 3.1** Kullanılan atık suyun özellikleri

PARAMETRE	BİRİM	DEĞER
pH	-	6-9
KOİ	(mg/L)	2000-4000
RENK	(Pt-Co)	1000-2000

### 3.2 KİMYASAL MADDELER

Demir(II) sülfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck) UV/ $\text{Fe}^{+2}$ , Fenton ve foto-Fenton proses deneylerinde kullanılmıştır.

Sodyum hidroksit (NaOH) (Chem Pure) ve sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Merck) numuların pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır.

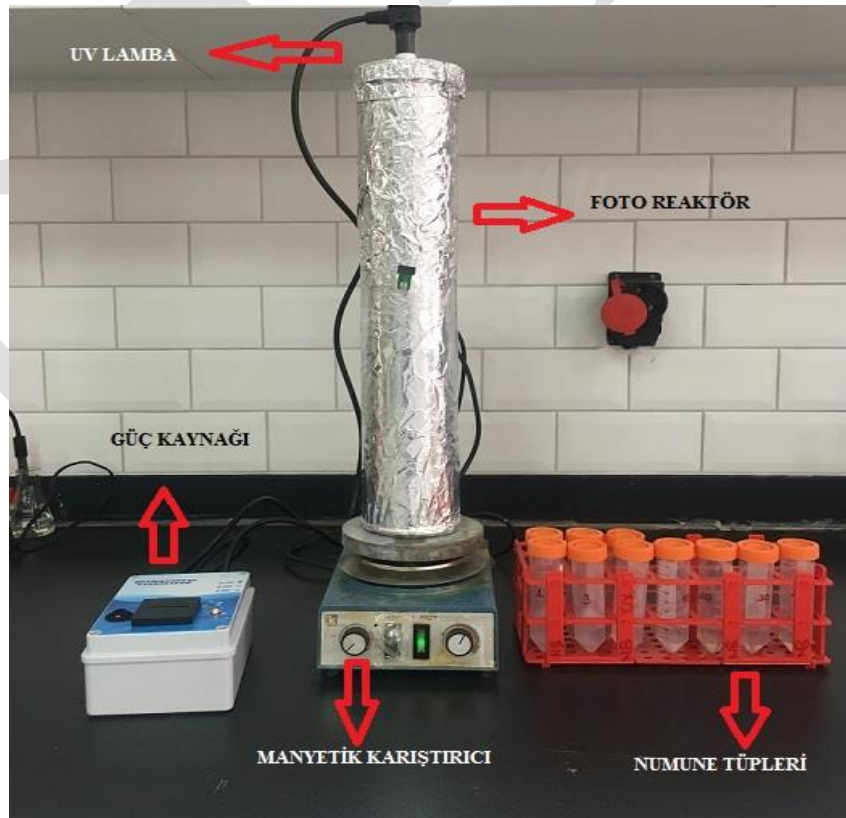
Ağırlıkça %35'lik hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Merck) UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , Fenton ve foto-Fenton oksidasyon proseslerinde kullanılmıştır.

### 3.3 CİHAZLAR

**Çizelge 3.2** Kullanılan cihazlar ve markaları

CİHAZ	MARKA
Santrifüj	Sigma 3 - 16P
pH Metre	HANNA HI 83141
Manyetik Karıştırıcı	İKAMAG RCT
Hassas Terazî	Radwag AS 220.R2
Termoreaktör	Spectroquant TR 4220
Spektrofotometre	Spectroquant NOVA 60A

Bütün deneyler, fotoreaktör cihazında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Fotoreaktör, 7.7 cm iç çapı, 9.02 cm dış çapında ve 48.5 cm yüksekliğinde pleksiglas malzemeden üretilmiş olup 1 adet 16 W şiddetinde UV-C (254nm) düşük-basınçlı civa buhar lambası iç kısımda monte edilmiş durumdadır.



**Şekil 3.1** Deneyel Düzenek

### 3.4 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmaların her aşamasında 2.1 L atıksu reaktöre doldurulmuştur. İlk olarak atıksu numunesi 2 adet filtre kağıdından süzöldükten sonra pH değeri 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi kullanılarak istenilen değere ayarlanmıştır.

#### 3.4.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup> Prosesi

pH'ı ayarlanan numuneye istenen derişimde FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi eklenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ilavesiyle Fenton reaksiyonu başlatılmıştır.

#### 3.4.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup>/UV Prosesi

pH'ı ayarlanan numune fotoreaktör cihazına alınarak istenen derişimde FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltisi daha sonra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilip UV lambası çalıştırılmıştır. Her iki proses deneylerinde numuneler, belirlenen zaman aralıklarında santrifüj tüplerine alınmış, eşzamanlı olarak pH değerleri kaydedilmiştir. Reaksiyon sonlandıktan sonra numuneler 5000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek KOİ ve renk ölçümleri yapılmıştır.

### 3.5 ANALİZ YÖNTEMİ

#### 3.5.1 KOİ Analizi

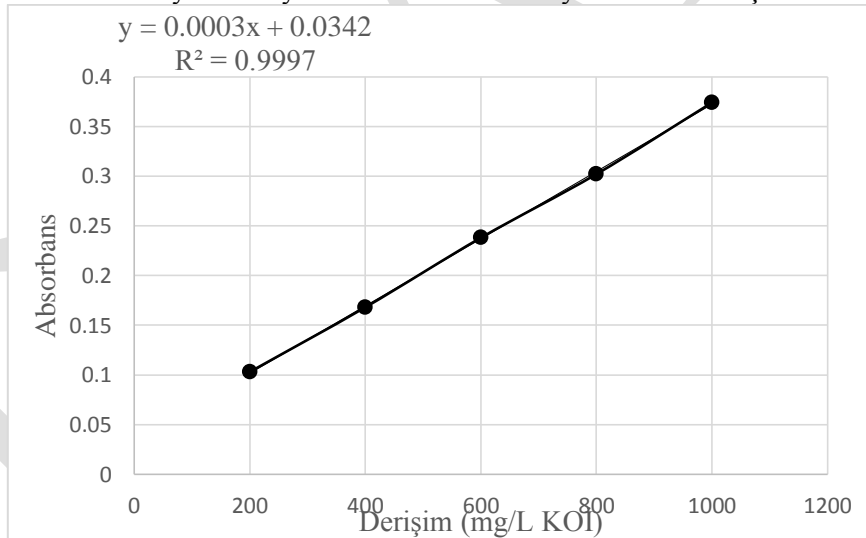
KOİ analizinde, spektrofotometre cihazına uygun Hach Lange LCK 514 marka 13 mm çaplı KOİ test tüpleri kullanılmıştır. Tüplerin içine 1,5 ml potasyum dikromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 3,5 sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ve 2,5 numune konularak Hach Lange LT 200 marka termoreaktörde 148°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede ölçümleri yapılarak KOİ giderim verimi hesaplanmıştır.

KOİ giderim verimi;

$$KOİ \text{ Giderim Verimi (\%)} = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100 \quad (10)$$

denklemini (10) kullanılarak hesaplanmıştır.

KOİ'si bilinmeyen numunenin KOİ değerini bulabilmek için, Potasyum Hidrojen Ftalat (KHP) (HOOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOK) Stok KOİ Çözeltisinin 0, 100, 200, 400, 800, 1000 mg/L'lik derişimlerine karşılık absorbans değerlerinden yararlanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen eğri yardımıyla  $y = 0,0003x + 0,0342$  denkleminde yerine koyularak KOİ konsantrasyonu belirlenmiştir.



Şekil 3.2 Kalibrasyon grafiği

#### 3.5.2 Renk Analizi

Renk analiz sonuçları Pt-Co birimi ile, 340 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Renk giderim verimi denklemin (11) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Renk Giderim Verimi (\%)} = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100 \quad (11)$$

### 4. MALİYET HESABI

Maliyet hesapları Fenton prosesi için optimum koşullardaki sonuçlara göre (pH:2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 60 mM, Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu: 2 mM ve reaksiyon süresi 2 saat, foto-Fenton prosesi için optimum koşullar pH:2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 50 mM, Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu: 3 mM ve reaksiyon süresi 2 saat) hesaplanmıştır. Nisan ayı Dolar kuru, 1\$=5,9 TL olarak alınmıştır.

Fenton prosesi için;

1L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı 160 TL'dir. Harcanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 60 mM = 2040 mg/L = 5,16 mL/L = 10,83 mL/2.1L

Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının fiyatı;

10,83 mL hidrojen peroksitin fiyatı 1,73 TL'dir.

1,73 TL/2.1L x 1000L/1m<sup>3</sup> = 823,81 TL/m<sup>3</sup> = 139,6 \$/m<sup>3</sup>

1 kg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O miktarı 130 TL'dir. Harcanan Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu 2 mM = 112 mg/L = 560 mg/L  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 1176 mg/2.1L

Kullanılan FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O miktarının fiyatı;

1176 mg demir sülfat heptahidratın fiyatı 0,153 TL'dir.

0,153 TL/2.1L x 1000L/1m<sup>3</sup> = 72,86 TL/m<sup>3</sup> = 12,35 \$/m<sup>3</sup>

Foto-Fenton prosesi için;

1L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı 160 TL'dir. Harcanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu 50 mM = 1700 mg/L = 4,3 mL/L = 9,03 mL/2.1L

Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının fiyatı;

9,03 mL hidrojen peroksitin fiyatı 1,44 TL'dir.

1,44 TL/2.1L x 1000L/1m<sup>3</sup> = 685,71 TL/m<sup>3</sup> = 116,2 \$/m<sup>3</sup>

1 kg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O miktarı 130 TL'dir. Harcanan Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu 3 mM = 168 mg/L = 840 mg/L  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O = 1764 mg/2.1L

Kullanılan FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O miktarının fiyatı;

1764 mg demir sülfat heptahidratın fiyatı 0,229 TL'dir.

0,229 TL/2.1L x 1000L/1m<sup>3</sup> = 109,05 TL/m<sup>3</sup> = 18,48 \$/m<sup>3</sup>

Elektrik sarfiyatı optimum koşullarda 80.10<sup>-3</sup> kWh olarak hesaplanmış birim elektrik fiyatı Enerji Piyasası Düzenleme Kurulu tarafından 2019 yılı nisan ayı tek terimli mesken aboneleri için görevli tedarik şirketi kullanıcılar için 0,434451 TL/kWh olarak belirlenmiştir (Enerjiportalı, 2019) .

80.10<sup>-3</sup> kWh x 0,434451 TL/kWh = 0,0347 TL = 0,0059 \$ (foto-Fenton prosesi için)

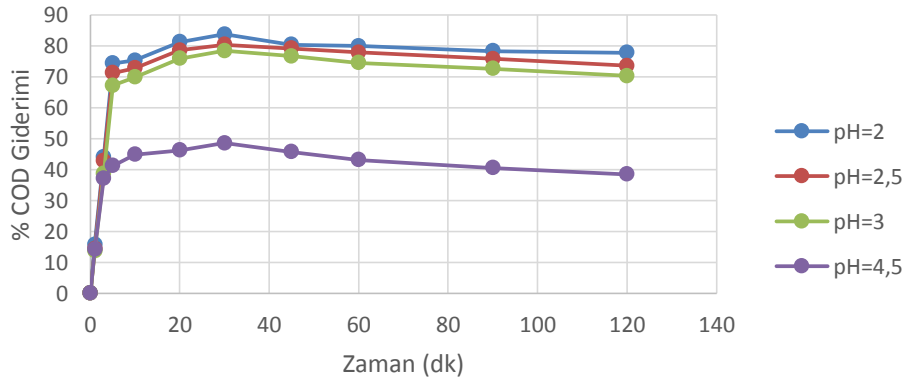
Toplam maliyet Fenton prosesi için 151,95 \$ ve 1 kg KOİ için 48,36 \$, foto-Fenton prosesi için 134,69 \$ ve 1 kg KOİ için 42,94 \$ olarak hesaplanmıştır.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

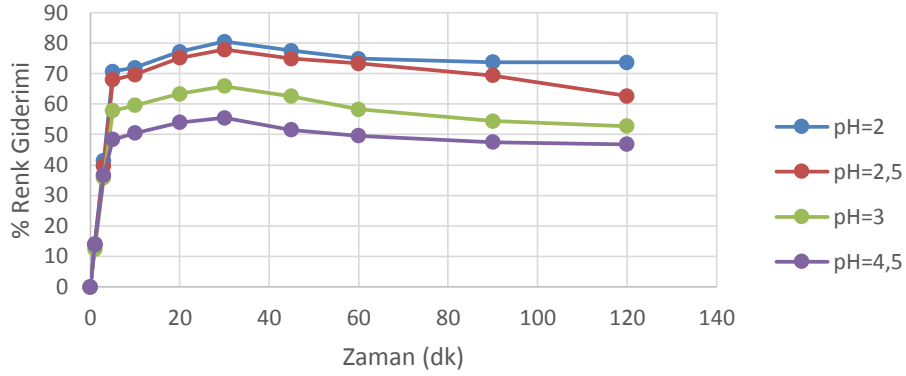
### 5.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup> PROSESİ

#### - pH Etkisi

pH etkisi incelemelerinde istenilen pH aralığına getirmek için H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> veya NaOH kullanılmıştır. Hacimsel değişikliklerden kaçınmak için minimum miktarda asit ve baz eklemek için değişik derişimlerde asit ve baz seçilmiştir. pH; 2, 2,5, 3, 4,5 değerleri kullanılarak zamana karşı giderim verimi incelenmiş, elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.1 Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=60 mM, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

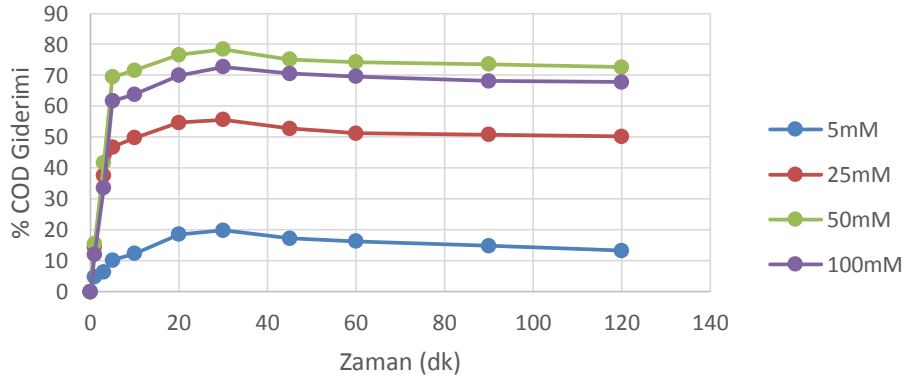


Şekil 5.2 Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi ( $H_2O_2=60$  mM,  $Fe^{+2}=2$  mM, reaksiyon süresi 2 saat)

Tekstil endüstrisi atıksuyu düşük pH değerinde  $FeOOH^{+2}$  oluşturmaktadır. Oluşan  $FeOOH^{+2}$ , hidrojen peroksit ile reaksiyona girmek için demir iyonları ile yarışır. Bu nedenle düşük pH değerinde daha az hidroksil radikali üretilir.  $pH > 4$  olduğu zaman  $Fe(II)$  daha kararsızdır ve kolayca  $Fe(III)$  iyonu oluşturur (Su vd., 2011). Elde edilen deneysel sonuçlara göre en iyi pH değeri 2 olarak bulunmuştur. pH 2 de, 30 dakika reaksiyon süresi sonunda maksimum % 83,74 KOİ ve % 80,44 renk giderim verimi elde edilmiştir. pH 4,5 da KOİ giderim veriminin oldukça düştüğü gözlemlenmiştir. Bu durumun nedeni ortamda hidrojen peroksitle tepkimeye girecek  $Fe^{+2}$  iyonlarının kalmamış olmasına bağlanabilir.

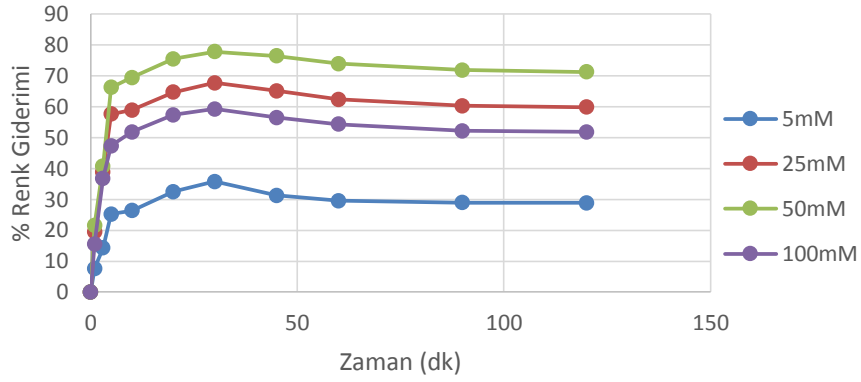
#### - $H_2O_2$ Derişimi Etkisi

Hidrojen peroksitin başlangıç derişimi arttıkça, oluşan  $OH^\bullet$  radikalleri de artmaktadır. Buna bağlı olarak renksizleştirme ve KOİ giderim hızı ciddi bir şekilde artmaktadır. Yapılan deneylerde belirlenen en uygun pH değerlerinde hidrojen peroksit derişimi 5-100 mM aralığında değiştirilmiştir. KOİ ve renk giderim sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 5.3 Atık suyun KOİ giderim veriminin  $H_2O_2$  derişimi ile değişimi ( $pH=2$ ,  $Fe^{+2}=2$  mM, reaksiyon süresi 2 saat)

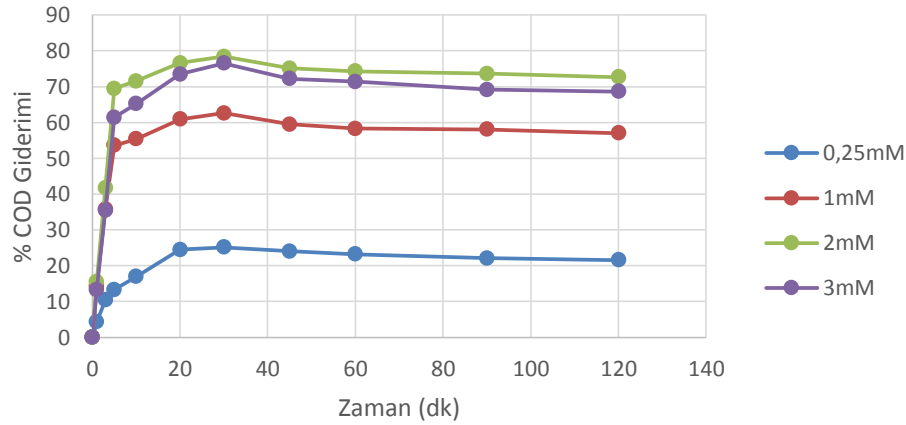
Hidrojen peroksit konsantrasyonunun artmasıyla genellikle kirleticilerin parçalanma hızı artmaktadır. Ancak, fazla miktarda hidrojen peroksit konsantrasyonu ortamdaki hidroksil radikalleriyle reaksiyona gireceğinden parçalanma hızını azaltır. Aynı zamanda fazla hidrojen peroksit konsantrasyonu KOİ'nin artmasına da neden olmaktadır (Kang ve Hwang, 2000). Belirli bir  $H_2O_2$  konsantrasyon aralığında yapılan deneylerde en yüksek verim 50 mM derişim değerinde, 30 dakika reaksiyon süresi içinde maksimum % 78,38 KOİ ile % 77,87 renk giderimine ulaşılmıştır. 5 mM gibi düşük hidrojen peroksit derişimi  $OH^\bullet$  radikallerinin daha az oluşmasına neden olduğundan oksidasyon etkinliğinin azalmasına sebep olmaktadır. Bundan dolayı Şekil 5.3 ve 5.4 de görüldüğü üzere 5 mM hidrojen peroksit derişiminde KOİ ve renk giderim verimi oldukça düşüktür.



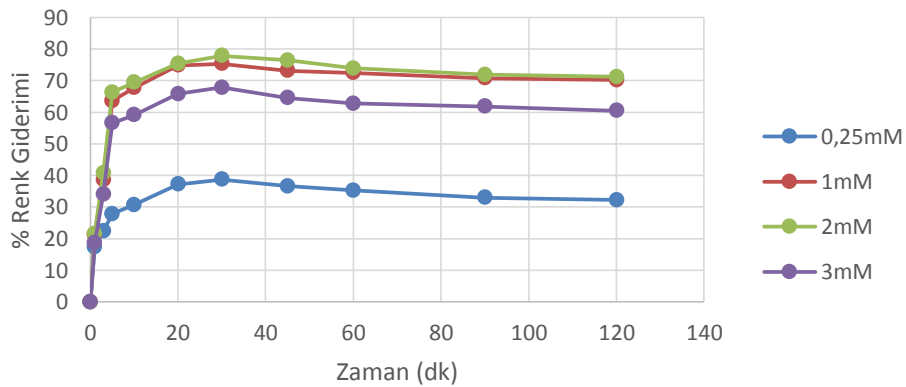
Şekil 5.4 Atık suyun renk giderim veriminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ile değişimi (pH=2, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

#### - Fe<sup>+2</sup> Derişimi Etkisi

Demir iyonu konsantrasyonunun artmasıyla parçalanma hızı artar. Ancak, belli konsantrasyonun üzerinde parçalanma hızı oldukça azdır. Ayrıca, fazla demirin kullanılmasından dolayı çıkışta askıdaki demir miktarı artmaktadır. Demir iyonu derişiminin renk ve KOİ üzerine etkisi ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.15-16'da verilmiştir. Daha önceki yapılan deneylerde belirlenen en uygun hidrojen peroksit derişimi ve pH değeri kullanılmıştır.



Şekil 5.5 Atık suyun KOİ giderim veriminin Fe<sup>+2</sup>derişimi ile değişimi (pH=2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 50 mM, reaksiyon süresi 2 saat)



Şekil 5.6 Atık suyun renk giderim veriminin Fe<sup>+2</sup>derişimi ile değişimi (pH=2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 50 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

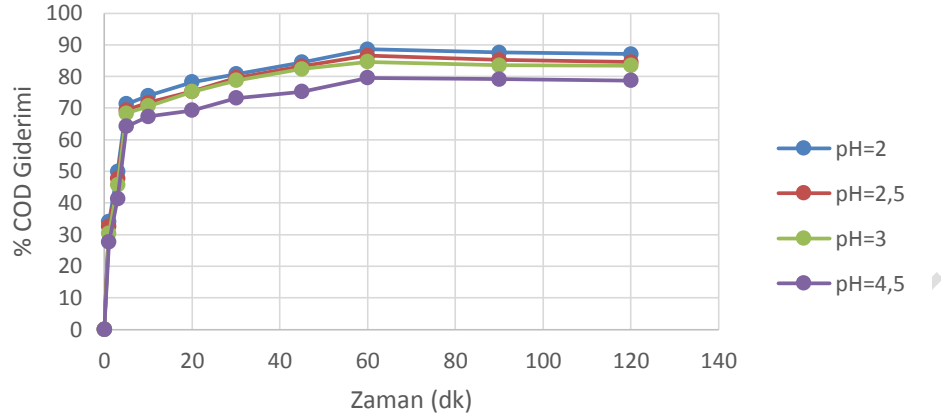
Fenton reaksiyonunda katalisit olarak kullanılan demir iyonunun başlangıçtaki miktarı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyonu neticesinde oluşan OH• radikalleri miktarına ve dolayısıyla kirletici degradasyonuna etki etmesi nedeni ile önemlidir (Solmaz ve ark. 2010). Yüksek demir iyonu derişimleri başlangıçta renk ve KOİ giderimini arttırsa da daha sonra OH• radikali üzerinde süpürme etkisi yaratır (Su vd., 2011). Şekil 5.15 ve 5.16 incelendiğinde artan demir iyonu derişimi ile renk ve KOİ gideriminin arttığı görülmüştür. 1 mM gibi düşük Fe(II) derişiminde

% 75,33 renk giderimi gibi yüksek bir verim elde edilmiştir. Demir derişiminin en iyi değer olarak kabul edildiği 2 mM'da ise 30 dakika reaksiyon süresi sonunda maksimum % 77,87 renk ve % 78,38 KOİ giderim verimi elde edilmiştir. 0,25 mM Fe<sup>+2</sup> iyonu derişiminde renk ve KOİ giderim verimlerin çok düşük olması, ortamdaki hidrojen peroksitle tepkimeye girerek hidroksil radikali üretecek kadar yeterli demir iyonlarının olmamasından kaynaklanmaktadır.

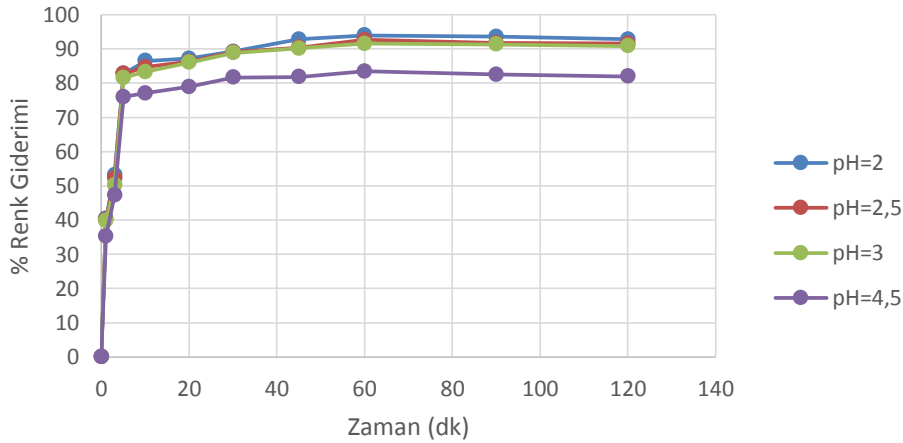
## 5.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup>/UV PROSESİ

### - pH Etkisi

Yüksek pH değerlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve demirin kararsız olmasından dolayı boyar maddelerin renk giderim verimleri düşmektedir. Bu sebepten dolayı pH aralığı 2-4,5 arası tutulmuş olup, pH değerlerinin KOİ ve renk giderimi üzerinde etkisi incelenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 5.7 Atık suyun KOİ giderim veriminin pH ile değişimi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=60 mM, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

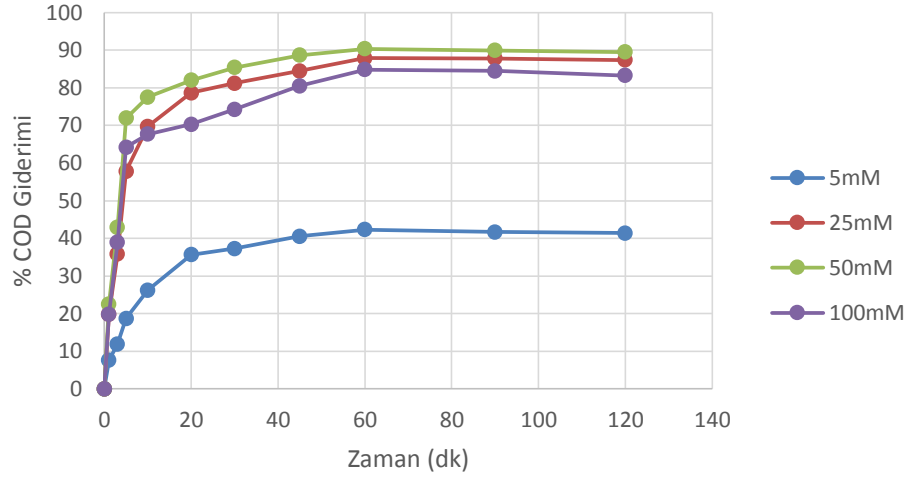


Şekil 5.8 Atık suyun renk giderim veriminin pH ile değişimi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=60 mM, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

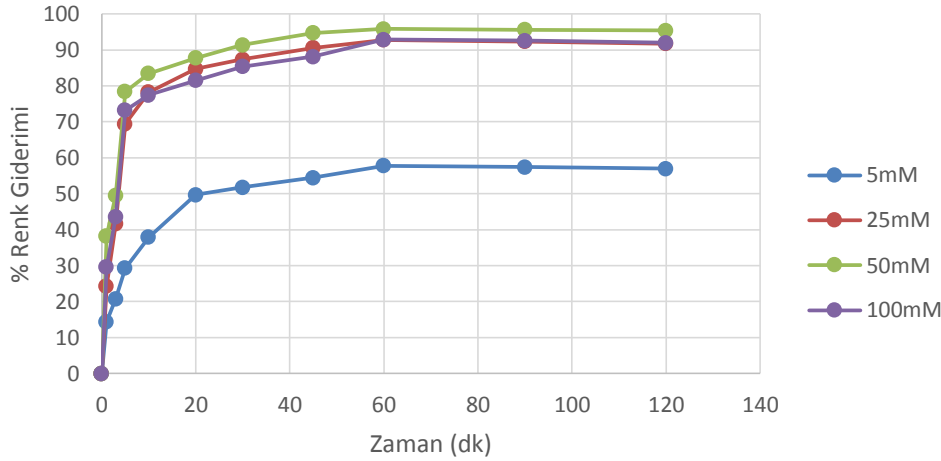
Foto-Fenton prosesi, Fenton prosesine göre, daha fazla hidroksil radikali ürettiğinden oksidasyon daha hızlıdır. Foto-Fenton deneylerinde iyi oranda renk ve KOİ giderimi elde etmek için pH değerinin demir floklarının en iyi çökme aralığına getirilmesi önemlidir. pH 2, 2,5, 3 ve 4,5 değerlerinde çalışmalar yapılmıştır. pH 4,5 dan pH 2 ye düştüğünde % giderim veriminin arttuğı görülmüştür. pH 2,5 ve pH 3 de sırasıyla % 86,56 KOİ, %92,67 renk ve % 84,64 KOİ, % 91,54 renk giderimi gibi oldukça yüksek verimlere ulaşılmıştır. En iyi verim ise 60 dakika reaksiyon süresi sonunda maksimum % 88,60 KOİ ve % 93,95 renk giderimi ile pH 2 de gerçekteleşmiştir. Diğer pH değerlerinde yapılan çalışmalarda giderim verimlerinin birbirlerine yakın olduğu gözlemlenmiştir.

### - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Derişimi Etkisi

En uygun belirlenen pH değerinden sonra en uygun hidrojen peroksit miktarını belirlemek için 5, 25, 50 ve 100 mM derişimlerinde hidrojen peroksit denemeleri yapılmıştır. Yapılan deneyler bir önceki aşamada bulunan en iyi pH değerinde gerçekteleştirilmiş, demir derişimi sabit tutulmuştur.



Şekil 5.9 Atık suyun KOİ giderim veriminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ile değişimi (pH=2, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)



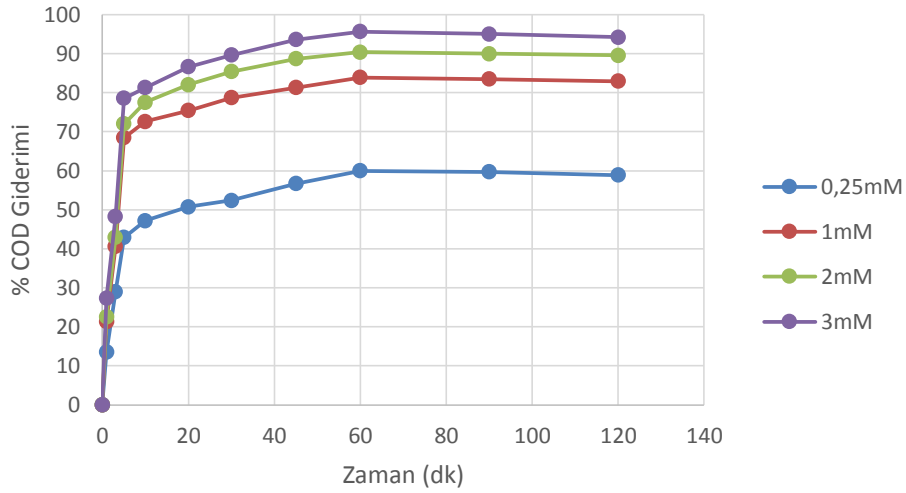
Şekil 5.10 Atık suyun renk giderim veriminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi ile değişimi (pH=2, Fe<sup>+2</sup>=2 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

Başlangıçtaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı arttıkça, ilave üretilen OH• radikalleri nedeni ile kirletici degradasyon verimi de artmaktadır. Ancak optimum miktardan daha fazla ortamda bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH• radikalleri ile reaksiyona girerek çok daha düşük oksidasyon potansiyeline sahip olan HO<sub>2</sub>• radikallerinin oluşmasına neden olur. Ortamda optimum miktardan daha az H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olması durumunda ise daha az miktarda OH• radikali oluşmasından dolayı oksidasyon verimi ve mineralizasyon derecesi düşük olur (Solmaz ve ark. 2010). Şekil 5.19 ve 5.20 de görüldüğü üzere en iyi verim 60 dakika reaksiyon süresi sonunda maksimum % 90,36 KOİ ve % 95,83 renk ile 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. 25 mM ve 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimlerinde de oldukça yakın giderim oranları gözlemlenmiştir. Fenton prosesinde olduğu gibi, 5 mM hidrojen peroksit derişiminde giderim verimi diğer derişimlerdeki giderim verimlerine göre düşüktür. Foto-Fenton prosesi, UV ışınının etkisi ile Fenton prosesine göre daha fazla hidroksil radikalleri oluştursa da, 5 mM hidrojen peroksit konsantrasyonu etkili bir giderim için yetersiz kalmıştır.

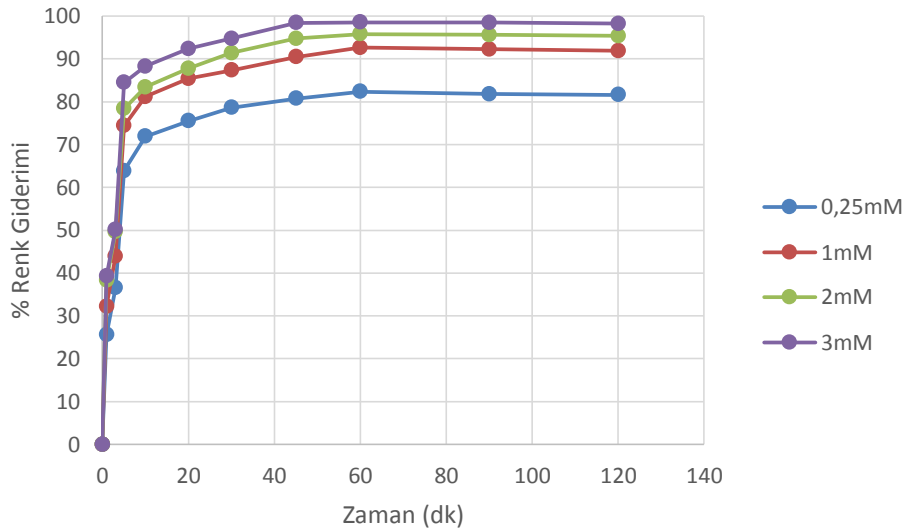
#### - Fe<sup>+2</sup> Derişimi Etkisi

Uygun pH değeri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi belirlendikten sonra demir iyonu derişiminin renk ve KOİ üzerine etkisi incelenmiştir. Demir iyonu derişimi 0,25-3 mM aralığında tutulmuştur. Sonuçlara dair grafikler aşağıda verilmiştir.





Şekil 5.11 Atık suyun KOİ giderim veriminin Fe<sup>+2</sup>derişimi ile değişimi (pH=2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 50 mM, reaksiyon süresi 2 saat)



Şekil 5.12 Atık suyun renk giderim veriminin Fe<sup>+2</sup>derişimi ile değişimi (pH=2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 50 mM, reaksiyon süresi 2 saat)

Deneyleerde kullanılan Demir(II) sülfat heptahidrat (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) oda koşullarında mavi yeşil mono klinik kristaller halinde bulunur. UV ışını ile ısınmaya başladığında ilk olarak kristalleşme suyunu kaybeder ve orijinal yeşil kristalleri kahverengi anhidrit katıya dönüşmektedir. Anhidrit madde sülfür dioksit ve beyaz sülfür trioksit dumanları çıkararak geriye kıvıllı-kahverengi demir (III) oksit bırakır. Demir iyonları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerinde katalitik ayrıştırma etkisine sahiptir. Optimum pH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminde yapılan deney sonuçları Şekil 5.21 ve 5.22 de gösterilmiştir. Artan demir iyonu derişimi kirlilik giderim verimini de arttırmıştır. 3 mM demir iyonu konsantrasyonunda 60 dakika reaksiyon süresi sonunda maksimum % 95,65 KOİ ve % 98,52 renk giderimi ile en iyi giderim verimi elde edilmiştir. 1, 2 ve 3 mM demir iyonu derişimindeki renk gideriminin birbirlerine oldukça yakın olduğu gözlemlenmiştir. Foto-Fenton prosesinde, hidroksil radikali üreticisi olarak demir iyonu yanında UV ışını da kullanılmaktadır. Bu nedenle Fenton prosesine göre daha düşük demir iyonu derişimlerinde bile etkili sonuç vermektedir. 0,25 mM demir iyonu derişiminin diğer derişimlere nazaran yetersiz kalması, üretilen az miktardaki OH• radikalleri ile atıksudaki boya ve diğer organik kirleticilerle etkili bir reaksiyon gerçekleştirememesinden kaynaklanmaktadır.

## 6.SONUÇLAR

Bu çalışmada; tekstil endüstrileri atıksularına Fenton ve foto-Fenton prosesleri uygulanarak renk ve KOİ giderim verimleri araştırılmıştır. Renk ve KOİ giderim verimine etki eden parametreler incelenip optimum deneysel koşullar belirlenerek uygulanan ileri oksidasyon prosesleri karşılaştırılmıştır. İleri oksidasyon proseslerinde hidrojen peroksit ve demir iyonu reaktiflerine UV ışını gibi hidroksil radikali üretimini artırıcı

mekanizma eklenerek reaksiyon süresi oldukça kısalmış, renk ve KOİ giderimi artmıştır. UV ışığının yanı sıra pH, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) derişimi, demir (Fe<sup>+2</sup>) iyonu derişimi gibi parametrelerin kesin olarak belirlenmesi de tekstil atık sularından KOİ ve renk gideriminde önemli olduğu görülmüştür. Optimum deneysel koşullarda Fenton prosesi için; pH:2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 60 mM, Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu: 2 mM, reaksiyon süresi 2 saat olup 30.dakikada maksimum % 83,74 KOİ ve % 80,44 renk giderim verimine, foto-Fenton prosesi için; pH:2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu: 50 mM, Fe<sup>+2</sup> konsantrasyonu: 3 mM, reaksiyon süresi 2 saat olup 60.dakikada maksimum % 95,65 KOİ ve % 98,52 renk giderim verimine ulaşılmıştır. Sonuç olarak tüm bu avantajları ve yüksek giderim verimliliği ile Fenton ve foto-Fenton prosesleri tekstil endüstrisi atıksularının arıtımı için alternatif olarak kullanılabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma PYO.MUH.1904.19.008 numaralı proje ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir. Destekleri için Ondokuz Mayıs Üniversitesi'ne teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Babuponnusami, A., Muthukumar, K., 2014, A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2, 557-572.
- Baiju, A., Gandhimathi, R., Ramesh, S., & Nidheesh, P. (2018). Combined heterogeneous Electro Fenton and biological process for. *Journal of Environmental Management*, (210):328-337.
- Bethi, B., Sonawane, S.H., Bhanvase, B.A., Gumfekar, S.P., 2016, Nanomaterials-based advanced oxidation processes for wastewater treatment: A review, *Chemical Engineering and Processing:Process Intensification*, 109, 178-189.
- Deng, Y., & Englehardt, J. (2006). Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Science Direct*, 3683 – 3694.
- H. Wu, S. Wang, Impacts of operating parameters on oxidation–reduction potential and pretreatment efficacy in the pretreatment of printing and dyeing wastewater by Fenton process, *J. Hazard. Mater.* 243 (2012) 86–94.
- J.M. Aquino, R.C. Rocha-filho, L.A.M. Ruotolo, N. Bocchi, S.R. Biaggio, Electrochemical degradation of a real textile wastewater using  $\beta$ -PbO<sub>2</sub> and DSA anodes, *Chem. Eng. J.* 251 (2014) 138–145.
- Kang, Y.W. and Hwang, K. 2000. Effect of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process. *Water Research.* (10), 2786-2790.
- Nikravan, A., 2015, Amoxicillin and Ampicillin Removal from Wastewater by Fenton and Photo-Fenton Processes, M.Sc. thesis, Hacettepe University, 123 p.
- Oturan, M.A., Aaron, J.J., 2014, Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications-A Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44, 2577-2641.
- Pignatello, J. (1992) Dark and photoassisted Fe<sup>+3</sup> catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.* 26, 944–951.
- Pouran, S.R., Aziz, A.R.A., Daud, W.M.A.W., 2015, Review on the main advances in photo-Fenton oxidation system for recalcitrant wastewaters *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 53-69.
- Rahmani, A., 2017, Heterogeneous Fenton Oxidation Process Using Natural Martite And Hydrogen Peroxide For Treatment Of Color in Water, M.Sc. thesis, Middle East Technical University, 201 p.
- Solmaz S K A, Azak H, Üstün G E., Morsünbül T (2010). Pestisit Gideriminde Fenton Proseslerinin Kullanımına Yönelik Bir Envanter Çalışması. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 15.
- Su, C., Pukdee-Asa, M., Ratanatamskul, C., Lu, M., 2011, Effect of operating parameters on the decolorization and oxidation of textile wastewater by the fluidized-bed Fenton process, *Separation and Purification Technology*, 83, 100-105.
- Türeli, G., 2008, Treatment of an Azo Dye and Azo Dye Production Wastewaters with Fenton-Like and Photo-Fenton-Like Advanced Oxidation Processes, M.Sc. thesis, İstanbul Technical University, 151 p.
- Umar, M., Aziz, H. A., & Yusoff, M. S. (2010). Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton for the treatment. *Waste Management*, 2113–2121.
- Zhou, Oturan, & Sirés. (2018). *Electro-Fenton Process New Trends and Scale-Up*. Singapore: Springer.

## Sondaj atıklarının yönetimi

Esra Tınmaz Köse

Namık Kemal Üniversitesi, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Çorlu/Tekirdağ/Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: etinmaz@nku.edu.tr

### Özet

Hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak artan yakıt ihtiyacı, petrol ve doğal gaz sondaj faaliyetlerinin artmasına ve beraberinde sondaj faaliyetleri sırasında ortaya çıkan atıklardan kaynaklanan çevre kirliliği sorunlarının da artmasına sebep olmaktadır. Hidrokarbon arama çalışmaları; hidrokarbon kaynaklarının varlığını belirlemek amacıyla, jeofizik yöntemlerin kullanılmasından, arama kuyusu açılmasına kadar olan süreci kapsar. Bu süreç içerisinde toprak, hava ve su gibi doğal ortamların kirlenmesi sözkonusudur. Bu çalışma kapsamında, petrol ve doğal gaz sondajı sırasında oluşan atıkların yönetim stratejileri üzerinde durulmuş ve sözkonusu atıkların yönetimine dair uygulama örnekleri sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Atık yönetimi, Doğal gaz, Hidrokarbon, Petrol, Sondaj.

### Drilling Waste Management

#### Abstract

In parallel with rapid world population growth, increasing fuel demand causes an increase in oil and natural gas drilling activities and environmental pollution problems emanating from wastes occurred by these drilling activities. Hydrocarbon exploration researches involve the period starting use of geophysical methods until drilling an exploratory shaft in an attempt to determine existence of hydrocarbon resources. In this period contamination of land, air and water are in question. In this study, the management strategies of wastes generated during oil and natural gas drilling have been emphasized and application examples related to the management of these wastes have been presented.

**Keywords:** Waste management, Natural gas, Hydrocarbon, Petroleum, Drilling.

#### GİRİŞ

Artan dünya nüfusuna paralel olarak ortaya çıkan enerji ihtiyacındaki artışın karşılanabilmesi için petrol ve doğal gaz arama ve sondaj faaliyetleri büyük hız kazanmıştır. Petrol endüstrisinde, petrol ve/veya doğal gaz arama, sondaj, nakliye ve rafinasyon adımlarının her birinde kullanılan çeşitli kimyasallara ve tekniklere bağlı olarak farklı tür ve miktarda, çevre kirliliğine büyük oranda etki eden atık oluşumu sözkonusudur. Petrolle birlikte çıkarılan ve sonrasında ayrıştırma işlemine tabi tutulan yüksek oranda tuz ve emülsifiye halde petrol içeren su, formasyon suları, sabotajlar veya boru hatlarındaki kaçaklar gibi çeşitli sebepler nedeniyle gerçekleşen ham petrol döküntüleri, sondaj yapılan lokasyondaki kayaçlarda bulunan ağır metaller ve nadir de olsa radyoaktif maddeler ve çeşitli bakteriler kirliliğe neden olan önemli parametrelerdendir (Fazlıoğlu, 2019; BP 2016).

Hidrokarbon sondaj çalışmaları; hidrokarbon kaynaklarının varlığını belirlemek amacıyla, jeofizik yöntemlerin kullanılmasından, arama kuyusu açılmasına kadar olan süreci kapsar. Bu süreç içerisinde toprak, hava ve su gibi doğal ortamların kirlenmesi sözkonusudur. 26" matkap ile başlanıp 8,5" matkap ile sonlandırılan ve 3500m civarında tamamlanan bir sondaj da kesintiler, sondaj akışkanları, kule temizlik ve soğutma suları toplam da 3500 ton üzerinde bir atık oluşturmaktadır (Doğanay, 2018).

Sondaj atığı, sondaj yapılan bir lokasyonda çıkan her türlü atığı ifade eder. Ülkemizdeki mevzuata göre, petrol ve doğal gaz sondajı sırasında oluşan sondaj çamurları ve diğer tüm sondaj atıkları, Atık Yönetimi Yönetmeliği'nde "01" bölüm kodu ile tanımlı "Madenlerin aranması, çıkarılması, işletilmesi ve kimyasal işleme tabi tutulması sırasında ortaya çıkan atıklar" bölümünün altında "01.05" kodu ile tanımlı "Sondaj çamurları ve diğer sondaj atıkları" olarak ifade edilmektedir (Atık Yönetimi Yönetmeliği, 2010). Sözkonusu atıklar, atık özelliklerine göre farklı yöntemler dahilinde toplanmakta, taşınmakta, ara ve geçici depolanmakta ve nihayetinde bertaraf edilmektedir.

Petrol ve doğal gaz sondajı sırasında, sondaj sıvıları (sondaj çamuru) ve kesinti olarak adlandırılan iki temel atık türü oluşumu sözkonusudur. Sondaj çamuru olarak da adlandırılan sondaj sıvıları su ve petrol bazlı olarak iki farklı tipte kullanılmaktadır. Sondaj işlemi sırasında oluşan kesinti ise kullanılan sondaj sıvısına göre farklı kirletici maddeler içerebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında, petrol ve doğal gaz sondajı sırasında oluşan atıkların yönetim stratejileri üzerinde durulmuş, sözkonusu atıkların yönetimine dair uygulama örnekleri sunulmuştur.

### SONDAJ ATIKLARI VE YÖNETİMİ

Sondaj sırasında kullanılan kimyasalların özelliklerine bağlı olarak sondaj atıkları tehlikeli atık kapsamında değerlendirilebilir. Bu nedenle sözkonusu atıkların yönetimde dikkatli davranmalıdır. Atıklar, hidrolik kırılma, kuyu tahrik, kuyudan hidrokarbon çıkarma veya çıkarılan hidrokarbonun taşınması esnasında oluşabilir (Reis 1996). Bu noktada unutulmaması gereken bir diğer önemli konu da hidrokarbon arama, sondaj, rafinasyon ve taşıma gibi faaliyetler sırasında oluşan döküntüler ve kazalar nedeniyle kirlenen çevrenin de temizlenmesi gerekliliğidir.

Hidrokarbon sondajının nitelik ve miktar olarak en önemli bir kısmını sondaj kesintisi oluşturmaktadır. Atık yönetim hiyerarşisinin bir gereği olarak sondaj atıklarının yönetimde öncelikle atık kaynağında azaltılmalı, mümkünse geri dönüştürülmesi veya yeniden kullanılması, geri kazanılması esastır. Atık oluşumunun önlenememesi halinde oluşan atıklar artırılmalı ve en sonda kalan atık nihai bertaraf yöntemi olarak düzenli depolanmalıdır.

Genel olarak atık yönetimde atığın geri kazanımının mı nihai bertarafının mı uygun olacağı değerlendirilmelidir. Bu kapsamda hem atığın özellikleri, hem arıtım teknolojileri, hem de maliyetler göz önünde bulundurulmalıdır.

Sondaj atıklarının ve bu atıklarla kirlenmiş toprakların arıtımı için uygulanan yöntemler Tablo 1’de özetlenmiştir (Tınmaz Köse, 2016).

**Tablo 1.** Sondaj Atıklarının ve Bu Atıklarla Kirlenmiş Toprakların Arıtımı İçin Uygulanan Yöntemler

<b>Biyolojik Arıtım</b>	
Biyoremediasyon	Bakterilerin ihtiyaç duyduğu besinlerin ve yeterli oksijenin olduğu ortamda gerçekleşen doğal biyolojik bozunma sürecidir. Havalandırma ve / veya sıcaklık kontrolü önemli parametrelerdir. Petrol kirlenmiş topraklar için son derece başarılı iyileştirme teknolojisidir.
Biyogüçlendirme	Ortama yağ parçalayabilen mikroorganizmaların eklenmesi ile gerçekleşir Mikroorganizma seçim kriterleri: Bakterilerin atığı/kirlenmiş toprağı parçalayabilme kapasitesidir.
Biyostimülasyon	Çevresel parametrelerden (besin elementi, gübreleme, biyo-yüzet aktif madde ilavesi vb) etkilenir. Mikroorganizma popülasyonunun artmasıyla biyodegradasyon oranı artar.
Biyoventilasyon	Mikroorganizmalar için aerobik bir koşul üretilir. Aerobik koşullar organik maddenin metabolizmasını artırabilir.
Fitoremediasyon	Bitki ve bitki kökleri ile arıtma teknolojisidir. Köklerde bulunan enzimler kirleticileri kimyasal olarak değiştirebilir ve bozunmasını sağlar.. Mikroorganizmalar ve bitkiler için bir besin kaynağı olan gübre ilavesi önemli bir faktördür.
Fitodegradasyon	Bitki yapısındaki enzimler hidrokarbonların parçalanmasında katalizör etki gösterir. Enzimler kirleticilerin parçalanma sürecini hızlandırarak kimyasal reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Enzimler: dehalojenaz, nitroredüktaz, lakkaz vb.
Fitostabilizasyon	Bitki kökleri kirleticileri toprakta stabilize etmek ve hareketsiz hale getirmekte önemli bir rol oynamaktadır. Kirlenmiş topraktan hidrokarbonun süzülmesi veya dağılması önlenir Fitostabilizasyonda, hidrokarbonların absorpsiyonu ve birikimi, kök bölgesi, kök zarı ve kök hücreleri içerisinde meydana geldiğinden, geniş bir kök sistemi gerekir.
Fitovolitizasyon	Bitkinin kökleri yoluyla kirleticilerin absorpsiyonu sürecidir. Bitkinin yüzeylerinden buharlaşma sözkonusudur. Sadece trikloretilen, naftalen gibi uçucu yağ bileşikleri için uygundur.
<b>Fiziksel-kimyasal Arıtım</b>	
Yüzdürme	Kimyasal, fizyokimyasal ve fiziksel yöntemlerin kombinasyonudur. Kirlenmiş topraklardaki petrol ve türevlerinin bir katı-sıvı sistemle ayrımını sağlar. Etkileyen faktörler: Kimyasal madde ilavesi, kirleticilerin ve toprağın özellikleri Düşük çökeltme hızlarına sahip çok küçük veya hafif parçacıkları ayrabilmektedir.

	Oluşan gaz kabarcıklarının hidrofobik kirleticilere yapışır ve kirletici kabarcıkla birlikte sıvının yüzeyine yükselir, geri kazanılabilecek ayrı bir parçacıklar tabakası oluşturur.
Topraktan buhar ekstraksiyonu	Yerinde toprak iyileştirme teknolojisidir. Organik bileşikler toprağın doymamış bölgesinden yatay veya dikey kuyular vasıtasıyla çıkartılır. Çıkartılan buhar daha sonra atmosferik kontaminasyonu önlemek için atmosfere salınmadan önce aktif karbon ile muamele edilir. Kriterler: Hava debisi, sıcaklık, kirletici özellikleri (buhar basıncı ve çözünürlük), toprak özellikleri (nem içeriği, doğal organikler) Yaygın kullanım: Yüksek poroziteli ve geçirgenliği yüksek topraklar, çok uçucu kirletici ile kirlenmiş topraklar.
Hava enjeksiyonu	Toprağa atmosferik hava enjeksiyonu uygulanır. Sıvı fazdaki kirleticilerin gaz fazına aktarılması sağlanır. Havadan aktarılan oksijen, uçucu organik bileşiklerin biyobozunmasını artırır.
Biyo-havalandırma	Gaz fazındaki kirleticileri uçuculaştırma yoluyla giderimidir.
Isı ilavesiyle buhar ekstraksiyonu	Geleneksel SVE yarı uçucu kirletici maddeler için sınırlı verime sahiptir. Verimliliği artırmak için: Sıcaklık ve buhar basıncı artırılabilir. Sıcaklık artırma yöntemleri: Radyo ve mikrodalga frekansı, sıcak hava enjeksiyonu, elektrik direnci
Solvent ekstraksiyonu	Etkinliği, toprak ve çözücü karışımı arasında yakın bir temasın gerçekleştirilmesine bağlıdır. Tipik çözücüler: Organik çözücüler, sürfaktan destekli sulu çözeltiler, süperkritik ve kritik altı sıvılar
Ultrasonikasyon	Kirleticinin desorpsiyonuna bağlı bir teknolojidir. Güçlü oksidan, OH <sup>-</sup> radikallerinin oluşumunu destekler Etkili parametreler: Toprak tipi ve yoğunluğu; sonikasyon gücü ve periyodu, pH, kullanılan su miktarını, yüzey aktif madde dozu, yağ içeriği.
<b>Kimyasal Arıtım</b>	
Kimyasal oksidasyon	Farklı oksidanlar kullanılır: Fenton'ın reaktifi, hidrojen peroksit, permanganat peroksimonosulfat, persülfat, ozon.
Elektrokinetik iyileştirme	Yerinde iyileştirme yöntemidir. Uygun şekilde dağıtılmış cihazlar arasında düşük seviyede doğrudan elektrik akımı uygulanır. Alan boyunca elektrik alan oluşturulması sağlanır.
<b>Termal Arıtım</b>	Kirleticilerinin ile giderimi teknolojisidir.
Yakma	Kirleticilerin 1000 ° C'den yüksek sıcaklıklarda yakılmasıdır.
Mikrodalga uygulaması	Termal enerjiye dönüşen mikrodalga enerjisi kullanılır. Kirleticileri ısıtarak ve buharlaştırarak giderme mekanizmasıdır.
Termal desorpsiyon	Artan sıcaklıkla birlikte: Organik kirleticilerin buhar basıncının artırılır, organik kirleticilerin buharlaşması sağlanır, Etkileyen faktörler: Kirleticinin bileşimi, konsantrasyonu ve buhar basıncı, sıcaklık, nem, süre, toprak bileşimi, yoğunluğu ve partikül boyut dağılımı.

## SONDAJ ATIKLARININ BERTARAFI İÇİN UYGULAMA ÖRNEKLERİ

Arıtmanın amacı, topraktaki toksik varlığıyla ilişkili riski çevresel olarak kabul edilebilir seviyeye indirmektir. Bu bağlamda arıtma, kirliliğin tamamen giderilmesi anlamına gelmez. Risk değerlendirmesinde (taşınma, biyoyuğunluk, dönüşüm vb.) göz önünde bulundurulmuş her bir faktör konusunda pozitif etkiye sebep olacak arıtma yöntemi değerlendirilmelidir. Risk değerlendirmesi kadar bu parametrelerin de çeşitli koşullar altında arıtma üzerine etkileri uygun arıtma yönteminin seçiminde öne çıkacaktır (Fazlıoğlu, 2019). Çalışmanın bu bölümünde hidrokarbon sondajı sırasında oluşan farklı atıklarının yönetimi için uygulanan arıtma yöntemlerinin uygulama örnekleri incelenmiş ve Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** Sondaj Atıkları Arıtımı Uygulama Örnekleri

Atık	Arıtma yöntemi	Kaynak
Birleşik Krallık ve Kanada'daki sahalardan alınan atık sondaj çamurunun	Laboratuvar ölçekli termal desorpsiyon prosesi (100 °C'de 16 saat) ile serbest sıvısı giderilmiştir. Sonra bacadaki fırında (250 °C'de 1 saat) bekletilmiştir. Çalışmada termal işlemin atık içerisindeki kirliliği azalttığı ancak yine de sınır değerlerin sağlanması için ek işlemlerin uygulanmasının gerekebileceği vurgulanmıştır.	Carignan ve ark., 2007
Sondaj kesintisi	Çalışmada öncelikle sondaj	Hickenbottom ve ark., 2013

	kesintisini susuzlaştırmış, akabinde ayrılan su üzerinde ters ozmos membran ile çıkış suyunun arıtımını sağlamışlardır.	
Sondaj sıvısı	Çalışmada temel amaç depolama sahasına gönderilmeden veya örtü olarak kullanılmadan önce atık sondaj sıvısının kararlı hale getirilmesi ve sonrasında doğal yolla kurumasının sağlanmasıdır.	Xie ve ark., 2015
Sıvı petrol atığı	Metakaolin bazlı jeopolimer kullanılmalarının etkisi araştırılmıştır. Jeopolimerin petrol atıkları için iyi bir tutulma malzemesi olduğunu ortaya koymuşlardır	Cantarel ve ark., 2015
Meksika'nın güneyinde yer alan sondaj kesintisi ile kirlenmiş bir sahanın remediasyonu	Biyokütle için kompostlaştırılması için 97 br atık/3 br saman (hacim artırımı için) karışımı kullanılmış ve çalışma sonunda uygun besin ilavesi, hacim artırıcı ve nem içeriği olduğunda aerobik mikrobiyal aktivitenin arttığı ve dolayısıyla hidrokarbon giderimi sağlandığını ortaya koymuşlardır.	Rojas-Avelizapa ve ark., 2007
Petrol sondaj atığı	Çalışmada, çeşitli bağlayıcılarla sondaj atıklarının S/S'u denenmiş ve S/S uygulaması ile oluşan ürünün tehlikeli olmayan atıkların depolanması için UK kabul kriterlerini karşıladığı ortaya konulmuştur.	Al-Ansary ve Al-Tabbaa, 2007
Petrol sondaj atığı	Petrol sondaj atıklarının çimento, kireç ve kül ile katılaştırılması sonucunda basınç dayanımının ve permeabilitenin arttığı ortaya konulmuştur.	Yuan ve ark., 2009
Sondaj kesintisi (Batman- Türkiye)	Kesintinin kurutulması çalışılmıştır. İlk nem: %50 Son nem: %34 Mikrodalga kurutucu: 120 W, 460 W ve 600 W Konvansiyonel (sıcak hav) kurutucu: 140 ° C ve 180 ° C Numune ağırlıkları: 50 g, 100 g ve 150 g Mikrodalga için enerji tüketimi: 0.01-0.11 kW/sa Konvansiyonel kurutucu için enerji tüketimi: 0,11-0.55 kW/sa	Tınmaz Köse ve ark., 2018
Sondaj kesintisi (Lüleburgaz- Türkiye)	Kesintinin kurutulması çalışılmıştır. İlk nem: %42 Son nem: %13,5 Mikrodalga kurutucu: 120, 350 ve 600 W Konveyör bantlı kurutucu: 70 °C, 80 °C ve 90 °C Numune ağırlıkları: 50 g, 100 g ve 150 g Mikrodalga için enerji tüketimi: 0,13-0,78 kW/sa Konvansiyonel kurutucu için enerji tüketimi: 0, 4,0811-16,75 kW/sa	Tınmaz Köse, 2019
Sondaj kesintisi (Lüleburgaz- Türkiye)	Kesinti yaş ve kurutulmuş (oda sıcaklığında) olarak S/S prosesine tabi tutulmuştur. Yaş numune katkı oranları: %2, 4, 6, 8, 10 Kuru numune katkı oranları: % 4, 8, 12, 16, 20 Sızma testi ve dayanım dayanıklılık deneylerinin sonuçlarına göre optimum katkı oranı %8.	Tınmaz Köse ve ark., 2017

## SONUÇ

Enerjiye bağımlılığın gün geçtikçe arttığı günümüzde, her ne kadar sürdürülebilir enerji kaynaklarına bir eğilim oluşmaya başlamış olsa da hidrokarbon türevi enerji kaynaklarının sektördeki ağırlığı gözardı edilemez. Hidrokarbon türevli enerji kaynaklarının kullanımına devam ettikçe sadece kullanımından kaynaklı kirliliğin değil, hidrokarbonların arama işleminden çıkartılmasına kadar ve sonrası süreçlerde önemli miktarda atık oluşumu söz konusudur.. 1934 yılından beri ülkemizde 4617'si karalarda 73'ü denizlerde olmak üzere 4690 adet sondaj kuyusu mevcuttur ve kuyuların da %36'sı son 13 yılda açılmıştır (PIGM, 2016). Bu rakamlar bile oluşması muhtemel atık miktarının büyüklüğünü gözler önüne sermektedir. Bu noktada atık azaltıcı önlemlerin alması öncelik teşkil etmelidir. Tüm önlemlere karşılık oluşan atıkların ise yönetmeliklere uygun olarak, verimli ve sürdürülebilir bir atık yönetimi kapsamında bertarafı gerçekleştirilmelidir.

## KAYNAKLAR

Al-Ansary MS, Al-Tabbaa A,2007. *Stabilisation/solidification of synthetic petroleum drill cuttings*, Journal of Hazardous Material, 141: 410–421.  
British Petrol-BP 2016. *Statistical Review of World Energy*, BP Global P.L.C.

- Cantarel V, Nouaille F, Rooses A, Lambertin D, Poulesquen A, Frizon F 2015. *Solidification/stabilisation of liquid oil waste in metakaolin-based geopolymer*, Journal of Nuclear Materials, 464: 16-19.
- Carignan MP, Lake CB, Menzies T (2007). *Assessment of two thermally treated drill mud wastes for landfill containment applications*, Waste Management & Research, 25(5): 394-401.
- Doganay g 2018. *Sondaj Atıkları ve Yönetmeliklere Göre Atık Yönetimi*, Medya Enerji Petrol, Doğalgaz ve Yenilenebilir Enerji Sektörlerinden Gerçek ve Teknik Haberler, 14/02/2018, <https://medyaenerji.com/2018/02/14/sondaj-sektorunde-cevre-mevzuati/> [Erişim 06.06.2019]
- Fazlıoğlu E 2019. Hidrokarbon (Petrol Ve Doğalgaz) Sondaj Kesintisinin Solidifikasyon/ Stabilizasyon Yöntemi ile Geri Kazanımı ve Bertarafı, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Hickenbottom KL, Hancock NT, Hutchings NR, Appleton EW, Beaudry EG, Xu P, Cath TY 2013. *Forward osmosis treatment of drilling mud and fracturing wastewater from oil and gas operations*, Desalination, 312: 60-66.
- Reis JC (1996). Environmental Control in Petroleum Engineering. Gulf Publishing Company, Houston, USA.
- Rojas-Avelizapa NG, Roldan-Carrillo T, Zegarra-Martinez H, Munoz-Colunga AM, Fernandez-Linares LC 2007. *A field trial for an ex-situ bioremediation of a drilling mud-polluted site*. Chemosphere, 66: 1595-1600.
- T.C. Resmi Gazete 2015. Atık Yönetimi Yönetmeliği. Sayı: 29314, Tarih: 02.04.2015, <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=7.5.20913&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=maden%20at%C4%B1k> [Erişim 08.06.2019].
- Tınmaz Köse E, Çelen E, Çelik SÖ 2018. *Conventional and microwave drying of hydrocarbon cutting sludge*, Environmental Progress & Sustainable Energy İlk basım: 14 Aralık 2018, <https://doi.org/10.1002/ep.13104>
- Tınmaz Köse E, Çelik SÖ, Akyıldız A, Engin E 2017. *Hidrokarbon Sondaj Atık Çamurunun Arıtımı, Geri Kazanımı ve İnşaat Sektöründe Tekrar Kullanımı*, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, NKUBAP.06.GA.17.100, Tekirdağ.
- Tınmaz Köse E 2019. *Drying of Drill Cuttings: Emphasis on Energy Consumption and Thermal Analysis*, Processes, 7(3), 145.
- Tınmaz Köse E 2016. *Technologies and used in the treatment of contaminated soils with hydrocarbons and application examples*, Eurosoil Istanbul 2016, 217-217.
- Xie SX, Jiang GC, Chen M, Li ZY, Mao H, Zhang M, Li Y 2015. *Treatment Technology for Waste Drilling Fluids in Environmental Sensitivity Areas*, Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 37: 817-824.
- Yuan Q, Sh C, Schutter G, Audenaert K, Deng D 2009. *Chloride binding of cementbased materials subjected to external chloride environment—a review*, Construction and Building Materials, 23: 1-13.

## Erkek obezite hastalarından gastrektomi operasyonu ile elde edilen mide dokularında glutatyon S-transferaz izozimlerinin aktivitelerinin ve toplam tiyol miktarlarının yaşa göre karşılaştırılması

Can Yılmaz<sup>1</sup>, Serpil Oğuztüzün<sup>2</sup>, Hakan Buluş<sup>3</sup>, Mehmethan Cihan<sup>4</sup>, Ceylan Fidan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Karaman Devlet Hastanesi, Genel Cerrahi, Karaman, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:ceylan.fidan@hotmail.com

### Özet

Obezite, prevalansındaki yükselme eğiliminden, birçok hastalık ve mortalite ile ilişkili olmasından dolayı pek çok ülkede önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu çalışmada endojen savunma mekanizmasının önemli üyeleri olan glutatyon molekülü ve glutatyon S-transferaz enzimi üzerine obezite ve yaşın etkisi araştırıldı. 8 obezite hastasından alınan mide dokusu örnekleri homojenize edildi. GSH düzeyleri analiz edildi. GST enzim aktivitesi ELISA Mikroplaka Okuyucu sistemde CDNB, pNBC, EPNP substratlarına karşı okuma yapılarak belirlendi. Hastalar yaşları göz önünde bulundurularak gruplandırıldı. Yaş-GSH ve toplam GST ilişkisinde yaş artışı ile beraber GSH düzeyi ve toplam GST aktivitesinde artış gözlemlendi. Çalışma sonucunda, farklı GST izozimleri arasında belirgin bir bağıntı tespit edilemedi. Mevcut çalışma Türk nüfusundaki erkek obez hastaların mide dokularında GST enzim aktivitelerinin ve toplam tiyol miktarının yaş parametresine göre gruplandırılıp karşılaştırıldığı ilk çalışma oldu. Bu çalışma Ankara Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2012-KAEK-15/(1678) 1800 sayılı onayıyla gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CDNB, EPNP, GSH, GST, Obezite, pNBC.

### Comparison of the activities of glutathione S-transferase isozymes and total thiol content of gastric tissues obtained from obesity patients by gastrectomy operation according to age

### Abstract

Obesity has become an important public health problem in many countries because of its increasing prevalence, its relation with many diseases and mortality. Studies have shown that obesity is associated with oxidative stress. In this study, the effect of obesity and related diseases on GSH molecule and GST enzyme which are important members of endogenous defense mechanism were investigated. The samples of gastric tissue which was taken from 8 obese patients, were homogenized. GSH levels were analyzed. GST enzyme activity was measured towards CDNB, pNBC, EPNP substrates in the ELISA Microplate Reader system. Patients were grouped according to age. In the relationship between age-GSH and total GST, GSH level and total GST activity increased with age. The present study is the first study to compare activities of GST isozymes and total thiol content in the stomach tissue of male obese patients in Turkish population grouped according to age.. This study was conducted with the approval (No: 2012-KAEK-15 / (1678) 1800) of Ankara Kecioren Training and Research Hospital Medical Research Ethics Committee.

**Keywords:** CDNB, EPNP, GSH, GST, Obesity, pNBC.

### GİRİŞ

Obezite yağın adipoz dokuda normal olmayan ya da aşırı bir şekilde birikimi sonucu genel sağlığı olumsuz yönde etkileyen, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi bir dizi kronik hastalık için risk faktörü veya belirleyici olan bir durumdur (WHO, 2000; Tremmel ve ark., 2017).

### Obezite ile İlişkili Oksidatif Stres Mekanizmaları

Epidemiyolojik ve klinik pek çok çalışma, obezitenin, değişen redoks durumu ve artmış metabolik risk ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Tran ve ark., 2012; Codoner-Franch ve ark., 2013; Warolin ve ark, 2014). Oksidatif stres hem obezitenin bir sonucu hem de obezitenin tetikleyicisi olabilir. Kronik aşırı beslenme, yüksek oranda karbonhidrat, doymuş yağ asitleri ve trans-yag asitleri içeren besinlerle beslenmek, hücre içi yolları uyararak, NADPH oksidazlardan (Nox) süperoksit üretimi, oksidatif fosforilasyon, gliseraldehit otoksidasyonu gibi çok sayıda biyokimyasal mekanizma yoluyla oksidatif strese yol açar (Sies ve ark., 2005; Serra ve ark., 2013). Oksidatif stres, beyaz yağ dokusu birikimini uyararak ve gıda alımını değiştirerek



obezitenin gelişiminde etkili olabilir. Hücre kültürü ve hayvan çalışmaları oksidatif stresin olgun adipositlerin boyutunu, adiposit proliferasyonunu ve adiposit farklılaşmasını artırdığını göstermektedir (Furukawa ve ark., 2004; Lee ve ark., 2009; Higuchi ve ark., 2013) ve reaktif oksijen türlerinin tokluk ve açlık davranışını kontrol eden hipotalamik nöronlar üzerinde farklı etkiler yaparak vücut ağırlığının kontrolünde rol aldığı görülmektedir (Horvath ve ark., 2009). Ayrıca, obezitenin kendi başına sistemik oksidatif stresi indükleyebileceği de gösterilmiştir: aslında yağ birikiminin, adipositlerde ROS üretiminin artmasına neden olan Nox aktivitesini ve endoplazmik retikulum (ER) stresini artırdığı gösterilmiştir (Furukawa ve ark., 2004; Mlinar ve Marc 2011).

Obezitede oksidatif strese katkıda bulunan diğer faktörler, tokluk sonrası anormal ROS üretimi (Patel ve ark., 2007), hiperleptinemi (Beltowski, 2012), kronik inflamasyon (Bondia-Pons ve ark., 2012), doku fonksiyon bozukluğu (Serra ve ark., 2013) ve yetersiz antioksidan savunmasıdır (Chrysohoou ve ark., 2007). Obezitede oksidatif stresi azaltma stratejileri arasında ise kilo verme, fiziksel aktiviteyi artırma ve antioksidan bakımından zengin beslenme vardır. Kilo vermenin oksidasyon belirteçlerini azalttığı, antioksidan savunmayı artırdığı ve insan obezitesi ile ilişkili metabolik ve kardiyovasküler riskleri iyileştirdiği (Bigornia ve ark., 2010) bilinmektedir (Savini ve ark., 2013).

## Glutasyon Konjugasyonu ve Glutasyon S-Transferazlar

### Glutasyon ve metabolik konjugasyonu

Faz II konjugasyon reaksiyonları içinde glutasyon konjugasyonu ana reaksiyonlardan biridir (Yang ve ark., 2011). Glutasyon (GSH), glutamin, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan suda çözünebilir bir tripeptiddir. Önemli bir antioksidan olarak GSH, glutasyon S-transferazlar (GST) ve glutasyon peroksidazlar (GPx) ile katalizi aracılığıyla çeşitli elektrofilik bileşiklerin ve peroksidlerin detoksifikasyonunda rol oynar.

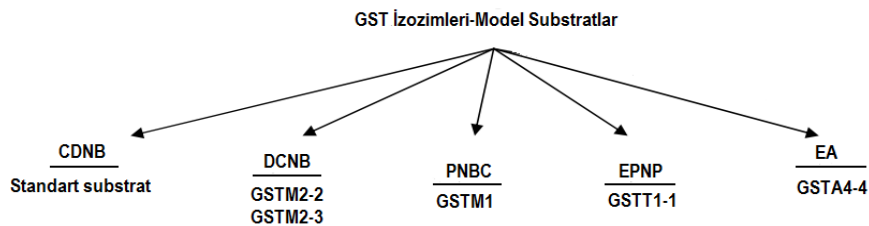
Tripeptit, hücre içinde yükseltgenmiş (GSSG) veya indirgenmiş (GSH) formda bulunabilir. Hücredeki optimal GSH: GSSG oranlarının korunması, hayatta kalma açısından kritik öneme sahiptir, dolayısıyla sistemin sıkı bir şekilde düzenlenmesi zorunludur. GSH'un eksikliği, hücrede oksidatif hasar riski oluşturur. GSH oranındaki dengesizlik kanser, nörodejeneratif bozukluklar, kistik fibrozis, HIV ve yaşlanma gibi geniş bir patoloji ile ilişkilendirilmiştir (Townsend ve ark., 2003).

### Glutasyon S-transferazlar

Glutasyonun hem endojen hem de ksenobiyotik kökenli elektrofillerle konjugasyonunu katalize eden Glutasyon S-transferaz enzimleri detoksifikasyon sistemleri arasında kritik bir rol oynamaktadır (Hayes ve Pulford, 1995; Moden ve Mannervik, 2014). Klasik olarak, tripeptid glutasyonun, S-glutasyonillenmiş polar tepkime ürünü oluşturmak üzere reaktif elektrofilik merkez içeren bir substrata aktarılmasını katalize ederler ve böylece ürünlerin suda çözünürlüğünü artırırlar (Dixon ve ark., 2002; Habig ve Jakoby, 1981). GST'lerin ökaryotik formları hücresel yerleşimlerine göre *sitozolik GST'ler*, *mitokondriyal GST'ler* ve *mikrozomal GST'ler* olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Hayes ve Pulford, 1995; Allocati ve ark., 2018).

### Glutasyon S-transferaz Enzimlerinin Substratları

İlaçlar, pestisitler, endojen moleküller, çevresel karsinojenler ve toksikantlar gibi pek çok kimyasal GST enzimleri tarafından substrat olarak kullanılabilir (Eaton ve Bammler, 1999). GST izozimlerinin GSH ile elektrofilleri bağlama yeteneğinde belirgin farklılıklar vardır. Belirli GST izozimlerine özgü olan substratlar, genellikle izoenzimleri tanımlamak amacıyla kullanılır (Hayes ve Pulford, 1995). Bu amaçla kullanılan substratlar Şekil 1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 1. İnsan GST izozimleri ve model substratları (Hayes ve Pulford, 1995; Sherratt ve Hayes, 2002)

## MATERYAL VE METOD

Obez hastalara ait mide dokusu örnekleri, Ankara Keçiören Eğitim Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Servisi'nde, her yaş diliminden, erkek hastalardan gastrektomi operasyonu ile elde edildi. Bu dokular hastalardan alındıktan hemen sonra etiketlenerek -80°C soğutucularda muhafaza edildi; daha sonra, kuru buz

içerisinde üniversitemiz Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarına kargo ile gönderildi. Örnekler, soğuk zincir bozulmadan özel kutular içerisinde -80°C soğutucuya kaldırıldı ve deney gününe kadar orada muhafaza edildi.

### Mide Dokularının Homojenizasyonu

Mide dokuları 150 mM NaCl ve 1 mM EDTA içeren 100 mM toplam 200 ml'lik yıkama tamponu ile yıkandı. Homojenizasyon uygulaması 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1.4 mM ve proteaz inhibitör kokteyli (100X; VWR-M221-1ML) içeren soğuk homojenizasyon tamponunda "1 g doku/4 ml homojenizasyon tamponu" oranında buza daldırılmış teflon-cam hücre parçalama tüpü içerisinde 6x30sn olacak şekilde gerçekleştirildi. Homojenatlar 12000 g'de, +4 °C'de, 30 dk santrifüj edildi, süpernatant toplandı ve alikotlara bölünüp etiketlendikten sonra -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

### Bradford metodu ile protein tayini

Bu çalışma kapsamında yapılan bütün protein tayinleri Bradford (Coomassie Blue) Metodunun ELISA Mikroplaka Okuyucu sisteme göre optimize edilmiş haliyle yapıldı. Stok ve standart BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltilerinin hazırlığı:

3mg/ml BSA-stok çözelti, 0.0060 g BSA tartılır ve 2 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde çözünmesi sağlandı.

dH<sub>2</sub>O ile yapılan seyreltmeler ile 1.5-1-0.5-0.25 ve 0.1 mg/ml BSA stokları hazırlandı.

**Uygulama:** İşlenmiş doku örneklerinin homojenizasyon tamponuyla istenilen oranda dilüsyonları hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu mikro plakada 5 µl örnek veya 5 µl BSA standardı üzerine 150 µl Bradford solüsyonu eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 595 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA mikro plaka okuyucuda oda sıcaklığında köre karşılık okundu. Köre örnek yerine aynı hacimde homojenizasyon tamponu eklendi. Elde edilen değerler ile standart eğri oluşturulup eğimi hesaplandı.

### GST Spesifik Aktivite Tayini

Mide dokusundan elde edilen homojenatlarda GST enzim aktivitesinin ölçümünde 3 farklı substrat kullanılmıştır: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), *p*-nitrobenzil klorid (*p*NBC) ve 1,2-epoksi-3-(*p*-nitrofenoksi)-propan (EPNP)

### GST Spesifik Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Deney, Habig ve ark. (1974) önerdiği metodun ELISA Mikroplaka Okuyucu sisteme göre optimize edilmiş haliyle (Yılmaz ve Iscan, 2014; Tablo 1) yapıldı.

**Tablo 3.** GST enzim aktivitesi reaksiyon ortamına ait bileşenler

Kullanılan Substrat	Konsantrasyon (mM)	Fosfat Tamponu (mM) (pH 6.5)	GSH (mM)	Protein Miktarı (µg)	λ <sub>max</sub> (nm)	ε
CDNB	1	100	5	3.23-23.6	340	9.6
pNBC	1	100	5	128,75-471,75	310	1.9
EPNP	5	100	5	25.75-94.35	360	0.5

Tutarlı sonuçlar elde edebilmek için örneklerin hepsinde farklı zamanlarda en az iki defa daha enzim aktivitesi okundu ve her okumada her bir örnek için triplike çalışıldı. Enzim spesifik aktivitesi hesaplamasında (Eş.1) ScanIt RE4.1 yazılımı tarafından hesaplanan ortalama hız değeri kullanıldı:

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{dA/dt}{\epsilon (mM^{-1} cm^{-1})} \times SF \times \frac{1}{mg \text{ protein/ml}} \quad (1)$$

dA/dt birim zamanda (ms) abzorbanstaki değişimi (mOD), yani ortalama hızı, ε ekstinksiyon sabitini (CDNB, pNBC ve EPNP için sırasıyla 9.6, 1.9 ve 0.5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) ve SF ise seyreltme faktörünü simgelemektedir.

### Toplam Tiyol Gruplarının Belirlenmesi

Her bir örneğe ait total tiyol miktarı Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından tanımlanan metodun ELISA Mikroplaka Okuyucu sisteme göre optimize edilmiş haliyle belirlenmiştir.

GSH standartlarının hazırlığı: Standart eğrinin oluşturulması için 0,01-0.1mM konsantrasyon aralığında GSH çözeltileri hazırlandı. Standart eğri kullanılarak örneklerdeki toplam tiyol miktarı hesaplandı.

Reaksiyona ait bileşenler Tablo 2’de görülmektedir. 30 dakika 25 °C’de ve karanlıkta inkübe edildikten sonra ELISA mikropilaka okuyucuda 405 nm’de absorpsiyon değerleri ölçüldü.

**Tablo 2.** Toplam tiyol gruplarının belirlenmesi deneyine ait reaksiyon bileşenleri

Blank	Standart/Örnek
-	10 µl Örnek /GSH
40 µl Tris tampon	30 µl Tris tampon
20 µl DTNB	20 µl DTNB
140 µl MeOH	140 µl MeOH

### İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Sigmaplot 13.0 lisanslı yazılımı ile gerçekleştirildi. İkili gruplar arasında normalite testi (Shapiro-Wilk) ve eşit varyans testi (Brown-Forsythe) uygulanarak testleri geçip geçmedikleri kontrol edildi. Grupların ortalamaları, standart sapma (SD) ve standart hata ortalamaları (SEM) hesaplanarak, grafiklerde ortalamaların standart hatası hata barlarını oluşturmakta kullanıldı ( $\pm$ SEM). t-test sonrasında, normalite testlerini geçen grup karşılaştırmalarında, tek ve çift uçlu P değerleri (one-tailed P value, two-tailed P-value) hesaplanarak iki grubun birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olup olmadıkları belirlendi

### BULGULAR

8 erkek obezite hastasından toplanan anketlerden elde edilen bilgilerden yola çıkarak hastalar, yaş parametresi göz önünde bulundurularak 35 yaş üzeri 4 hasta ve 35 yaş ve altı 4 hasta halinde gruplandırıldı.

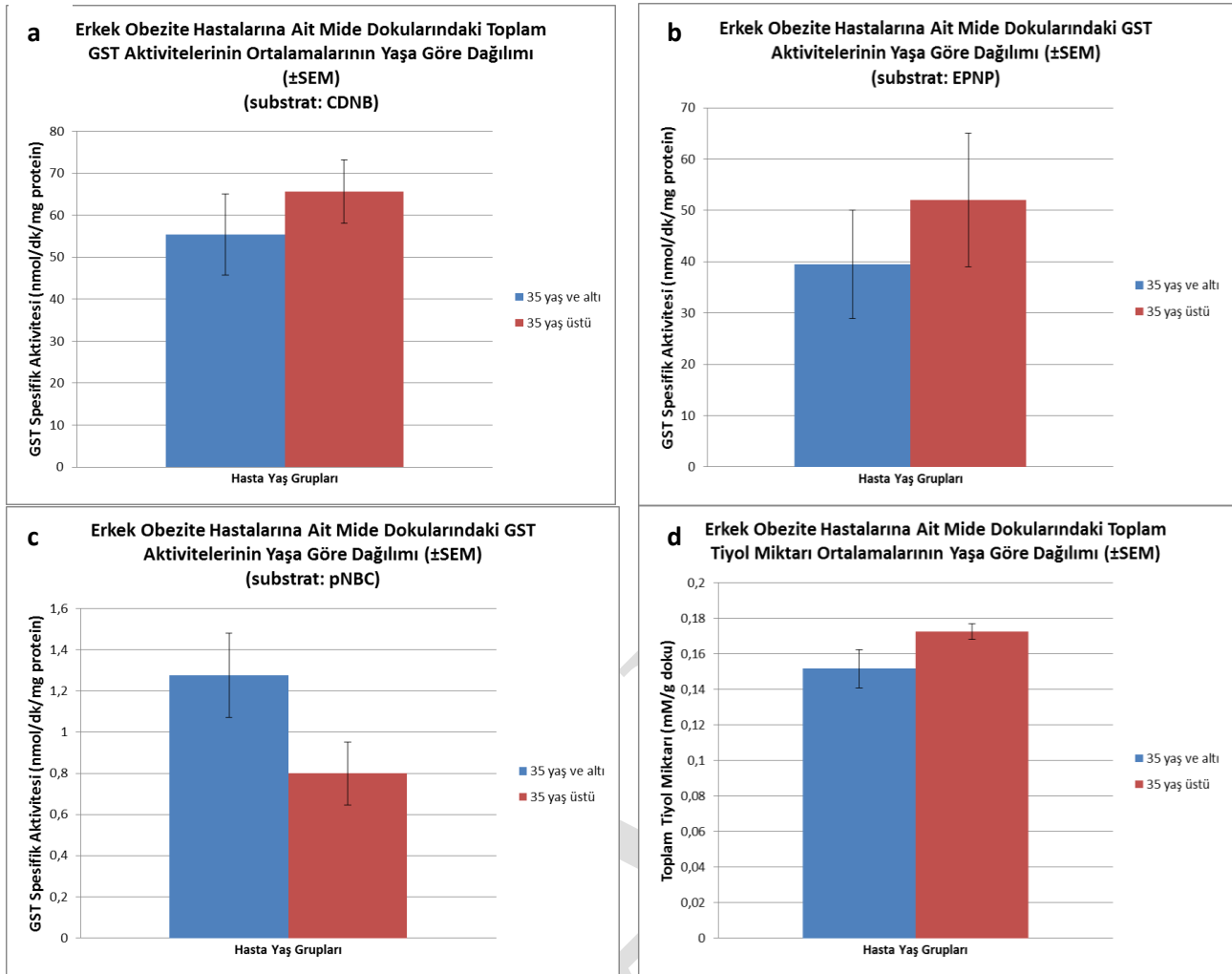
Yaş verilerine göre toplam 8erkek obezite hastası, “35 yaş ve altı” ve “35 yaş üstü” olarak gruplandırıldı. Her iki gruba ait toplam GST (Şekil 2a), GSTT1-1 (Şekil 2b), GSTM1 (Şekil 2c) enzimlerinin spesifik aktiviteleri ve toplam tiyol miktarı (Şekil 2d) ortalamalarının yaşa göre dağılımı Şekil 2’de, t testi sonuçları ise Tablo 3’de görülmektedir.

35 yaş ve altı hasta grubu için toplam GST spesifik aktivitesi ortalamaları  $55.4625 \pm 9.647$  nm/dk/mg protein (n=4) olarak hesaplanırken, 35 yaş üstü grup için  $65.6875 \pm 7.574$  nm/dk/mg protein (n=4) olarak hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde toplam GST aktivite spesifik aktivitesinin “35 yaş üstü” hasta grubunda “35 yaş ve altı” hasta grubundan %18 daha fazla olduğu görüldü.

35 yaş ve altı hasta grubu için EPNP substratına karşı okunan GSTT1-1 izozimi spesifik aktivitesi ortalamaları  $39.50107 \pm 10.563$  nm/dk/mg protein (n=3) olarak hesaplanırken, 35 yaş üstü grup için  $52.04903 \pm 13.037$  nm/dk/mg protein (n=3) olarak hesaplandı. Deneysel hata olduğu veya örneklerin bozulduğu varsayılan, hasta ait bir veri ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan, hastaya ait bir veri ortalama hesaplamalarında kullanılmadı. Sonuçlar değerlendirildiğinde 35 yaş ve altı gruba ait, EPNP substratı ile ölçülen GST izozimi spesifik aktivitesi ortalamasının 35 yaş üstü gruptan %24 daha az olduğu belirlendi.

35 yaş ve altı hasta grubu için pNBC substratına karşı okunan GSTM1 izozimi spesifik aktivitesi ortalamaları  $1.274678 \pm 0.204$  nm/dk/mg protein (n=4) olarak hesaplanırken, 35 yaş üstü grup için  $0.799135 \pm 0.153$  nm/dk/mg protein (n=4) olarak hesaplandı. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 35 yaş ve altı gruba ait, pNBC substratı ile ölçülen GST izozimi spesifik aktivitesi ortalamasının 35 yaş üstü gruptan %60 daha fazla olduğu belirlendi.

35 yaş ve altı hasta grubu için toplam tiyol miktarı ortalamaları  $0.151782 \pm 0.0108$  (n=3) mM/g doku hesaplanırken, 35 yaş üstü grup için  $0.17253 \pm 0.00441$  mM/g doku (n=4) olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmayan, bir hastaya ait veri ortalama hesaplamalarında kullanılmadı. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde 35 yaş üstü gruba ait toplam tiyol miktarının ortalamasının 35 yaş ve altı gruba göre %13 daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 2. GST izozimlerinin aktivitelerinin (a,b ve c) ve toplam tiyol miktarları (d) ortamlarının erkek obezite hastalarının yaşına bağlı değişimi

Tablo 3. Deney setleri için yapılan t testi sonuçları

	P değeri (%95 güven aralığına göre)	Normalite Testi (Shapiro-Wilk)	Eşit Varyans Testi (Brown-Forsythe)
Toplam GST <sup>†</sup>	0,218	Geçti (P = 0,561)	Geçti (P = 0,810)
GSTT1-1 <sup>†</sup>	0,248	Geçti (P = 0,490)	Geçti (P = 0,114)
GSTM1 <sup>‡</sup>	0,056	Geçti (P = 0,184)	Geçti (P = 0,686)
Toplam Tiyol <sup>†</sup>	0,051	Geçti (P = 0,336)	Geçti (P = 0,208)

(<sup>†</sup>) Toplam GST, GSTT1-1 enzimleri spesifik aktivitesi ve toplam tiyol miktarı deney setlerinde 35 yaş üstü ve altı için yapılan t test analizi 35 yaş üstü grubunun, 35 yaş ve altı grubunun ortalamasından büyük olduğu reddedilemez sonucunu vermiştir.

(<sup>‡</sup>) GSTM1 enzimi spesifik aktivitesi deney setinde 35 yaş üstü ve altı için yapılan t test analizi 35 yaş ve altı grubunun, 35 yaş üstü grubunun ortalamasından büyük olduğu reddedilemez sonucunu vermiştir.

Elde edilen bütün veriler istatistiksel olarak anlamlıdır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Loguercio ve ark., (1996) tarafından İtalyan popülasyonunda yapılan çalışmada, sağlıklı bireylerin gastrik mukoza örneklerinde ölçülen GSH düzeylerinde ve toplam GST enzim aktivitelerinde yaşın artışına bağlı

olarak azalma olduğu bildirilmiştir. Bu durum, mevcut çalışmada elde edilen sonuçların tam tersini işaret etse de (Tablo 4), örneklerin obez hastalardan toplandığı ve farklı bir popülasyonun örneklem olarak kullanıldığı unutulmamalıdır.

**Tablo 4.** Tüm substratlarla elde edilen GST aktiviteleri ve GSH miktarları

		GST Spesifik Aktivitesi (nmol/dk/mg protein)			GSH ± SEM (mM)
		CDNB ± SEM	EPNP ± SEM	pNBC ± SEM	
Yaş	≤35	55,4625 ± 9,647	39,50107 ± 10,563	1,274678 ± 0,204	0,151782 ± 0,0108
	>35	65,6875 ± 7,574	52,04903 ± 13,037	0,799135 ± 0,153	0,17253 ± 0,00441

Hasta gruplarının ortalama değerleri incelendiğinde yüksek GST aktivitesine karşılık düşük GSH miktarı bir genelleme ortaya koymamaktadır. 35 yaş üstü hastalarda GSH miktarı, daha yüksek enzim aktivitesine rağmen (pNBC ile ölçülen GSTM1 enzim aktivitesi hariç), diğer gruptakinden yüksek çıkmıştır. Artan yaşla birlikte pek çok dokudaki toplam GSH miktarının azaldığı GSSG konsantrasyonlarının arttığı rapor edilmekte (Maher, 2005; Thomas ve ark., 2016); ve bu durumun yaşa bağlı ortaya çıkan kardiyovasküler hastalıklara ve hatta Parkinson's hastalığına sebebiyet verdiği iddia edilmektedir. Esasında, yaşlanmanın tam olarak tanımı yapılamamakta; normal fizyolojinin bir parçası mı yoksa yukarıda bahsedilen ve daha pek çok patolojinin bir sonucu mu (Lushchak, 2012) olduğuna kesin karar verilememektedir. Bu nedenle, çalışmada gözlemlenen 35 yaş üstü hastalardaki daha yüksek GSH miktarlarının deneysel bir hatadan kaynaklanmadığı; sağlıklı bireylere göre obez hastalarda tam tersi bir durumun olabileceği sonucuna varılmıştır. Kan plazmasında yapılan ölçümlerde, glutatyon S-konjugatları taşımının obez bireylerde, çok daha fazla olduğu da bildirilmiştir (Ozaydın ve ark., 2006). Ayrıca, örneklem içerisindeki hastaların diğer patolojileri ve düzenli kullandıkları ilaçlar ile beslenme şekilleriyle ilgili daha detaylı veriler olmadan yorum yapılması oldukça güçtür. Obezite hastalarının sıklıkla kullandığı antihiperglisemik ilaçların GSH konsantrasyonlarında artışa neden olduğunu bildiren bazı çalışmalar (Ewis ve Abdel-Rahman, 1995) bulunmaktadır.

EPNP substratı ile ölçülen GSTT1-1 izoziminin aktivitesi, pNBC ile tespit edilen GSTM1 izoziminin aktivitesi ile CDNB ile belirlenen toplam GST aktivitesi, ortalama değerler olarak karşılaştırıldığında; Tablo 4'de görüldüğü üzere, bu üç farklı substrat ile ölçülen aktivite değerlerinin ortalamaları arasında bir korelasyon bulunmamaktadır. Diğer bir deyişle, çalışma sonucunda, farklı GST izozimleri arasında belirgin bir bağıntı tespit edilememiştir.

## KAYNAKLAR

- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7 (1): 8.
- Beltowski, J., 2012. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39 (2): 168-178.
- Bigornia, S. J., Mott, M. M., Hess, D. T., Apovian, C. M., McDonnell, M. E., Duess, M. A., Kluge, M. A., Fiscale, A. J., Vita, J. A., Gokce, N., 2010. Long-term successful weight loss improves vascular endothelial function in severely obese individuals. *Obesity*, 18 (4): 754-759.
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., Martinez, J. A., 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68 (4): 701-711.
- Chrysohoou, C., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Skoumas, I., Papademetriou, L., Economou, M., Stefanadis, C., 2007. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 17 (8): 590-597.
- Codoner-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Tortajada-Girbes, M., Simo-Jorda, R., Alonso-Iglesias, E., 2012. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22 (3): 237-243.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R., 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3 (3): reviews3004.1-3004.10
- Eaton, D. L., Bammler, T. K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences: An Official Journal of The Society of Toxicology*, 49 (2): 156-164.
- Ewis, S. A., Abdel-Rahman, M. S., 1995. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Applied Toxicology*, 15 (5): 387-390.

- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114 (12): 1752-1761.
- Habig, W. H., Jakoby, W. B., 1981. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In *Methods in Enzymology*, 77, 398-405. Academic Press.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (22): 7130-7139.
- Hayes, J. D., Pulford, D. J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30 (6): 445-520.
- Higuchi, M., Dusting, G. J., Peshavariya, H., Jiang, F., Hsiao, S. T. F., Chan, E. C., Liu, G. S., 2012. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells and Development*, 22 (6): 878-888.
- Horvath, T. L., Andrews, Z. B., Diano, S., 2009. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20 (2): 78-87.
- Lee, H., Lee, Y. J., Choi, H., Ko, E. H., Kim, J. W., 2009. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (16): 10601-10609.
- Loguercio, C., Taranto, D., Vitale, L. M., Beneduce, F., Blanco, C. D. V., 1996. Effect of liver cirrhosis and age on the glutathione concentration in the plasma, erythrocytes, and gastric mucosa of man. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (3): 483-488.
- Lushchak, V. I., 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012: 26.
- Maher, P., 2005. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, 4 (2): 288-314.
- Mlinar, B., Marc, J., 2011. New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 49 (12): 1925-1935.
- Modén, O., Mannervik, B., 2014. Glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Advances in Cancer Research*, 122: 199-244.
- Ozaydin, A., Onaran, I., Yeşim, T. E., Sargin, H., Avşar, K., Sultuybek, G., 2006. Increased glutathione conjugate transport: a possible compensatory protection mechanism against oxidative stress in obesity?. *International Journal of Obesity*, 30 (1): 134.
- Patel, C., Ghanim, H., Ravishankar, S., Sia, C. L., Viswanathan, P., Mohanty, P., Dandona, P., 2007. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor- $\kappa$ B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (11): 4476-4479.
- Savini, I., Catani, M., Evangelista, D., Gasperi, V., Avigliano, L., 2013. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (5): 10497-10538.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192-205.
- Serra, D., Mera, P., Malandrino, M. I., Mir, J. F., Herrero, L., 2013. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 (3): 269-284.
- Sherratt, P.J., Hayes, J.D., 2002. Glutathione S-transferases. In Ioannides, C. (ed), *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. Wiley & Sons, Chichester: pp 319-352.
- Sies, H., Stahl, W., Sevanian, A., 2005. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *The Journal of Nutrition*, 135 (5): 969-972.
- Thomas, N. O., Shay, K. P., Kelley, A. R., Butler, J. A., Hagen, T. M., 2016. Glutathione maintenance mitigates age-related susceptibility to redox cycling agents. *Redox biology*, 10: 45-52.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 145-155.
- Tran, B., Oliver, S., Rosa, J., Galassetti, P., 2012. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Experimental Diabetes Research*, 2012: 7.
- Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., Saha, S., 2017. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14 (4): 435.

- Vincent, H. K., Taylor, A. G., 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International Journal of Obesity*, 30 (3): 400.
- Warolin, J., Coenen, K. R., Kantor, J. L., Whitaker, L. E., Wang, L., Acra, S. A., Roberts, J., Buchowski, M. S., 2014. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. *Pediatric Obesity*, 9 (1): 43-52.
- World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, World Health Organ Tech Rep Ser, 2000; 894: 1-253.
- Yang, Z., Yu, Y., Yao, L., Li, G., Wang, L., Hu, Y., Wei, H., Hammami, R., Razavi, R., Zhong, Y., Liang, X., 2011. DetoxiProt: an integrated database for detoxification proteins. *BMC Genomics*, 12 (3): 2-8.
- Yilmaz, C., Iscan, M., 2014. Glutathione S-transferase activities and glutathione levels in needles of drought stressed *Pinus Brutia* Ten. trees. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39 (2): 238-243.

DRAFT

## Mikroplastikler

Esra Tınmaz Köse

Namık Kemal Üniversite, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Çorlu/Tekirdağ/Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: etinmaz@nku.edu.tr

### Özet

Mikroplastikler, aşırı plastik kullanımı ve yetersiz atık yönetimi gibi nedenlerden dolayı önemli bir kirletici grubunu oluşturmaktadır. Bu çalışma kapsamında, mikroplastiklerin çeşitleri, özellikleri, kaynakları, bulunduğu ortamlar ve bu ortamlarda bulunma şekilleri ve çevresel etkileri değerlendirilmiştir. Mikroplastiklerin çeşitli ortamlardaki miktarlarına ait literatür bilgileri özetlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Deniz, mikroplastik, plastik, sediment.

### Microplastics

#### Abstract

Microplastics are an important group of pollutants due to excessive plastic use and insufficient waste management. Within the scope of this study, the types, properties, sources, environments and environmental impacts of microplastics were evaluated. The literature of microplastics in various media were summarized.

**Keywords:** 3-6 words.

### MİKROPLASTİKLER, KAYNAKLARI VE ÖZELLİKLERİ

1950'de başlayan plastik üretimi gün geçtikçe hız kazanmıştır ve günümüzde her ne kadar önüne geçilmeye çalışılıyor olsa da üretimi devam etmektedir. Günümüzde 5 milyar tonu aşmış durumda olan plastik üretiminin 2050 yılında 33 milyar tona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Saliu ve ark, 2018). Aşırı plastik kullanımı ve yetersiz atık yönetimi gibi nedenlerden dolayı plastikler önemli bir kirletici grubunu oluşturmaktadır.

Boyutları 5 mm'den küçük olan plastikler mikroplastik (MP) olarak adlandırılmaktadır (Guo ve Wang, 2019; Sun ve ark, 2019; Mikroplastik Araştırma Grubu, 2019). Mikroplastiklerin kaynakları incelendiğinde birincil (primer) kaynakların direkt mikroplastik olarak üretilen plastikler olduğu görülmektedir. Bu grup mikroplastikler özellikle aşındırıcı özelliklerinden dolayı, şampuanlar, deterjanlar ve kozmetik ürünler gibi sıklıkla tüketilen ürünlerde bulunmaktadır. Bu gruptaki plastikler genellikle polietilen, polipropilen, polietilentereftalat, veya naylondur. İkincil (sekonder) grup mikroplastikler ise büyük boyutlu plastiklerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla parçalanması sonucu oluşmaktadır. Giysi, halı ve battaniye gibi tekstil ürünlerinden kaynaklanan sentetik tekstil lifleri, araç lastiklerinden ve diğer plastik ürünlerden kaynaklanan kırıntı ve döküntüler, ikincil kaynaklara örnek olarak verilebilir. Şekil 1'de mikroplastikler ve kaynaklarına ait çeşitli görseller verilmiştir. Tablo 1'de ise mikroplastiklerin kaynakları, tipleri, şekilleri ve aşınma durumları özetlenmiştir (Yurtsever, 2015).

Plastik polimerler güneşe maruz kalma, ısıyla yaşlanma, biyofilm büyümesi ve oksidasyon gibi nedenlerle bozularak mikroplastikleri oluştururlar. Bozunma, fotokimyasal, termal, biyo ve termo-oksidatif bozunmayı ifade eden kimyasal reaksiyonlar serisi olarak ifade edilir. Bozunma sonucunda plastiklerin renk, morfolojik yapı, kristallik, partikül boyutu ve yoğunluk gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir (Guo ve wang, 2019).

Mikroplastikler, havada, toprakta, tatlı su kaynaklarında, deniz ortamlarında, sedimentlerde birikebilmekte ve bu ortamlarda yaşayan canlı bünyelerine kolaylıkla geçiş yapabilmektedir. Mikroplastiklerin farklı yoğunluk değerlerine sahip olmaları su yüzeyinde, su kolonu boyunca ve sedimentlerde rahatlıkla bulunabilmelerine neden olmaktadır (Yurtsever, 2015). Mikroplastiklerin su ortamına geçişi Şekil 1'de gösterilmiştir (Mazıoğlu, 2018)





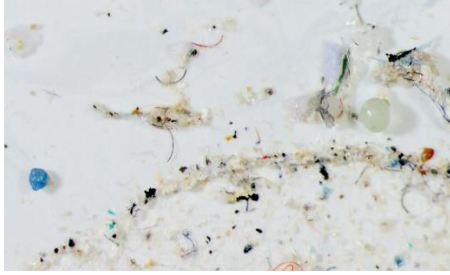
Kaynak: URL-1



Kaynak: URL-2



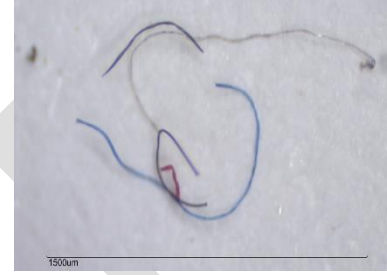
Kaynak: URL-3



Kaynak: URL-4



Kaynak: URL-5



Kaynak: URL-6

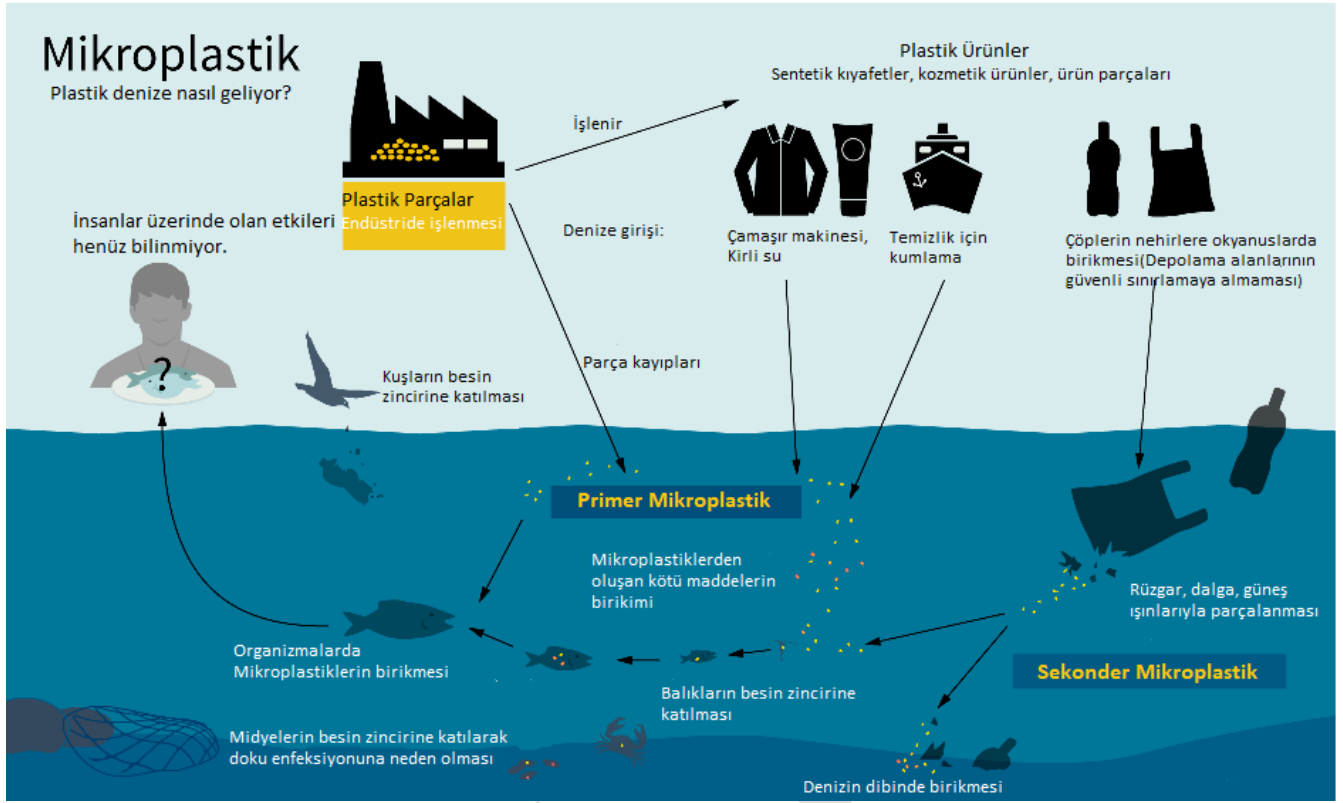
Şekil 1. Mikroplastikler ve Kaynakları

Tablo 1. Mikroplastiklerin Kaynakları ve Çeşitli Özellikleri

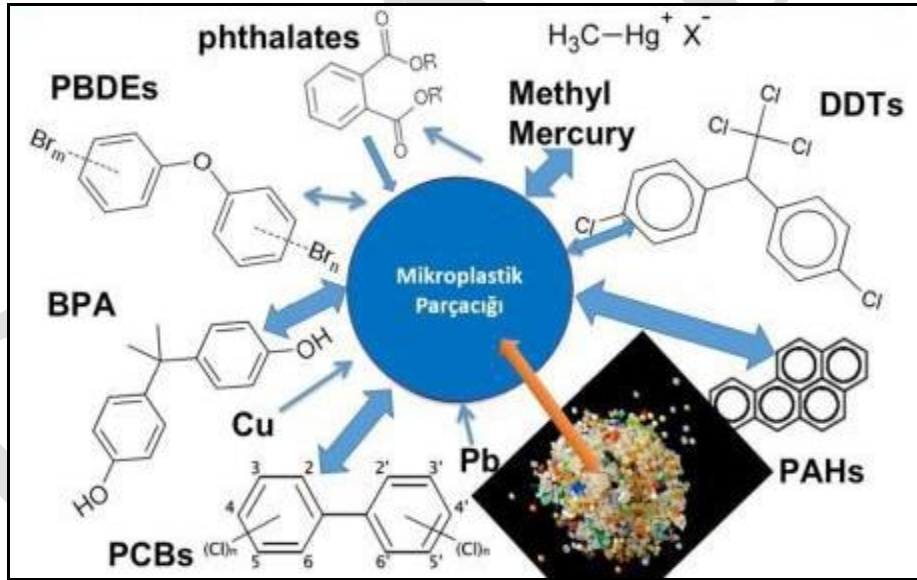
Kategoriler	Mikroplastikler
Kaynakları	<ol style="list-style-type: none"><li><u>Tüketici ürünlerinden kaynaklananlar</u>: Kozmetiklerdeki mikroboncuklar; yüz temizleme ve peeling jelleri, şampuan ve sabunlar, diş macunu, eyeliner, rimel, dudak parlaticısı, deodorant ve güneş kremleri.</li><li><u>Tekstil ürünleri</u>: Kıyafetlerde vb. kullanılan polyester, polyamid (nylon) ve polar tekstil malzemeler</li><li><u>Endüstriyel hammaddeler, artıkları ve döküntüleri</u>: Plastik üretim, işleme ve şekillendirme işlemlerinden</li><li><u>Ulaşım dan kaynaklananlar</u>: Araç lastiği döküntüleri</li></ol>
Tipi	Plastik parçacıkları, peletler, iplik-lifler, plastik filmler, köpüklü plastikler, granüler plastikler, straforlar
Şekilleri	<u>Pelet şeklinde olanlar</u> : Silindirik, diskler, düz, oval, küresel <u>Parça şeklinde olanlar</u> : Yuvarlak, yarı yuvarlak, köşeli, yarı köşeli <u>Genel</u> : Şekilsiz, uzun, parçalanmış, pürüzlü ve kırık kenarlı
Aşınma durumu	Yeni, bozunmamış, pürüzlü yüzey, pürüzlü parçacıklar, doğrusal kırıklar, yarıparalel çıkıntılar, yeni başlayan değişim ve çizik düzeyi (konkoidal kırıklar), oyuklu, pürüzsüz yüzey, bozunmuş ve çok bozunmuş olanlar.
Renk	Transparan (şeffaf), kristalin, beyaz, açık-beyaz-krem, kırmızı, turuncu, mavi, opak, siyah, gri, kahverengi, yeşil, pembe, ten rengi, sarı, ve pigmentasyon

### MİKROPLASTİKLERİN ÇEVRESEL ETKİLERİ

Mikroplastikler, dioksinler, PCB'ler, organoklorlu pestisitlerin bazı türleri, DDT'ler ve HCH'ler polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHlar) heksakloro benzen (HCBler) gibi kalıcı organik kirleticileri kolaylıkla absorplayabilmektedir. Mikroplastiklere bağlanabilen bazı toksik maddelere ait bir görsel Şekil 2'de verilmiştir (URL-8).



Şekil 1. Mikroplastiklerin Su Ortamına Geçişi



Şekil 2. Mikroplastiklere Bağlanan Bazı Kimyasallar

Mikroplastilerin canlı bünyesine girmesi MPlerce absorblanmış kirleticilerin de canlı bünyesine girmesine neden olmaktadır. Canlıların mikroplastiklere maruz kalması üreme ve gelişme özellikleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Su ortamındaki canlılarca yutulan mikroplastiklerin birincil üreticiden yırtıcılara doğru besin zinciriyle taşınması ve canlı bünyesinde birikimi (Biyoakümülyasyon, biyomagnifikasyon) mümkün olabilmektedir. Mikroplastiklerin besin zinciri ile taşınımı insanlarda son bulur. (Çatalbaş).

MP içeren sular ile yapılan sulama, MP içeren gübreleme uygulamaları, havadan karışma vb. etkilerle MP'lerin toprak ortamına karışması olasıdır. Gerek bu ortamda yetiştirilen ürünlerin besin zinciriyle canlılara ulaşması yoluyla gerekse bu ortamlarda yaşayan canlıların doğrudan etkilenmesi mümkündür. Havada bulunan mikroplastiklerin canlılarca yutulması ise MP'lerin canlı bünyesine girmesinin diğer bir yoludur (Denizli ve Yavuz, 2017).

2017 yılında yapılan bir çalışmada Avrupa’da yaşayanların gıdalar vasıtasıyla bünyelerine giren mikroplastik parçası sayısının 11 bin olduğu, bu parçaların %99’u sindirim sisteminden geçtikten sonra dışarı atıldığını %1’inin ise vücut tarafından tutulduğu ortaya konmuştur. Çalışmada bu rakamlara sular vasıtasıyla alınan mikroplastiklerin dahil olmadığı da belirtilmiştir (URL-8).

## ÜLKEMİZ’DEKİ VE DÜNYA’DAKİ MEVCUT DURUM

Her yıl dünya çapında okyanuslara yaklaşık 13 milyon ton plastik girmektedir (Paradinas vd, 2018). Okyanuslara atılan plastik miktarının 2025 yılında 250 milyon tona ulaşabileceği tahmin edilmektedir (URL-7, 2019). Okyanuslardaki mikroplastiklerin kaynakları incelendiğinde, sözkonusu plastiklerin % 20’sinin denizlere doğrudan döküldüğü, % 80’nin ise katı atıklar ve evsel atıksular gibi kara kökenli kirleticilerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Okyanuslara atılan plastik miktarının 2025 yılında 250 milyon tona ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Marmara Denizi’nde yapılan bir çalışmada, deniz yüzeyindeki ve kıyılardaki atıkların yaklaşık olarak %40’nun PET ve naylon poşetlerden oluştuğu ortaya konulmuştur (Tımmaz Köse ve Doğan, 2018). Tek bir plastik malzemenin bile parçalanarak milyonlarca mikroplastik parçacığa dönüştüğü düşünüldüğünde deniz ortamına ulaşan plastiklerin ne kadar önemli olduğu oldukça net bir şekilde görülebilmektedir.

Dünya Doğayı Koruma Vakfı tarafından hazırlanan Plastik Kapanından Çıkış: Akdeniz’i Plastik Kirliliğinden Kurtarmak” başlıklı raporda, Çin’den sonra dünyada en fazla plastik üretilen bölgenin Avrupa olduğu ve burada üretilen 27 milyon ton plastiğin sadece üçte biri dönüştürülebildiği belirtilmiştir. Rapor, dünyanın en çok ziyaret edilen bölgelerinden biri olan Akdeniz’deki atıkların %95’ini plastik maddelerin oluşturduğunu atıkların her yıl %40 arttığını ve Akdeniz’e en çok plastik atığın Türkiye’den (144 ton/gün). Atıldığını ortaya koymuştur. Türkiye’yi İspanya (126 ton/gün), İtalya (90 ton/gün), Mısır (77 ton/gün) ve Fransa (66 ton/gün) takip etmektedir. Akdeniz sahillerinde 2016 yılında yapılan bir çalışmada, 28 türe ait 1137 balığın yarısından fazlasının sindirim sisteminde mikroplastik bulunduğu kaydedilmiştir (Aslan, 2018).

Şehirleşmiş bölgelerde yoğun olarak rastlanmakla birlikte mikroplastikler kırsal bölgelerde ve hatta yerleşimden oldukça uzakta yer alan dağlık alanlarda bile gözlemlenebilmektedir. Free vd. tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada Moğolistan’daki Hovsgol Gölünden (Free vd., 2014) ve Zhang vd. tarafından 2016 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise Tibet Platosu’ndaki göllerden (Zhang vd., 2016) alınan su örneklerinde önemli miktarda mikroplastik ölçülmüştür.

Fransa’daki Sen Nehri üzerindeki üç noktada, yüzeyden itibaren 15 cm ve 50 cm derinlikten alınan su örneklerinde ölçülen MP konsantrasyonlarının 1,7- 45 parçacık/m<sup>3</sup> arasında olduğu kaydedilmiştir (Alligant vd, 2018).

İngiltere’deki Trent Nehri’ndeki yedi lokasyondan alınan 28 su örneğinde yaklaşık 1333 mikroplastik (6.2 mikroplastik/l) ve 132 cm<sup>3</sup> sedimentte ise 3,2 mikroplastik bulunmuştur (Osborne ve Claire Gwinnett, 2018). Yurtsever vd.’nin bir çalışmasında mikroplastik lifler yere çökelebildiği, rüzgâr ve hava akımlarının etkisiyle havaya doğru sürüklenebildiği, havada askıda kalabildiği ve hatta solunum yoluyla akciğerlerine kadar girebildiği belirtilmişti. MP’lerin solunması durumunda akciğerlerde iltihap da dahil olmak üzere lokalize biyolojik tepkilere neden olabilmektedir (Gasperi ve diğ., 2018).

Çek Cumhuriyeti’ndeki içme suyu amacıyla kullanılan ham suda ve arıtılmış suda yapılan MP ölçümleri üç farklı arıtma tesisinde gerçekleştirmiştir. Ham su numunelerinde 1473 ± 34, 1812 ± 35 ve 3605 ± 497 parçacık/l ve aynı sırayla arıtılmış su numunelerinde ise 443 ± 10, 338 ± 76 ve 628 ± 28 parçacıklar/l MP ölçülmüştür. Her ne kadar %83 oranında bir giderim sağlanıyor olsa da içme suyunda önemli miktarda MP kaydedilmiştir (Alligant vd, 2018).

Farklı ortamlarda mikroplastiklerin durumunun ortaya konulması amacıyla yapılan çalışmalardan bazıları Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Literatür Özeti

Yer	Numune	Numune/lokasyon Sayısı	Bulgular/ölçülen değerler	Kaynak
Cienfuegos Körfezi, Küba	Deniz suyu	Kurak dönem: 12 Yağışlı dönem: 16	Kurak dönem: 49562,5 mikroplastik/m <sup>3</sup> (3000 and 581500 mikroplastik/m <sup>3</sup> ) Yağışlı Dönem: 5093.75 mikroplastik /m <sup>3</sup> (0- 10500 mikroplastik/m <sup>3</sup> )	García-Chamero ve ark, 2018
Spanish Western Mediterranean	Deniz suyu	22	18 farklı tipte sentetik polimer gözlenmiştir. En sık rastlanan türler: Düşük yoğunluklu polietilen (LPDE), yüksek yoğunluklu polietilen HDPE, PP	García-Chamero ve ark, 2018

			Sık rastlanan renkler: Beyaz, mavi, yeşil ve şeffaf	
Türkiye	Evsel atıksu arıtma tesisi	İki tesis: Seyhan ve Yüre	Tesis girişi: 1 milyon - 6,5 milyon parçacık/gün Tesis çıkışı: 220.000 - 1.5 milyon parçacık/gün Giderim oranı: % 73-79 8 farklı polimer türünden en sık rastlanan: Polyester Ortalama MP: 746 parçacık/ yıl/hane	Gündoğdu ve ark, 2018
Rhine Nehri, Almanya	Sediment tabandan 5-7.5 m	25	En sık rastlanan türler: Acrylates/polyurethane (PUR), polystyrene (PS) ve polypropylene (PP)	Mani ve ark, 2018
Akyatan Sahili, Türkiye	Sediment	9	59,78±18,85 partikül/kg (629,43±352,6 partikül/m <sup>2</sup> )	Çevik ve Gündoğdu, 2018
Sevastopol, Karadeniz	Sediment		Maksimum (2017): Omega sahili-Mayıs: 6,9±0.3 partikül/m <sup>2</sup> Uchkuevka sahili-Ağustos: 3,5±0.1 partikül/m <sup>2</sup> Minimum (2017): Omega sahili-Ocak: 3,0±0,17 partikül/m <sup>2</sup> Uchkuevka sahili-Mayıs: 1,5±0,054 partikül/m <sup>2</sup>	Sibirtsova ve Agarkova-Lyakh, 2018
Akdeniz sahilleri (Mallorca, Sicilya, Rab, Malta, Crete, Mykonos, Rodos ve Kıbrıs)	Kum	Her adada 3 sahil Her sahilde 3 kamp yeri Her kamp yerinde 5 kum örneği	10,3 (Kıbrıs) - 809,6 (Malta) partikül/kg kuru kum	Grelaud ve ark, 2018
Kanarya Adası	Deniz		2000 madde/m <sup>2</sup> Kanarya Adaları plastik endüstrisine bulunmamakla birlikte okyanustaki sirkülasyondan kaynaklanmaktadır.	Rapp ve ark., 2018
Almanya	Atıksu arıtma tesisi	12 Atıksu arıtma tesisi	Polietilenden poliuretana kadar yedi farklı plastik türüne rastlanmıştır. En çok rastlanan: Polietilen	Mintenig ve ark., 2017
Avustralya	Atıksu arıtma tesisi	3 farklı tesisin altı ayrı noktasından	Tesislerden deşarj edilen arıtılmış sularda: 0,28, 0,48 ve 1,54 mikroplastik/l	Ziajahromi ve ark.
California, Amerika	Atıksu arıtma tesisi	7 tesis	Giriş atık su numunelerindeki mikroplastik miktarı: 1 MP/l Çıkış atık su numunelerindeki mikroplastik miktarı: atık su ve 0,9 MP/l atık su En çok rastlanan: Mavi polietilen	Carr ve ark.

## SONUÇ

Mikroplastikler her türlü çevresel ortamda kolaylıkla bulunabilmekte ve bulunduğu ortamı ve o ortamda bulunan canlıların yaşamsal faaliyetlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Buna rağmen henüz yasal mevzuatlarda yerini alamamıştır. Mikroplastiklerin çevresel etkilerinin ortaya konabileceği çalışmaların teşvik edilmesinin mevcut sorunun çözümü yolunda önemli bir adım olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında yapılan incelemeler doğrultusunda, mikroplastiklerin oluşumunun önlenmesi, kaynaktan azaltım sağlanması ve giderim/arıtım yöntemlerine ait zorunlulukların mevzuatta yer almasının uygun bir yaklaşım olacağı kanısı uyanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aslan R 2018. *Mikroplastikler: Hayatı kuşatan yeni tehlike*, Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi Ayrıntı, 6(66): 61-67.
- Aslan R, 2018. *Mikroplastikler: Hayatı kuşatan yeni tehlike*. Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi Ayrıntı 6(66): 61-67.
- Alligant S, Gasperi J, Gangnery A, Maheux F, Simon B, Halm-Lemeille MP, El Rakwe M, Dreanno C, Cachot J, Tassin B 2018. *Concentrations and morphology of microplastics in the seine river estuary*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Carr SA, Liu J, Tesoro AG 2016. *Transport and Fate of Microplastic Particles in Wastewater Treatment Plants*, Water Research 91: 174-182.
- Çatalbaş F. *Mikroplastiklerin su ortamına ve canlılara etkileri*, <https://slideplayer.biz.tr/slide/9225383/> [Erişim 05.06.2019]
- Çevik C, Gündoğdu S 2018. *Microplastic pollution of the Akyatan Beach one of the most important sea turtle nesting area at NE Mediterranean Coasts of Turkey*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.  
[https://www.bioreglab.org/site/assets/files/1724/gu\\_nce\\_kasim\\_2017.pdf](https://www.bioreglab.org/site/assets/files/1724/gu_nce_kasim_2017.pdf), [Erişim 05.06.2019].
- Free CM, Jensen OP, Mason SA, Eriksen M, Williamson NJ, Boldgiv B 2014. *High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake*. Marine Pollution Bulletin, 85(1): 156-163.
- García-Chamero A, Alonso-Hernández C, ChameroLago D 2018. *Microplastics in sea water of Cienfuegos bay, Cuba*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Gasperi J, Wright SL, Dris R, Collard F, Mandin C, Guerrouache M, Langlois V, Kelly JF, Tassin B 2018. *Microplastics in air: Are we breathing it in?* Current Opinion in Environmental Science & Health, 1: 1-5.
- Grelaud M, Simon L, Ziveri P 2018. *Accumulation of microplastics on sandy beaches of Mediterranean islands as an effect of tourism*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Denizli A, Yavuz H, 2017. *Mikroplastikler ve Dünyamız*, TÜBA GÜNCEL, 64, Eylül 2017.
- Guo X, Wang J 2019. *The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review*. Marine Pollution Bulletin, 142: 1-14.
- Gündoğdu S, Çevik C, Guzel E, Kilercioglu S 2018. *Microplastics in the municipal wastewater treatment plants at Turkey: Comparison of the influent and secondary effluent concentrations*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Mani T, Lorenz C, Primpke S, Gerdt G, Burkhardt-Holm P 2018. *High Concentrations of Microplastics in the Bed Sediments of the Rhine River*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Mazioğlu M 2018. *Nedir bu mikroplastikler?* TUBİTAK Bilim ve Teknik Aylık Popüler Bilim Dergisi, Aralık 2018
- Mintenig SM, Int-Veen I, Löder MGJ, Primpke S, Gerdt G. 2017. *Identification of microplastic in effluents of wastewater treatment plants using focal plane array-based micro-fourier-transform infrared imaging*. Water Reserach, 108:365–72.
- Mikroplastik Araştırma Grubu, Mikroplastik nedir? Available atÇ <http://www.mikroplastik.org/index.php/tr/mikroplastik/mikroplastik-nedir-1.html> [Erişim 13.05.2019]
- Osborne A, Gwinnett C 2018. *Microplastic pollution in the River Trent UK, and the use of EASYLIFT to optimise microplastic recovery*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Paradinas L, James N, Quinn B, Dale A, Narayanaswamy B 2018. *Distribution of microplastics along the Scottish coastline using standardized sampling and extraction methods*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Rapp J , Herrera A, Packard T, Gómez M 2018. *Microplastic pollution on Gran Canaria island beaches*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Saliu F, Montano S, Garavaglia MG, Lasagni M, Seveso D, Galli P 2018. *Microplastic and charred microplastic in the Faafu Atoll, Maldives*, Marine Pollution Bulletin, 136: 467-471.

- Sibirtsova E, Agarkova-Lyakh I 2018. *Microplastics pollution on the beaches at the northern Black Sea coast during the monitoring of beaches sediments in 2016–2018*, Micro2018 International Conference, Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions, 19-23 Kasım 2018, Lanzarote.
- Sun J, Dai X, wang Q, Loosdrecht MCM, Ni BJ 2019. *Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal*, Water Research, 152: 21-37.
- Tınmaz Köse E, Doğan NB, 2019. *Characterization of Marine Debris in Marmara Sea*. Fresenius Environmental Bulletin, 28(2A/2019), 1287-1296.
- URL-1, <https://www.yesilist.com/mikroplastik-nedir-abdde-neden-yasaklandi/>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-2, <https://www.empa.ch/web/s604/mikroplastik>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-3, <https://bilimdili.com/doga-cevre/canli/yedigimiz-her-balikla-ayni-anda-mikroplastik-tuketiyoruz-turkiye-deniz-kirliligi/>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-4, <https://www.dieoption.at/tr/insanlarda-uni-vienna-mikroplastikler-tespit-edilmi%C5%9Ftir/>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-5, <https://yesilgazete.org/blog/2018/10/21/turkiyede-incelenen-sofra-tuzlarinin-tamaminda-mikroplastige-rastlandi/>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-6, <http://www.waterkeeper.ca/blog/2016/9/8/microfibres-the-microplastic-causing-macro-problems-in-global-waters>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-7, PAGEV, 2019. <https://www.pagev.org/deniz-atiklari/>, [Erişim 03.06.2019].
- URL-8, <https://bianet.org/bianet/saglik/195299-insan-bedeni-kas-kemik-ve-mikroplastikten-olusur>, [Erişim 05.06.2019]
- Yurtsever M 2015. *Mikroplastikler'e genel bir bakış*, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Fen Ve Mühendislik Dergisi, 17-2(50): 68-83.
- Zhang K, Su J, Xiong X, Wu X, Wu C, Liu J 2016. *Microplastic pollution of lakeshore sediments from remote lakes in Tibet plateau*. Environmental Pollution, 219:450-455.
- Ziajahromia S, Neale PA, Rintoul L, Leusch FDL 2017. *Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: development of a new approach to sample wastewater-based microplastics*, Water Research, 112:93–9.

## Design of biogas system with industrial symbiosis thematic area for clean energy

Murat Şahin

Ahi Evran University, Faculty of Engineering, Department of Mechanical Engineering, Kırşehir

Corresponding author e-mail: murat.sahin@ahievran.edu.tr

### Abstract

Development of new generation domestic biogas reactor production with industrial symbiosis thematic and burning techniques. New generation domestic biogas producer with 10 m<sup>3</sup> / day capacity obtained from anaerobic fermentation of organic materials is burned in a conventional combustion system. Combustion system is developed and a domestic software is developed to control methane generation (%) of bacteria in the biogas generator. It is aimed to disseminate alternative uses of biogas, which can contribute to the national economy, especially in rural areas. This combustion system is used in rural areas where abundance of biomass is abundant and is enabled the progress of the country on the incineration technologies and the incineration of the gaseous fuels even in places where the incineration systems is accelerated the harmony and never reach the natural gas.

**Keywords:** Clean energy, biogas, biogas reactor, anaerobic fermentation, Industrial symbiosis

### INTRODUCTION

The growing interest in the use of biogas has promoted nowadays. Biogas arising from effluent, municipal solid waste, residuals, gasification of biomass are very appropriate for power generation, heating systems and elsewhere. In addition to the studies on the combustion characteristics of the obtained biogas, there are some studies on the process of obtaining the biogas. For example, Teng et al. [1] conducted studies on the development of biogas reactors in terms of chemical engineering, numerical modeling of biogas reactor design and optimization. Lindmark et al. [2] carried out both experimental and numerical studies on the homogenisation of feeds from the active microbial community by the separation of solids in the anaerobic digester mixing and decomposition content. In S .arapatka [3], the farm manure was subjected to anaerobic fermentation in an airtight digester for about 30 days and obtained biogas. Biogas consists chiefly of methane and carbon dioxide as well as it has a trace amount of nitrogen, hydrogen sulphur and oxygen depending on production or gasification methods (Dirkse, 2018). Methane in biogas has high amount of energy as major component of natural gas. However, the other components are non-combustible.

In this study, a burner and a combustion chamber, which can burn biogas obtained from animal wastes, is aimed to give the country a local and national combustion system that can use its own source.

This combustion system is used in rural areas where abundance of biomass is abundant and is enabled the progress of the country on the incineration technologies and the incineration of the gaseous fuels even in places where the incineration systems is accelerated the harmony and never reach the natural gas.

Considering seasonal changes, the farmer who makes an animal breeding with 100 bovine animals is provided 70 m<sup>3</sup> of biogas from daily average biogas production. The house of the farmer and the heating of the employees' houses are on average 9 tons of coal per year. And that's enough to cover the need for warmth of a few rooms, not all living spaces in the house. At the same time, the average gas demand of the farmers and their employees in the kitchen is about 15 tubes per month. Farmer needs alfalfa and cereal for animal husbandry the required liquid and solid fertilizer is still be able to meet the outputs from this biogas producer after the process. This solid and liquid fertilizer acquisition is increase the annual gain of the farmer.

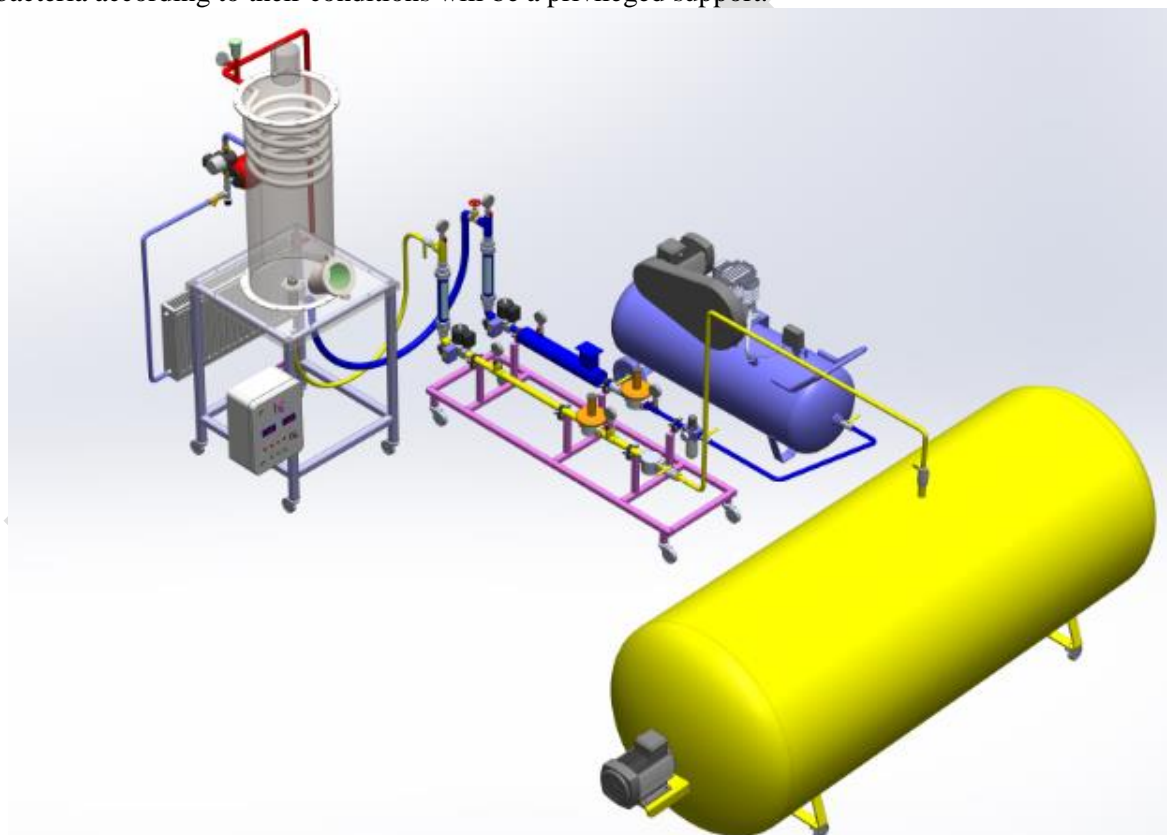
### BIOGAS SYSTEM

Conventional natural gas burners used today include an innovative aspect in the production of a new type of burner to burn efficiently the biogas which is considered to be burned in operation and to produce anaerobic fermentation-end resultant biogases. The fact that the cross sections of conventional natural gas burners are

not suitable, This is why the new biogas burner is redesigned and manufactured depending on the biogas content produced (this is directly affect the thermal value and the density). This experience has been clearly demonstrated in the doctoral work carried out by me, it has been determined that the existing natural gas burners are not very suitable for biogas. The planned biogas burner has both air and gas turbulence sections, theoretical flow rates, the len is recalculated in accordance with the biogas content and the design. In addition, the system is proactively controlled with a developed local software. This control system is ensured to follow the ratio of the methane level in the biogas and the ordering method will be suitable for manufacturing.

All these mentioned processes is realized by using domestic and national resources and thus it is aimed to reduce the dependency of natural gas in time. If the technology level of the business idea is evaluated, a new biogas burner design and production of a burner is realized.

Biogas production, which is a biogas source, directly affects the content of biogas, which is a necessity for designing a correct and innovative biogas burner. The new type of biogas burner intended for use in the combustion of biogas is the natural gas and biogas burners currently in use the most important difference is that the cross sections of natural gas burners are not suitable. Biogas burners in use in the present case, however, it is not. In addition, one of the most important parameters to ensure that the flame in any burner is stable is the swirl number of the burner. In biogas burners that are currently in use, this important parameter is not taken into account for the biogas, and this leads to a badness in the biogas flame, the biogas burner that is thought to be newly manufactured is compete with the natural gas and biogas burners currently in use and is become an indispensable product of the market over time. The consultancy service on the bacteria providing the formation of the methane used in the biogas plants, providing consulting services on the suitability and compliance of the bacteria according to their conditions will be a privileged support.



**Figure 1.** The view of biogas system solid model

## RESULTS AND DISCUSSION

The diffusion of the use of biogas and the outsourcing of natural gas are alternatively reducing energy dependency. The production and design of the combustion chamber is directly proportional to the capacity of the burner to be used. Even if a stable flame-trapped biogas burner is manufactured, even if a combustion chamber large enough for the burner capacity is used, the combustion chamber surface temperature cannot reach the targeted values, the water in the serpentine wrapped around the combustion chamber will not be



transferred efficiently. For this reason, combustion chamber of the size-diameter ratio appropriate to the capacity to be produced will be designed and manufactured.

In order to benefit from the support, grants and incentives of livestock sectors, such as municipalities, OICs and NGOs, it is possible to sell the equipment and tools in this product's incineration system one by one. These sales will increase the sustainability of the company.

In the regional development strategies, sustainability will be ensured by increasing the target mass in product sales by providing awareness of the end user of public grants and supplements of all equipment for the establishment of biogas, domestic and national facilities to be obtained by the use of animal wastes. Thus, farmers and local governments who want to use this product will be able to reduce their initial investment costs and will not face the high costs of using this system. This will also increase the contribution to the product market.

Among the most important problems of cattle fattening farms in our country are solid and liquid wastes belonging to these animals. In general, it has been tried to be disposed of by being stored outside for a long time with wild storage method. As a result, liquid wastes have caused pollution of soil and groundwater in various ways. Besides this, rodents, insects, fragrance pollution and fly production also created a separate problem. These negative effects will be removed when the output of the product is to be obtained from solid and liquid equinoxes, which are needed by the majors in the bass work. Although recently, medium-sized wet system biogas plants have been established in our country, the problem of small-scale family businesses still remains to be solved.

## **CONCLUSIONS**

It is expected that new generation household biogas generators will be able to be used as an alternative to natural gas and LPG, especially in rural areas, and that the domestic source biogas can be used as an alternative and reduce the natural dependency on the environment. In addition, a combustion system capable of burning the biogas obtained by fermentation from the organic substances in the study is developed. In addition, due to the new design of the new generation domestic biogas generator, which is designed, there is also a potential output of the resulting patent / utility model for these burners to successfully and efficiently burn biogas with large thermal value and density range to burn.

Among the most important problems of cattle fattening farms in our country are solid and liquid wastes belonging to these animals. In general, wastes are stored outside in soil by wild storage method and they have been tried to be disposed for a long time. As a result, liquid wastes have caused pollution of soil and groundwater in various ways. In addition, rodents, insects, odor pollution and fly production have also created a separate problem.

Although recently, medium-sized wet system biogas plants have been established in our country, the problem of small-scale family businesses still remains to be solved.

With this study, we eliminate these problems with the commercial prototype that is planned to be produced by us, but the operating costs are reduced to the minimum and a side-effect disposal system is established.

Biogas generators are not yet commercially produced and sold in our country, except for domestic use which is easy to use and well maintained, domestic design and manufacturing, horizontal type semi-wet anaerobic mesophilic and / or thermophilic bacteria. For large farms abroad, 1000-10000 cubic meters / day capacity is available for commercial production and use. Mesophilic and / or thermophilic bacteria producing microbial methane is isolated in our country.

Methane formation inhibitors such as pH, temperature, ammonia formation in the generator is available for intervention in sudden changes to be monitored by computerized computer control. Maintenance, repair, spare parts service management will be provided locally. The study is completed, the study is applied to the farms demanding commercial prototypes, both the environmental damage and the biogas is eliminated and the solid and liquid wastes are obtained from the solid and liquid wastes. An improvement is provided.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The author thank to TÜBİTAK for the support of this study.

## **REFERENCES**

- [1] Teng, Z; Hua, J; Wang, C; Lu, X, Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology, (First Edition) USA: Elsevier, 99-110, 2014.
- [2] Lindmark, J; Thorin, E; Fdhila, R. B; Dahlquist, E, Effects of mixing on the result of anaerobic digesiton: Review, Renewable and Sustainable Energy Reviewes, 40, 1030-1047, 2014.
- [3] Šarapatka, B, Factors influencing biogas production during full-scaleanaerobic fermentation of farmyard manure, Bioresource Technology, 49, 17-23, 2003.

DRAFT

## Using of advanced oxidation methods in industry

Aslı Akyüz\*, Yeliz Aşçı

Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Engineering and Architecture, Chemical Engineering, Eskişehir, Turkey

\* Corresponding author e-mail: yelizbal26@gmail.com;yelizbal@ogu.edu.tr

### Abstract

As a result of production activities that increase with industrialization, negative effects on the environment have become a threat to clean environment. However, the fact that water resources are not infinite has made it necessary to search for alternative water resources for use in industries. For this reason, researches has gained momentum in the treatment of wastewater generated as a result of production, rendering it harmless, and recycling and reusing it in production. In recent years, conventional methods have not been able to remove the pollution in wastewater and rising costs due to removal of wastewater have led enterprises to use advanced treatment technologies. Among the advanced treatment methods, advanced oxidation processes, which have lower operating problems and provide higher treatment efficiency than other advanced treatment methods, have come to the forefront among other methods in the treatment of industrial waste water in recent years. Advanced oxidation processes are preferred in comparison to others because they are efficient, have a wide range of uses and are non-selective. Advanced oxidation processes are used to convert pollutants into CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O or intermediate products that are easy to remove by biodegradation and adsorption. The most common advanced oxidation processes are; Ozonation (O<sub>3</sub>), Ozone - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process, Ozone - UV process, Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Fe<sup>+2</sup>) process with Foto - Fenton (UV - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Fe<sup>+2</sup>) oxidation.

**Keywords:** Waste Water Treatment, Advanced Oxidation, Fenton, Ozonation

### INTRODUCTION

In order not to cause environmental problems in the receiving environment where the wastewater generated as a result of industrial production is discharged, they need to be treated to meet the discharge criteria given in the Water Pollution Control Regulation. It is very important to reduce the organic substances, solids, nutrients and other pollutants contained in the wastewater to the desired level by various treatment methods. In our country where water shortage is experienced, the recovery and re-use of wastewater after treatment to the discharge criteria will provide great benefits to enterprises and our country. The reuse of the treated water obtained by recycling the wastewater generated by the production activities in the industry is important in terms of reproduction of the existing clean water sources with the provision of additional and reliable water resources, and the reduction of water consumption and waste water formation and waste water treatment costs. Recently, inadequate traditional treatment methods to reach wastewater discharge standards, industrial wastewater removal efforts and increasing costs have led industries to research on more effective water management practices. These researches show that advanced treatment technologies are needed for the recovery and reuse of waste water. In addition, among the advanced treatment methods, advanced oxidation processes, which create less operating problems and provide higher treatment efficiency compared to other advanced treatment methods, are among the preferred methods in the treatment of industrial wastewater in recent years (Kılıç and Kestioğlu, 2008).

### Advanced Oxidation Methods in Industry

High oxidation processes are highly efficient, have wide usage areas and are not selective. Advanced oxidation processes provide for the removal of toxic and biodegradable organic materials into harmless forms. Advanced oxidation processes have been found to be effective in removing many organic pollutants. (Akbal and Balkaya, 2002). In advanced oxidation, hydroxyl radicals (OH<sup>·</sup>) are formed which have very high oxidation properties. Hydroxyl radicals react selectively with organic and inorganic chemicals present in water. Therefore, it is a strong oxidant for pollutants that are resistant to degradation by other processes (Sedlak and Andren, 1991).

**Table 1.** Standard oxidation potential of some oxidants

Oksidan	Standart oksidasyon potansiyeli (volt)
Flor	3.03
Hidroksil radikal	2.80
Atomik oksijen	2.42
Ozon	2.07
Hidrojen peroksit	1.77
Hipokloröz asit	1.49
Klor	1.36
Brom	1.09

As shown in Table 1, although the oxidant having the highest oxidizing power is fluorine, it is not preferred in wastewater treatment due to its fluorine toxic effect. Therefore, it is considered the most powerful oxidant ( $\text{OH}^\cdot$ ). The efficiency of the advanced oxidation process to be used for the pollutant is related to ( $\text{OH}^\cdot$ ) production efficiency (Kitis et al., 2009). Properties of hydroxyl radical; They are easy to form, high reactive, strong oxidant, non-selective, harmless and short-lived (Buthiyappan et al., 2015).

### Water Quality Parameters Affecting IOP Efficiency

**Alkalinity:** Non-selective hydroxyl radicals also oxidize organic and inorganic compounds other than the target contaminants. Both carbonate and bicarbonate consume hydroxyl radicals, resulting in carbonate radicals. These carbonate radicals can also react with organic and inorganic pollutants, but the reaction rates are very low.

**Natural organic matter (DOM):** Natural organic matter is a heterogeneous mixture of organic substances such as macro-molecular structures, small molecular weight hydrophilic acids, fats, proteins, amino acids, carbohydrates. Organic materials in water deplete hydroxyl radical, resulting in reduced oxidation process efficiency. As the concentration of natural organic matter is high, the removal efficiency of the target pollutant is reduced as it reduces the amount of ( $\text{OH}^\cdot$ ) formed. If there is a high proportion of natural organic matter in the wastewater, more oxidant doses and longer contact time are required for an effective further oxidation process.

**Nitrate and nitrite:** As a result of UV absorption of pollutants in the water source, the production of hydroxyl radicals decreases and the oxidation efficiency decreases as less hydroxyl radicals are formed. Nitrite absorbs UV light of 230-240 nm and nitrate 300-310 nm. High concentrations of nitrate and nitrite (> 1 mg / L) significantly reduce the efficiency of UV-based advanced oxidation processes.

**Turbidity:** Excessive turbidity of the water reduces the oxidation efficiency for the advanced oxidation process using UV radiation. Turbidity reduces light transmission in water. As a result, the absorption of UV light is reduced and production is reduced in UV-based advanced oxidation processes ( $\text{OH}^\cdot$ ) (Kitiş et al., 2009).

### Application Areas of Advanced Oxidation Processes

#### Textile Industry

The wastewater of the textile industry contains highly variable contaminants, high organic matter and color pigments, depending on the dyes, textile auxiliaries and surfactants used in textile processes. The wastewater supplied to the receiving environment adversely affects photosynthetic activity by reducing the light transmittance in the aquatic environment. However, the accumulation of dyes in some aquatic organisms brings toxic and carcinogenic risks (Dokuzoğlu et al., 2008). Methods such as biological treatment, physical-chemical treatment, which are used in the treatment of textile industry wastewater, are not effective due to their low molecular weight and high solubility in water. Fenton oxidizes the hydroxyl radicals formed in the process and causes the formation of reactive and easily oxidizable compounds. Fenton process is effective in removing color and COD from textile wastewater containing different types of dye types (Gürtekin and Şekerdağ, 2008).

#### Olive Oil Industry

Although the olive oil industry produces seasonal products, the pollution characteristics of the waste water (land water) generated as a result of the production activity is quite high. The ozonation process and other advanced oxidation processes where COD and phenol removal are provided can also be used for land water. 80-90% COD removal efficiency can be obtained in the process where ozone, hydrogen peroxide and UV combination are used (Tezcan, 2010).

### **Paper Industry**

The high amount of water used in paper production and the presence of biodegradable contaminants in the waste water make the paper industry environmentally risky. Some of the pollutants (resin acids) formed in the paper industry are formed during the woodworking stages. Other pollutants are produced during the production process (phenol, dioxins). 80-85% COD and 90-95% color removal can be obtained as a result of oxidation of biological pretreatment wastewater by fenton process (Gürtekin and Şekerdağ, 2008).

### **Disinfection**

Disinfection is the most common method used in waste water treatment and clean water supply. Chlorination is the most commonly used disinfection process. However, the use of chlorine involves serious safety risks and major ecological risks. The hydroxyl radicals formed in the Fenton process cause cell surface degradation. UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> application provides effective bacterial removal and oxidation of hydroxyl radicals and pollutants even in short contact times makes this method advantageous for disinfection. Fenton process disinfection process, 99% bacteria removal can be achieved (Gürtekin and Şekerdağ, 2008).

### **Solid Waste Leachate Treatment**

Composition of solid waste leachate; Solid waste content may vary according to pH, climatic conditions and storage age. Leachate can contain various organic and inorganic ions, metals and micro pollutants. Since it is difficult to completely remove the permanent pollutants in the solid waste leachate by biological methods, advanced oxidation methods are used as the preliminary or final treatment step (Gürtekin and Şekerdağ, 2008). Fenton oxidation is used in solid waste leachate treatment. Fenton oxidation is an efficient method especially for the treatment of leachate with high storage age (Öztürk et al.).

## **CONCLUSION**

Industrialization and operation of enterprises with large production capacities bring about negative effects on the environment. As industrial production varies both in quality and quantity, industrial wastewater containing different pollutants emerges. The wastewater generated as a result of industrial production should be treated to the extent that it does not affect the environment negatively and alternative wastewater treatment methods that can meet the discharge standards to the receiving environment should be developed. Research shows that advanced treatment methods that provide higher efficiency than physical, chemical and biological treatment methods are frequently used in the treatment of industrial wastewater. In advanced treatment methods, advanced oxidation processes have a wide usage area because they complete their reactions with full mineralization at normal temperature and pressure conditions in waste water treatment. In recent years, refinement studies have focused on the newly developing advanced oxidation processes. Today, the number of studies on advanced oxidation processes such as Fenton, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV has increased significantly.

## **REFERENCES**

- Akbal, F, Balkaya N 2002. Toksik Organik Kirleticilerin Gideriminde İleri Oksidasyon Teknolojileri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, <https://dokumen.tips/documents/toksik-organik-kirleticilerin-gideriminde-ileri-oksidasyon.html>; 10.07.2019
- Buthiyappan A, Abdul Aziz AR, Ashri Wan Daud WM 2016. Recent Advances and Prospects of Catalytic Advanced Oxidation Process in Treating Textile Effluents, *Rev Chem Eng* 32:1-47
- Dokuzoğlu Z, Alkan U, Yentürk A 2008. Reaktif Boyar Madde İçeren Tekstil Atık Sularının İleri Oksidasyonu, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 13:119-128
- Gürtekin E, Şekerdağ N 2008. Bir İleri Oksidasyon Prosesi: Fenton Proses, *Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14:229-236.
- Kılıç, M., Kestioğlu, K 2008. Endüstriyel Atıksuların Arıtımında İleri Oksidasyon Proseslerinin Uygulanabilirliğinin Araştırılması, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 13:67-80
- Kitiş, M., Yiğit., N.Ö., Köseoğlu, H., Bekaroğlu, Ş.Ş 2009. Su ve Atık Su Arıtımında İleri Arıtma Teknolojileri-Arıtılmış Atık Suların Geri Kullanımı, <https://isgfrm.com/threads/su-ve-atiksu-aritmalarinda-ileri-aritma-teknolojileri-ve-aritilmis-atiksularin-geri-kullanimi.2218/>: 09.07.2019
- Öztürk M., Polat, A., Topçu, U. S., Aslan, Ş 2015. Katı Atık Sızıntı Suyunun İleri Oksidasyon Yöntemleriyle Arıtımı, *ISITES, Valencia –Spain*, pp. 2098-2104.
- Sedlak DL, Andren AW 1991. Aqueous-Phase Oxidation of Polychlorinated Biphenyls by Hydroxyl Radicals, *Environ. Sci. Technol.*, 25:1419-1427.
- Tezcan H, 2010. "Treatment of Olive Oil Waste Water by Fenton Process" Master Thesis, Selcuk University, Institute of Science and Technology, Environmental Engineering Department.

## Antioxidant activity, physical and chemical properties of different honeys from Turkey

Yakup Kara<sup>1\*</sup>, Zehra Can<sup>2</sup>, , Amar Otmani<sup>1</sup>, Sevgi Kolaylı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Karadeniz Technical University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 61080, Trabzon, Turkey

<sup>2</sup>Bayburt University, Faculty of Applied Sciences, Department of Emergency and Disaster Management, 6900, Bayburt, Turkey

\* Corresponding author e-mail: yaakupkara@gmail.com

### Abstract

Turkey is one of the richest regions of the world in terms of honey production and variety. It is home to a wide variety of nectar and honeydew honey types, both monofloral and multifloral. As monofloral honey is the most known chestnut honey. In our study, besides the chestnut honey, oak and less well-known parsley honey were studied. The aim of the study was to determine the physical properties, chemical properties and antioxidant activity of monofloral Turkish honey. It was determined that it has high antioxidant activity in three honey. Fructose and glucose monosaccharide were identified as major constituents in all three honey.

**Keywords:** Monofloral, Chesnut, oak, parsley, honey, antioxidant

### Introduction

Honey is a food produced by honey bees (*Apis mellifera*) from the nectars, the secretions of plant-sucking insects living on plants or from plants. The honey bee mixes the components collected from the plants with its own substances and lowers the water content and stores it for ripening in the honeycomb. (Turkish Food Codex, Honey Notification, 2005). Honey is divided into two classes as flower honey and secretory honey according to its source. 70-80% of honey is composed of sugar, 18-20% is moisture and 1% is composed of proteins, organic acids, phenolic compounds, minerals and vitamins. (Baroni et al., 2006). The chemical content of honey is influenced by environmental factors, vegetation and weather conditions. However, other components of honey except sugar vary depending on climate and flora (Silva et al., 2016). It has been shown in the studies that the amount of phenolic compound and flavonoid that have antioxidant properties in honey is related to geographical conditions and flora (Tomas-Barberán et al., 2001). It is important to investigate the health value of bee products, especially honey, and to consciously use them in treatment. This study was aim to describe the antioxidant activity, physical and chemical properties of different honeys from Turkey and also sugar compounds.

### Material and Method

The chemicals used in the study are as follows. Trolox (AppliChem (Darmstadt, Germany)), Folin–Ciocalteu's phenol reagent (Fluka Chemie GmbH (Switzerland)), iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), iron(II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), and DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium acetate, ferric chloride, and glacial acetic acid were obtained from Merck. LC syringe filters (RC-membrane, 0.45  $\mu\text{m}$ ) Sartorius Minisart RC 15, Sartorius (Darmstadt, Germany).

### Physico-chemical Properties

Color measurement was performed according to Hunter (L, a, b) color measurement system (CR-400, Minolta, Osaka, Japan). Moisture content was determined by refractometer (Atago, Tokyo, Japan) using refractive index. Electrical conductivity and pH were measured with conductivity meter and pH meter (WTW inoLab Cond / 720, Germany). Protein analysis was performed according to the biuret method and the results were calculated as BSA equivalent. Proline content (Ough, 1960) by spectrophotometer (Thermo Scientific Evolution™ 201, UV-VIS Spectrophotometer, USA). For proline analysis, formic acid and 3% ninhydrin were added to the sample and the tubes were mixed. After addition of 50% 2-propanol solution, absorbance measurement was performed at 510 nm. HMF analysis was performed by RP-HPLC-UV.

### Honey extraction for bioactivities tests

Approximately 10 g of honey was dissolved in 50 ml of 100% Methanol and extracted in a shaker (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for 24 hours. The extract was filtered with filter paper to remove any possible particles and the final volume was adjusted with Methanol. The methanolic extract was used for bioactivities tests.

### Determination of Antioxidant activity assays

Total phenolic contents (TPC) and total flavonoids (TF) were evaluated for polyphenolic contents of the samples. DPPH test and FRAP analysis were performed to determine the antioxidant capacity of the samples.

#### Total phenolic content (TPC)

The basis of the total phenolic determination is based on the redox reaction in which the phenolic compounds reduce the Folin-Ciocalteu reagent in the basic medium and then convert into the oxidized form. (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). This method yields the total amount of all phenolic acids, flavonoids and anthocyanins. The reading is made at 760 nm using the intensity of the blue color formed as a result of the reaction. Gallic acid was used as standard. The results were given as gallic acid equivalents (GAE mg/g).

#### Total flavonoid content (TPC)

Total Flavonoid amount was determined by spectroscopic method (Fukumoto and Mazza, 2000). The absorbance of the solution was measured at a wavelength of 415 nm after performing the pipettings indicated in the method. Quercetin was used as standard. The results were expressed as quercetin equivalents (mg QE/g).

#### Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay

This method is based on the reduction of Fe (III) ion in the (Fe (III) -TPTZ-2,4,6-tris (2-pyridyl) -S-triazine) complex in the presence of an antioxidant (Benzie & Strain, 1996). The varying concentrations of FeSO<sub>4</sub> (31.25-62.5-125-250-500-1000 μM) were used as standard. After pipetting as described in the method, absorbance measurement was performed at 593 nm. Standard curve was prepared using different concentrations of FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and the results was expressed as μmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g sample.

#### DPPH assay of total antioxidant capacity

The radical scavenging capacity of the methanolic extract was made according to the method described by Molyneux (Molyneux, 2004). Absorbance measurement were read at 517 nm, after 50 min of incubation time at room temperature. The values were shown as SC<sub>50</sub> mg/mL sample representing the concentration of each sample that resulted in 50% scavenging of DPPH radicals.

#### Determination of sugar content profiles by HPLC-RI detector

Sugar profiles of the honeys were determined using a HPLC-RID (Elite LaChrom, Hitachi, Japan) and a reverse phase-amide column (200/4.6 Nucleosil100-5 NH<sub>2</sub>) adjusted to a 45° C column temperature. A mixture of acetonitrile and ultra-pure water was used as mobile phase (79:21, v/v). The volume of each injection was 20 μL.

### Results and Discussion

In this study, physico-chemical and bioactivity analysis of the honey collected from different regions of Turkey were studied. Although the physicochemical property of a honey alone is not a determining parameter, it gives important information about honey. It is not desirable that the moisture content of honey be more than 20%. The HMF content provides information on whether a honey has undergone heat treatment, and the amount of HMF in the honey should not exceed the value specified in the Food Codex. In our study, it was found that chestnut honey had the highest HMF content and that of parsley honey was the lowest. What makes chestnut honey valuable is its antioxidant content as well as the amount of proline it contains. Although the antioxidant content of parsley honey was higher than chestnut honey, proline content was found to be low. Physicochemical analysis results of honeys are given in Table 1.

**Table 1.** Physicochemical analysis results of honeys

	Brix (%)	Moisture (%)	Electrical conductivity (mS/cm)	pH	HMF (mg/kg)	Protein (mg BSAE/100g)	Prolin (mg/kg)	Color intensity
Chestnut honey	80.93±0.25	19.07±0.50	0.61±0.01	4.40±0.03	20.95±1,48	85.21±3.48	1117,26±53,23	0.86±0.01
Parsley honey	79.03±0.95	20.97±0.22	0.70±0.01	4.53±0.04	4.74±1.61	56.32±2.85	316,05±48,34	1.17±0.01
Oak honey	82.57±0.20	17.43±0.20	0.67±0.02	3.61±0.01	10.12±0.94	116.32±6.31	665,43±93,79	0.93±0.00

Polyphenols and flavonoids are important components in the bioactivity of honey. Thanks to these components, honey removes free radicals and affects other metabolic pathways. The results of the bioactivity analysis of honeys are given in Table 2. The TP content of honey ranged from 74.63 to 120.07 mg GAE / 100 g sample, while the total flavonoid content of honey was 12.19 to 31.43 mg QE / 100g sample. The biological activity of honey is known to result from components such as phenolic compounds, organic acids, enzymes, vitamins. As a result of DPPH analysis, antioxidant activity of honeys was found between 27.76% and 75.58%. The results of FRAP analysis in determining the antioxidant capacity of honey were found between 31.97 and 62.16 mg / 100g sample. The antioxidant content of parsley honey was found to be higher than chestnut and oak honey. At the same time, the antioxidant activity of parsley honey was found to be high in our study.

**Table 2.** Total Phenolic, Total Flavonoid content and antioxidant activity results of honeys

	Antioxidant content			Antioxidant activity		
	Total phenolic content (mg GAE/100g)	Total flavonoid content (mg QE/100g)	Vitamin C (mg AE/100g)	DPPH (%)	FRAP (mg/100g)	Reduction power (mgGAE/100g)
Chestnut honey	89.02±2.99	15.53±0.90	<b>2.58±0.18</b>	34.47±0.97	56.39±1.55	33.12±1.87
Parsley honey	<b>120.07±0.57</b>	<b>31.43±1.18</b>	0.56±0.03	<b>72.58±0.64</b>	<b>62.16±0.49</b>	<b>49.98±2.37</b>
Oak honey	74.63±1.95	12.19±1.50	1.06±0.09	27.76±0.85	31.97±1.39	24.71±0.74
Correlation	<b>0.99</b> (Total flavonoid content)	<b>0.99</b> (Total phenolic content)		<b>0.98</b> (Total phenolic content) <b>0.99</b> (Total flavonoid content)	<b>0.85</b> (Total phenolic content) <b>0.76</b> (Total flavonoid content) <b>0.74</b> (DPPH)	<b>0.97</b> (Total phenolic content) <b>0.95</b> (Total flavonoid content) <b>0.95</b> (DPPH) <b>0.89</b> (FRAP)

The sugar analysis of honeys was performed by RP-HPLC-RID and the results are given in Table 3 as %. Fructose and glucose were the main constituents of these three honeys, while in the oak honey was found to have a significant proportion of melesitose sugar. The sugar content of honey varies with flora and climate characteristics (Can et al., 2015; Mendes et al., 1998). It is expected that the amount of fructose and glucose in honeys is expected to be high, whereas sucrose is desired. The presence of high levels of sucrose in honey is a sign that sugar is added to honey.

**Table 3.** Sugar compounds of honeys

	% Ribose	% Fructose	% Glucose	% Sucrose	% Maltose	% Theralose	% Melebiose	% Melesitose
<b>Chestnut honey</b>	n.d.	41.29	12.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Parsley honey</b>	n.d.	34.16	20.51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Oak honey</b>	n.d.	47.50	15.16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.42

\*n.d. : not detected



## Results

In our study, it was demonstrated that the physicochemical properties and phenolic content of honey were highly correlated with the antioxidant effect. While the importance of chestnut honey with high proline content was revealed, parsley honey was found to have high antioxidant content. The antioxidant content and activity of parsley honey was higher than chestnut and oak honey. Compared to chestnut honey, parsley honey may be suitable for working on apitherapy due to its antioxidant content.

## References

- Baroni M.V., Nores M.L., Díaz M.D.P., Chiabrando G.A., Fassano J.P., Costa C., Wunderlin D.A. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid-phase microextraction-Gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:7235–7241.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* 239:70–6.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E.Ak., Silici, S., Kolayli, S. 2015. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Fukumoto, L.R., and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Mendes, E., Proença, E. B., Ferreira, I. M. P. L. V. O., and Ferreira, M. A. 1998. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, 37, 219–223.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science Technology* 26, 211-219.
- Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, V.L., Costa, A.C.O., Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 196 (2016) 309–323.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Tomas-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E., 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 485–496.

## Phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of *Astragalus* honeys from Turkey

Zehra Can<sup>1\*</sup>, Yakup Kara<sup>2</sup>, Sevgi Kolaylı<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Bayburt University, Faculty of Applied Sciences, Department of Emergency and Disaster Management, 6900, Bayburt, Turkey

<sup>2</sup>Karadeniz Technical University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 61080, Trabzon, Turkey

\* Corresponding author e-mail: zcan@bayburt.edu.tr

### Abstract

Honey has been reported to contain about 200 substances (complex mixture of sugars, but also small amounts of other constituents such as minerals, proteins, vitamins, organic acids, flavonoids, phenolic acids, enzymes and other phytochemicals) and is considered to be an important part of traditional medicine. The honey compounds phenolic and flavonoid so that is have high antioxidant and antimicrobial activity properties. In this study, Ten seven (*astragalus*) honey, which is a floral honey was determined that antioxidant, antimicrobial activity and phenolic composition. In seven honey, pinocembrin, chrysin and cape compound were detected in different ratios. And also, It was determined that the seven honey had high antioxidant and antimicrobial activity.

**Keywords:** *Astragalus*, honey, phenolic, antimicrobial, antioxidant

### Introduction

Honey; After collecting the flower nectars of honey bees, the secretions of some plants living on plants or plants, it is a sweet substance in which they are stored in honeycombs by changing with their own specific substances (Turkish Food Codex, 2000). Honey mainly is composed with more than 95% of its dry mass consisting of sugar and water, although different valuable nutrients such as vitamins, minerals, enzymes, flavoring organic compounds, free amino acids and numerous volatile compounds constitute minor components (Baroni et al., 2006). The chemical content of honey is variable, and in particular environmental factors play a role in many factors, such as climate, flora and processing. The enzymes, amino acids, organic acids, carotenoids, vitamins, minerals and aromatic substances that make up 5% of honey vary according to climate, geographic conditions and storage conditions (Silva et al., 2016). Many studies have determined the phenolic and flavonoid contents of honey to determine if a correlation with floral origin, geographical location and its antioxidant capacity exists (Tomas-Barberán et al., 2001). Further research is needed to inform a control system that evaluates maintenance of the characteristics and levels of these compounds provided by honey to human nutrition and health. This study was aim to describe the characteristics of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity in *astragalus* honey of Turkey and also sugar compounds.

### Material and Method

Chemicals All the reagents used were of analytical grade. All phenolic acid standards were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Trolox was supplied by AppliChem (Darmstadt, Germany). Folin–Ciocalteu’s phenol reagent and TPTZ were purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Jack bean urease, urea, acetohydroxamic acid, sodium nitroprusside, iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), iron(II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), and DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium acetate, ferric chloride, and glacial acetic acid were obtained from Merck. LC syringe filters (RC-membrane, 0.45  $\mu\text{m}$ ) were obtained from Sartorius Minisart RC 15, Sartorius (Darmstadt, Germany).

### Honey extraction for antioxidant activity and phenolic analysis

Approximately 10 g of each honey was added to an equal volume (50 mL) of 100% methanol and the mixture was continuously stirred with a shaker (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for 24 h. Particles were removed with filter paper. The final volume of the solution was adjusted with 100% methanol. The methanolic extract was divided into three parts, the first being used for antioxidant tests, antimicrobial test and phenolic compounds.

The methanolic extract was evaporated until dryness with a rotary evaporator at 40° C. The residue was dissolved in 10 mL acidified distilled water (pH 2). Liquid–liquid extraction was carried out with 5×3 mL

diethyl ether and 5 × 3 mL ethyl acetate, consecutively (Kim et al., 2006). Both diethyl ether and ethyl acetate phases were pooled and dried by rotary evaporation (IKA-Werke, Staufen, Germany) at 40°C. The pellet was resuspended in 2 mL methanol, filtered with syringe filters (RC-membrane, 0.45 µm), and injected to HPLC.

#### **Determination of Antioxidant activity assays**

The polyphenolic contents of the samples were evaluated three different ways; total phenolic contents (TPC) and total flavonoids (TF). The antioxidant capacity was determined using ferric reducing antioxidant power, cupric reducing antioxidant power and free radical scavenging activity of DPPH tests.

#### **Total phenolic content (TPC)**

The total phenolic content of samples were determined by Folin-Ciocalteu reagent and some modifications were made according to the Slinkard and Singleton methods (Slinkard and Singleton, 1977). Firstly, 50 µL of each sample solution was diluted to 2.5 mL distilled water and 250 µL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent was added. After 750 µL of 7.5% of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and then vortexed then incubated for 2 hours at room temperature, absorbance measured at 765 nm using gallic acid as a standard. The results were given as mg gallic acid equivalents per g sample (GAE mg/g).

#### **Total flavonoid content (TPC)**

Total flavonoid content was determined by a colorimetric method as described previously (Fukumoto and Mazza, 2000). Firstly, 0.5 mL each sample solution, 0.1 mL of 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and 0.1 mL of 1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO were added to a test tube then was mixed well incubated at room temperature for 40 minutes. After the absorbance was measured against the blank 415 nm. The results were expressed as mg quercetin equivalents (QE) per g sample (mg QE/ g).

#### **Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay**

The total antioxidant potential of a each sample solution was determined using the ferric reducing ability of FRAP assay by Benzie and Strain (1996) as a measure of antioxidant power. Briefly, the FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 µM, pH3.6) a solution of 10 µM TPTZ in 40 µM HCl and 20 µM FeCl<sub>3</sub>. The each sample 100 µL and reagent 3 mL were added to each well mixed. The absorbance was taken at 593 nm after 4 min. Standard curve was prepared using different concentrations of FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and the results was expressed as µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g).

#### **DPPH assay of total antioxidant capacity**

750 µL various of propolis samples were added to 750 µL 40 mM methanolic solution of DPPH. Absorbance measurement were read at 517 nm, after 50 min of incubation time at room temperature. a freshly prepared 0.1 mM DPPH solution dissolved in methanol (Molyneux, 2004). The values were shown as SC<sub>50</sub> mg/mL sample representing the concentration of each sample that resulted in 50% scavenging of DPPH radicals.

#### **Analysis of phenolic compounds by HPLC-UV**

The samples and standards qualitative analysis and quantitative determination of particular components of the fractions were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Elite LaChrom Hitachi, Japan) with a UV detector. Separation was done on a column with a reverse phase C18 column (150 mm x4.6 mm, 5µm; Fortis), in gradient solvent systems A (2% AcOH in water) and solvent B (70:30, acetonitrile/water) which was sonicated before stirring and continuously degassed by the built-in HPLC system. The flow rate was kept constant at 1 mL min<sup>-1</sup> using gradient programming; starting the flow of mobile phase as B (5%) to three minutes, gradually increasing (up-to 15, 20, 25, 40 and 80% at 8, 10, 18, 25 and 35 minutes respectively) and decreasing to 5 % at 40 minutes and left for 10 minutes to equilibrate in the column. Phenolic profile was determined according to Can and Baltas, (2016).

#### **Determination of sugar content profiles by HPLC-RI detector**

Sugar profiles of the honeys were determined using a Refractive Detector (RID) with HPLC (Elite LaChrom, Hitachi, Japan) and a reverse phase-amide column (200/4.6 Nucleosil100-5 NH<sub>2</sub>) adjusted to a 45° C column temperature. HPLC-UV was performed using the method described by Can et al., 2015. The mobile phase consisted of an acetonitrile and ultrapure water mixture (79: 21, v/v) with an injection volume of 15 min. The volume of each injection was 20 µL.

#### **Microorganisms tested and culture media**

The strains of bacteria and fungi were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Antimicrobial activities of the crude extracts of 41 plants were assayed against *Enterococcus faecalis* ATCC® 29121(+), *Bacillus cereus* ATCC® 11778(+), *Aspergillus niger* (ATCC 9642) *Escherichia coli* ATCC®25922 Gram (-), *Klebsiella pneumoniae* ATCC®13883 Gram (-), *Bacillus subtilis* B209 Gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC®6538(+) *Citrobacter freundii* ATCC® 43864 (-), *Candida albicans* ATCC®10231 *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), NRRL B-2679. The species of bacteria were grown in Mueller Hinton Agar (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA) and Mueller Hinton Broth

(Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA). *C. albicans* and *A. niger* were grown in Sabouraud Dextrose Broth (Difco, New York, USA) and Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid, Cambridge, UK). The concentration of bacterial suspensions was adjusted to 10<sup>8</sup> cells/ml, and that of fungal suspension to 10<sup>7</sup> cells/ml.

## Results and Discussion

In this study, we used honey from the different districts of Hakkari province. Polyphenols and flavonoid are an important group of compounds regarding the appearance and the functional properties of honey. Thanks to these compounds, honey gains high biological activity. TPC of the 12 honeys was investigated Table 1. The TP content of the honey ranged from 30.00 to 43.22 mgGAE/100 g sample while the total flavonoid content of the honey was not observed. The flavonoid content of the honey is shown that very quite poor. It is known that the antioxidant capacity of honey is the result of the combined activity of a wide range of compounds, including phenolic compounds, organic acids but also small peptides and enzymes. FRAP value varies between 1.33 to 2.96  $\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  and DPPH values between 85.96 to 200.57 mg/mL. The total phenolic content and FRAP value of H-8 code honey was found to be highest and DPPH value was found also the lowest. The study determined the phenolic acid and flavonoid compounds in the various honey. Myricetin, luteolin, *t*-cinnamic acid, chrysin, pinocembrin, CAPE was determined all honey samples. This compound profile is characteristic of these floral types of honeys and thus could be used as a biochemical marker for the botanical authentication of these honeys. Myricetin was detected at the highest concentration in H8 coded honey. Our previous study reported that astragalus honeys from Turkey contained a considerable amount of *p*-OH benzoic acid major phenolic compound Can et al., 2015 but in this study was determined major compound myricetin. We can thought that this difference is from the difference of vegetation.

**Table 1.** Total Phenolic, Total Flavonoid content and antioxidant activity results of honeys

Samples	TP mgGAE/ 100 g sample	TF mgQE/ 100 g sample	FRAP ( $\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ )	DPPH SC <sub>50</sub> mg/mL
H1	30.63±0.05	n.d.	1.87±0.52	200.57±40.52
H2	30.00±0.02	n.d.	1.39±0.02	200.57±40.52
H3	33.90±0.05	n.d.	1.33±0.05	171.92±0.01
H4	31.81±0.07	n.d.	1.96±0.46	229.02±0.01
H5	33.64±0.04	n.d.	1.61±0.08	171.92±0.01
H6	34.90±0.09	n.d.	1.93±0.40	171.92±0.01
H7	35.74±0.07	n.d.	1.68±0.07	137.53±0.01
H8	43.22±0.09	n.d.	2.96±1.26	85.96±0.01
H9	40.10±0.06	n.d.	2.18±0.33	126.07±16.21
H10	40.61±0.07	n.d.	2.181±0.05	126.07±16.21
H11	42.73±0.03	n.d.	2.48±0.09	98.24±0.00
H12	40.72±0.06	n.d.	2.07±0.02	126.07±16.21

\*n.d. : not detected

**Table 2.** Phenolic acid content of honeys

Standards	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
Gallic Acid	0.697	0.598	0.600	0.650	n.d.	n.d.	0.120	0.899	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Protocateuic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -OH Benzoic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Catechin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Caffeic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Syringic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epicatechin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Coumaric acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Myricetin	<b>2.613</b>	<b>2.344</b>	<b>2.100</b>	<b>2.600</b>	<b>12.400</b>	<b>11.340</b>	<b>10.346</b>	<b>19.990</b>	<b>9.890</b>	<b>2.251</b>	<b>2.240</b>	<b>2.300</b>
Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Daidzein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Luteolin	1.330	1.300	1.000	1.455	9.500	8.679	8.790	8.899	7.87	n.d.	1.221	1.111
<i>t</i> -Cinnamic acid	0.251	0.200	0.244	0.248	0.333	0.321	0.265	0.346	0.377	0.250	0.228	0.234
Hesperetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chrysin	7.870	8.788	8.990	10.252	9.657	9.010	7.660	7.456	8.690	12.344	7.980	7.700
Pinocembrin	3.087	3.456	3.222	3.001	2.999	3.090	5.467	4.330	3.334	3.213	3.109	3.089
CAPE	7.456	7.689	7.666	6.908	4.454	5.566	6.787	8.231	9.241	10.567	7.432	8.112

\*n.d.:not detected

Analysis of honey sugar was performed with HPLC-RID and the % values for mono-, di- and trisaccharides shown in Table 3. Only fructose and glucose sugar were detected in all honey. Other sugars could not be detected in honeys. Honey's sugar composition depends on the floral and region origin (Can et al., 2015; Mendes et al., 1998). Sucrose was not detected in any honey. This shows that there is no addition of sugars in honey.

**Table 3.** Sugar compounds of Honeys

Sample	%ribose	%Fructose	%Glucose	%Sucrose	%Maltose	%Therulose	%Melebiose	%Melesitose
H1	n.d.	41.32	32.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H2	n.d.	38.62	29.17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H3	n.d.	39.73	29.15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H4	n.d.	39.00	28.90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H5	n.d.	39.90	30.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H6	n.d.	40.04	28.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H7	n.d.	42.10	29.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H8	n.d.	39.98	33.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H9	n.d.	40.01	31.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H10	n.d.	40.05	32.60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H11	n.d.	42.11	29.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H12	n.d.	40.34	28.99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

\*n.d. : not detected

Honey components such as polyphenols, flavonoids sugars, acids and contribute to its antimicrobial activity (Ertürk et al., 2014). Antimicrobial properties of honey have been proven in many studies. In this work, we attempted to assess the value of astragalus honey from Turkey as an antimicrobial therapeutic agent. Mean diameters of inhibition zones per strain are shown in Table 4. Honey was found to have different effects against both gram positive and gram negative bacteria.

**Table 4.** Zones of inhibition (mm) showing the antimicrobial activity of honey extract at various concentrations

samples	<i>S.a.</i>	<i>B.ceraus</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>E.c.</i>	<i>C.freundi</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A.niger</i>	<i>Paeruginosa</i>
H1	14.5±0.2	19.0±0.1	16.8±0.09	15.7±0.0	19.8±0.34	18.0±0.1	16.5±0.2	18.9±0.3	20.6±0.2	14.8±0.08
H2	15.5±0.0	19.2±0.1	17.7±0.44	15.0±0.4	17.9±0.09	17.9±0.5	16.3±0.5	19.4±0.2	19.8±0.8	14.9±0.50
H3	13.6±0.2	20.7±0.8	15.7±0.27	18.0±0.1	19.0±1.99	17.0±1.3	16.9±0.6	19.0±0.3	20.9±0.4	16.0±0.51
H4	14.0±0.0	19.5±0.7	15.6±0.51	18.7±0.6	19.7±1.40	16.3±1.2	16.4±0.7	19.4±0.3	19.9±0.6	16.3±0.33
H5	20.6±0.2	20.0±0.1	14.9±0.21	16.5±0.6	17.1±0.09	17.7±0.7	17.3±0.5	19.4±0.2	20.0±0.2	17.1±0.44
H6	13.8±0.3	20.0±0.8	16.7±0.21	17.0±0.0	19.6±1.98	16.0±1.3	16.4±0.5	19.2±0.3	20.3±0.0	16.5±0.50
H7	14.0±0.3	19.4±0.2	15.3±0.04	16.6±0.0	20.8±0.57	18.2±0.3	16.0±0.5	18.4±0.2	20.8±0.2	15.6±0.23
H8	16.0±0.4	19.5±0.1	17.4±0.51	15.5±0.4	15.9±0.03	17.3±0.7	17.3±0.5	20.4±0.2	19.7±0.8	14.4±0.57
H9	14.5±0.5	20.5±0.7	15.0±0.53	17.7±0.6	19.1±1.41	16.4±1.2	17.4±0.7	19.9±0.3	20.9±0.6	16.4±0.58
H10	19.0±0.0	19.7±0.7	16.8±0.43	16.7±0.3	16.0±0.07	18.9±1.2	18.9±0.6	19.9±0.5	20.0±0.0	16.9±0.54
H11	20.0±0.4	20.3±0.1	17.9±0.55	15.5±0.4	15.1±0.08	18.7±0.7	18.3±0.5	20.4±0.2	20.5±0.8	17.4±0.52
H12	18.5±0.5	18.5±0.7	16.0±0.51	17.1±0.6	16.7±1.48	19.9±1.2	19.4±0.7	17.9±0.3	20.2±0.6	16.4±0.56
Ampicillin	10.0±0.3	26.5±0.3	15.3±0.23	19.8±0.2	16.3±0.43	30.5±0.4	34.0±0.5	n.d.	n.d.	28.6±0.23
Cephazolin	7.0±0.45	27.9±0.6	16.2±0.76	18.8±0.5	16.2±0.46	33.6±0.6	28.2±0.4	n.d.	n.d.	27.9±0.57
Nystatin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17.3±0.3	17.7±0.5	n.d.
Solvent	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00	6.0±0.00

\*n.d. : not detected

## Results

The present study demonstrates that honey phenolic compounds are partially responsible for honey antibacterial and antioxidant activity. We determined that honey has a rich phenolic compounds that is stronger antioxidant activity (which can be attributed to their reductive capacity and scavengers of free radicals, and antimicrobial activity). These results, also attributed to the differences in the phenolic compounds profile which are dependent of the honey geographic origin (flora predominance), are in accordance with other works

that state that astragalus honey sample have phenolic compounds with higher microbiological inhibitors properties.

#### References

- Baroni M.V., Nores M.L., Díaz M.D.P., Chiabrando G.A., Fassano J.P., Costa C., Wunderlin D.A. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid-phase microextraction—Gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54:7235–7241.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* 239:70–6.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, E.Ak., Silici, S., Kolayli, S. 2015. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Can, Z., and Baltas, N. 2016. Bioactivity and Enzyme Inhibition Properties of *Stevia rebaudiana*. *Current Enzyme Inhibition* 12(2):188-194.
- Ertürk, Ö., Sahin, H., Kolayli, S., Ayvaz Ç., M. 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of east black sea region honeys. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(1), 99-106.
- Fukumoto, L.R., and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Honey: Chemical composition, stability and authenticity.
- Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95(3) 466-473.
- Mendes, E., Proença, E. B., Ferreira, I. M. P. L. V. O., and Ferreira, M. A. 1998. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, 37, 219–223.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science Technology* 26, 211-219.
- Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, V.L., Costa, A.C.O., Fett, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 196 (2016) 309–323.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Tomas-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E., 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 485–496.

## On the magnetic tweezer design and modeling

Günyaz Ablay\*, Kutay İçöz, Mustafa Büyük, Yakup Eroğlu

Abdullah Gül University, Engineering Faculty, Electrical-Electronics Engineering Dept., Kayseri, Turkey.

\* Corresponding author e-mail:gunyaz.ablay@agu.edu.tr

### Abstract

Magnetic tweezers are able to manipulate cells or biomolecules in applications associated with biological separation, medical treatment, and biosensor developments. In this work, a horizontal magnetic tweezer is designed, modeled and implemented. Finite element based numerical solvers are used for optimal designs. A model based on the first principals approach is derived and experimentally verified, which can be used in calibration and control implementations.

**Keywords:** magnetic tweezer, modeling, model verification, magnetic force.

### INTRODUCTION

The magnetic tweezer systems have become a significant research area due to their effective application potentials in many fields in recent years. It is expected that these micromanipulators will have a crucial role in many fields including biotechnology, medicine, electronics, appliances etc. Various actuating mechanisms for micro-particles can be used for micromanipulation including magnetic tweezers (Bessalova et al., 2016; Fabian et al., 2018), electrostatic force (Donald et al., 2006), micro-needle manipulation (Aziz et al., 2012), dielectrophoresis-based tweezers (Luo et al., 2018), flow induced stretching (Smith et al., 1992), biomembrane force probe (Ju and Zhu, 2017), piezoelectric materials (Kosa et al., 2007), thermal actuators (e.g., silicon carbon-nitride) (Cahill et al., 2003), bacterial manipulation (Martel et al., 2009), optical tweezers (Onda and Arai, 2012) and atomic force microscopy (Li et al., 2013). The different approaches have their own advantages and disadvantages, but the most effective results have been obtained when magnetic force is utilized in different ways such as magnetic tweezers, swimming microrobots and manipulation with magnetic resonance (Qiu et al., 2015; Abbott et al., 2009; Belharet et al., 2010; Jing et al., 2011).

Magnetic tweezer is a single molecule-technique such that in its typical implementation superparamagnetic beads controlled with external magnetic fields are used to manipulate bio-molecules. It is designed and employed to offer an insight into the function and dynamics of bio-molecules, for instance, extracting properties of DNA, RNA and polymerases (Kriegel et al., 2017). The main advantages of magnetic tweezers include exerting and measuring from femtoN level to miliN level forces, safe operations in biological environments, measurements of multiple molecules, and possibility of various robust designs for different needs and applications (Vlaminck and Dekker, 2012). While permanent magnets offer simple designs with empirical studies and without any feedback control action, electromagnets offer a variety of different design options with controlled magnetic force generations. The electromagnets in magnetic tweezers must be designed quantitatively to predict forces on superparamagnetic particles. Due to the complexity of the geometries and materials, numerical methods are more suitable than the analytical methods. Such a numerical analysis method allows one to obtain predictive calculations to optimize the selection of electromagnet materials, geometry and choice of magnetic beads for a given specific implementation before performing experimental studies. The numerical calculations are usually done with finite element methods. The finite element analysis is the most effective numerical calculation method for solving electromagnetic field problems and there are many commercially available software packages to apply this powerful method.

In this work, a horizontal magnetic tweezer based on electromagnets is designed, modeled and implemented. A dynamic force model is provided based on the first principles, magnetic monopole and magnetic circuit approaches, and the derived model is validated through an experimental magnetic tweezer setup. In the following sections, the magnetic tweezer design approach, modeling ways and experimental implementation results are presented.

### DESIGN OF THE MAGNETIC TWEEZER

A magnetic tweezer system can include electromagnets, power circuits, control circuits, microscope and camera, computer, microparticle and workspace (or biochip) as shown in Figure 1. The magnetic tweezer requires an external magnetic field source to control the magnetic microparticles. This external source can be

generated through electromagnets. Hence, one of the most important elements in the magnetic tweezer design is related to electromagnet designs. In the designs, both numerical and analytical approaches can be used wherever possible. In our designs, to tackle with the complexity of the geometry and materials, we utilized from the software packages such as FEMM and COMSOL. In this work, the design of two electromagnets consisting of a coil wrapped on a pen-shaped core and a coil wound on a cone-shaped core is considered. The steel cores are designed to strengthen the magnetic flux density and to generate stronger magnetic force on the microparticles. The designs are optimized using Comsol for windings between 300 and 2700. The workspace is designed to have a 4mm radius, which is much larger than the literature based designs (the workspace is designed to be smaller than an area of 1mm x 1mm in the literature). The magnetic microparticles used in our studies are the superparamagnetic microparticles (or beads), whose radius are varying between 4 $\mu$ m and 10 $\mu$ m. These microparticles are available commercially. The superparamagnetic beads are made from magnetic nanoparticles whose outer layer are coated by application-specific polymer coatings as illustrated in Figure 2a (Fonnum et al., 2005). The outer coating may be formed not only with polymers such as dextran, but also with different antibodies and fluorescent agents. The superparamagnetic beads have no permanent magnetism or hysteresis phenomenon as seen in Figure 2b.

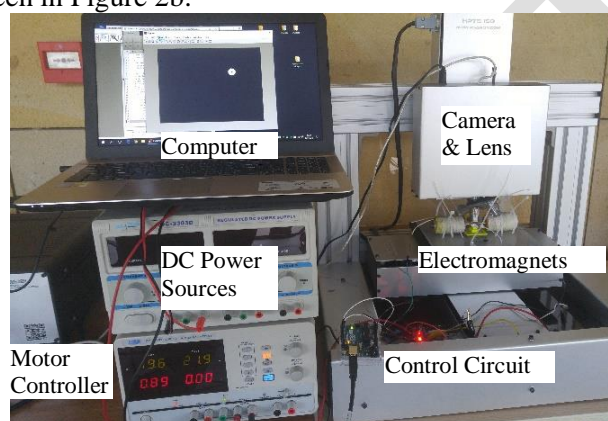


Figure 9. Experimental setup.

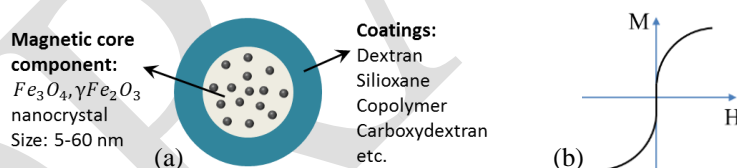


Figure 10. Superparamagnetic microparticle and its magnetic characteristics.

The workspace is prepared by using the biochip technology, which has been developed in the electronics industry, inspired by chips such that today, there are over 20 companies producing both DNA and protein chips in North America alone. As chip material, silicon, glass, quartz and plastic (polymethylmethacrylate (PMMA), polydimethylsiloxane (PDMS), nylon, polpropylene, etc.) are generally used in electronic chips for many years, so the workspace material can be one of these materials. The PMMA material is also known as Acryl or Plexiglass is preferred in our studies. PMMA is a high transparency thermoplastic polymer which is obtained by polymerization of methyl methacrylate monomer. Due to its transparency, aesthetics and scratch resistance, PMMA is an alternative material to the glass. The main features of PMMA are: exceptional optical properties close to glass transparency, transparency and bright appearance, stiffness and dimensional stability, hardness and scratch resistance, and excellent resistance to ultraviolet radiation and weathering. In addition, water absorption of this material is high but its gas permeability is quite low. Therefore, if a material with both water absorption and gas permeability is required, the PDMS material should be used. Figure 3 shows a typical PMMA material and the workspace we produced from PMMA and glass materials. The production steps of the workspace include CAD software drawings, adding adhesives to the PMMA material, inserting and cutting into the laser cutter, adding the intermittent layers, sealing tests and obtaining the final product. In general, we have made a simpler design than the definition of biochip. The main reason for this is our ability to control magnetic particles in the liquid. Once all control designs have been completed, we are



planning to carry out tests on the cell, then we will make it more functional by equipping it with appropriate cells and antibodies.

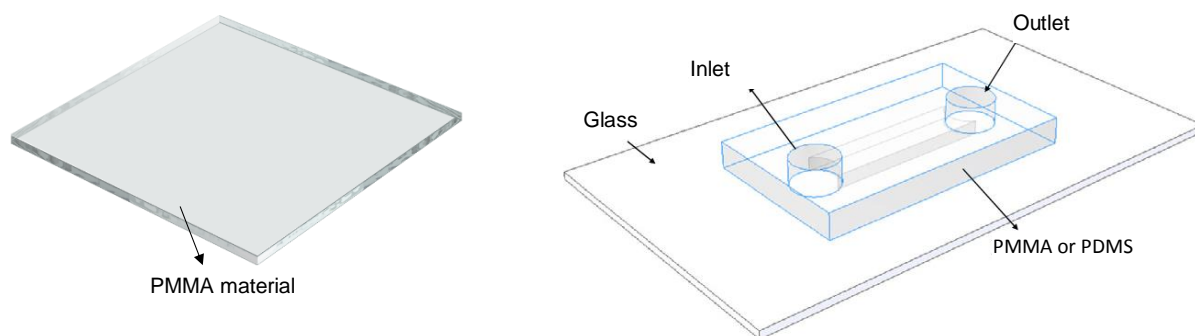


Figure 11. PMMA material and a designed workspace.

### MODELING THE MAGNETIC TWEEZER

A double electromagnet design based horizontal magnetic tweezer is shown in Figure 4. Considering that the magnetic particle works in a liquid environment, there are some key factors affecting the behavior of magnetic particles. The viscosity of the fluid is directly related to the drag force and the production of magnetic force. The size and magnetic content of the particle have a direct effect on the force balance. Temperature and ionic strength affect the stability of the liquid solution. The pole end of the electromagnets should be sufficiently close to the magnetic particle to produce sufficient magnetic force to pull the particle. The produced magnetic force must be reinforced with appropriate core designs. For example, in our work, we designed the core with steel material for strong magnetic force production. Besides, magnetic saturation and hysteresis effects of materials are taken into consideration for healthy operations. The camera-microscope system is used to measure the position of the magnetic particles through image processing.

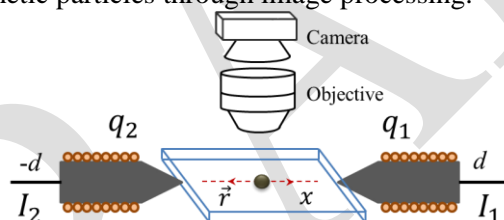


Figure 12. A horizontal magnetic tweezer system.

Given the scheme in Figure 1, Newton's second law of motion can be applied to derive the motion of the equations of the magnetic microparticle in x-direction as follows

$$m \ddot{x} = F_m + F_t + F_g \quad (1)$$

where  $m$  (**kg**) is the mass of the particle,  $\sigma$  (**Ns/m**) is the viscosity of the liquid medium, and  $F_m$ ,  $F_t$  and  $F_g$  (**N**) represents the magnetic force, thermal force and gravity force, respectively. According to Stokes' law (Happel and Brenner, 1983), the viscosity coefficient of a spherical particle in fluidic environment is given by  $\sigma = 6\pi\eta\beta R$ , where  $\eta$  is the dynamic viscosity of the fluid,  $\beta$  is a correction factor, i.e.,  $1 \leq \beta \leq 3$ , and  $R$  is the radius of the particle. The random thermal force  $F_t$  (**N**) occurs due to the effects of the liquid molecules on the microparticle, and it is also known as the Brownian force. The thermal force is given by (Kim and Zydney, 2004)

$$F_t = \delta (2\sigma k_B T / T_s)^{1/2} \quad (2)$$

where  $k_B = 1.38 \times 10^{-23}$  (**J/K**) is the Boltzmann constant,  $T$  (**K**) is the absolute temperature,  $\delta$  is defined as the white noise with zero mean and unit variance, and  $T_s$  is the sampling time. This force yields free diffusion influence on the microparticle. The other disturbing force effect is the gravity force (Hejazian et al., 2015)

$$F_g = -V_p (\rho_p - \rho_f) g \quad (3)$$

where,  $V_p$ ,  $\rho_p$ ,  $\rho_f$  and  $g$  are the volume of the particle, particle density, fluid density, and gravity constant, respectively. The most important force is the magnetic force that must be generated by external magnetic tweezer to control the microparticle in fluidic environment. The magnetic force on the microparticle depends on the magnetic moment  $m$  (**Am<sup>2</sup>**) and the gradient of the magnetic flux density  $B$  (**T**) and is given by

$$F_m = \nabla(m \cdot B) / 2 \quad (4)$$

To calculate the magnetic force as a control input of the system, this equation (4) must be associated with the electromagnet currents. To do this, first the magnetic moment of a magnetic particle is defined as follows

$$m = \frac{3V_b}{\mu_0} \frac{(\mu - \mu_0)}{(\mu + 2\mu_0)} B \quad (5)$$

where  $\mu$  is the magnetic permeability of the particle and  $V_b$  is the particle volume. Hence, the magnetic force equation can be written as

$$F_m = \frac{3V_b}{\mu_0} \frac{(\mu - \mu_0)}{(\mu + 2\mu_0)} (B \cdot \nabla) B \quad (6)$$

Now, assuming that the tips of the cores can be considered as point magnetic charges (assuming that the tip of the core is sufficiently thin), the magnetic force calculations can be simplified and defined by using the point magnetic charge approach. In this case, the magnetic field generated by the magnetic charge  $q$  (Am) at the position  $r$  ( $m$ ) can be written as follows

$$B = k_m \frac{q}{r^2} \hat{u} \quad (7)$$

where  $\hat{u}$  is the unit direction vector and  $k_m = \mu_0/4\pi$ . Then the magnetic force can be written by

$$F_m = \frac{4k_q k_m^2}{d^5} q^2 \hat{u} \quad (8)$$

where  $k_q = 3V_b(\mu - \mu_0)/(2\mu_0(\mu + 2\mu_0))$  and  $r = d$  ( $m$ ) is the workplace radius. Now, we need to define the magnetic charge  $q$  by using its relation with the magnetic flux  $\phi$  such that  $q = \phi/\mu_0$ . The magnetic flux can be defined from the magnetic circuit approach as  $\phi = N_c I / R_c$ , where  $N_c$  is the number of windings,  $R_a = g_a/(\mu_0 A_a)$  is the magnetic reluctance of the air gap,  $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$  (Tm/A) is the magnetic permeability of the air,  $g_a$  ( $m$ ) is the air gap, and  $A_a$  ( $m^2$ ) is the cross-sectional area. Finally, substituting these equations into equation (8), at the center of the workspace ( $x = 0$ ) the magnetic force can be written as

$$F_m = \left( \frac{k_q k_m^2}{d^5} \right) \left( \frac{2N_c}{\mu_0 R_a} \right)^2 (I_1^2 - I_2^2) \quad (9)$$

This equation presents the relation of the magnetic force with the electromagnet currents.

Another model that needs to be derived is related to the electromagnets. Applying the Kirchhoff's voltage law to the circuit equivalency of the electromagnets, the following electrical model can be obtained

$$L \frac{dI_i}{dt} + RI_i = V_i \quad (10)$$

where  $L$  is the electromagnet inductance,  $R$  is the electromagnet resistance, and  $V_i$  is the applied voltage.

#### EXPERIMENTAL VERIFICATION OF THE MODEL

The experimental setup is composed of electromagnets, workspace, camera and lens system, computer, dc power supplies, control circuits, and a Cartesian manipulator as given in Figure 1. The workspace or the fluidic reservoir is made of PMMA material. The Cartesian manipulator can be operated in xyz directions to adjust the position of the camera system. Programmable DC power supplies (0-30V, 0-3A) are used to run the electromagnets. A microcontroller and power interface circuit are integrated for controlling the magnetic tweezer control currents. For data collection, processing and visualization, a computer equipped with Matlab software is used. A Matlab-based image processing program was developed for detecting and tracking the microparticle. The image processing steps shown in Figure 5 are used to create the algorithm for locating and tracking the center of a spherical microparticle. In experimental studies we collected data for a sampling time of 0.1s. The factors determining the sampling time are the 53 frames/s from the camera and the image processing time. Considering the magnetic saturation conditions, we also limit the current values to 1 A.

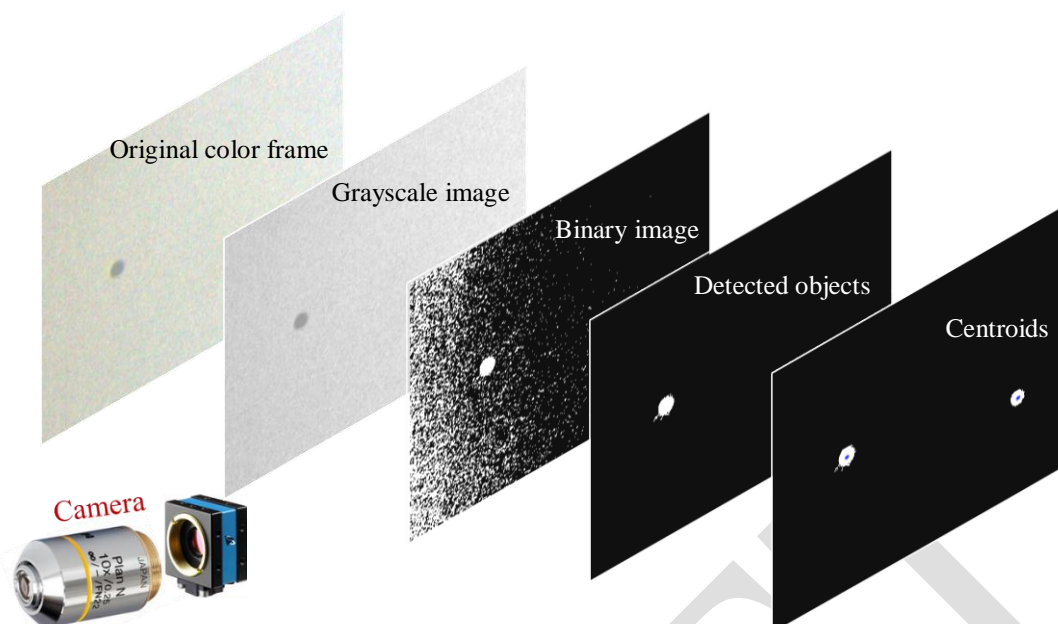


Figure 13. Image processing steps for detection and tracking of the microparticles.

In our study, we have concentrated on controlling a single superparamagnetic particle by applying an appropriate external magnetic field. To have a suitable control algorithm, the model derived in the previous section must be validated through experimental studies. In order to verify the models obtained, the bump test (step test) method is considered, as illustrated with block diagrams in Figure 6. The pulse input currents are applied to the electromagnets, and under open-loop operating conditions the position of the microparticle is measured. Then, by adjusting the model parameters, the model output is matched with the experimental data.

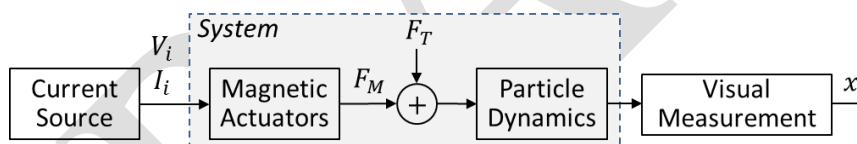


Figure 14. Block diagram of the bump test based modeling.

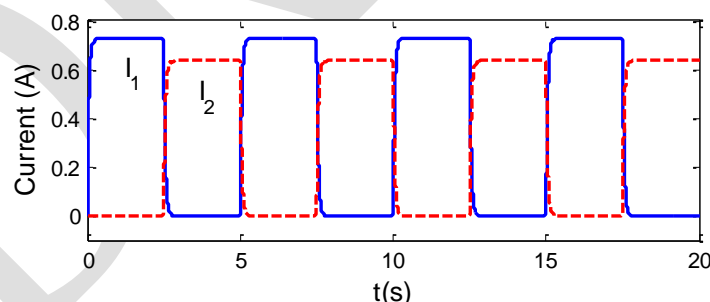


Figure 15. Control current inputs.

In the model validation studies, we have used our model along with the MATLAB's system identification toolbox. Various different models including transfer function, state-space models, process model and non-linear ARX models were used for analysis. The model validation results are illustrated in Figures 8 and 9. While the models offered by MATLAB are accurate, it is difficult to match the parameters in the models with the physical system. As a result, we have decided to use the parameters of the model that we obtained on the basis of first principles approach. The main reason for this is that the model obtained from the first principles reflects all the features of the actual physical system. As shown in Figure 9, we have obtained a highly accurate model with 98%  $R^2$  value.

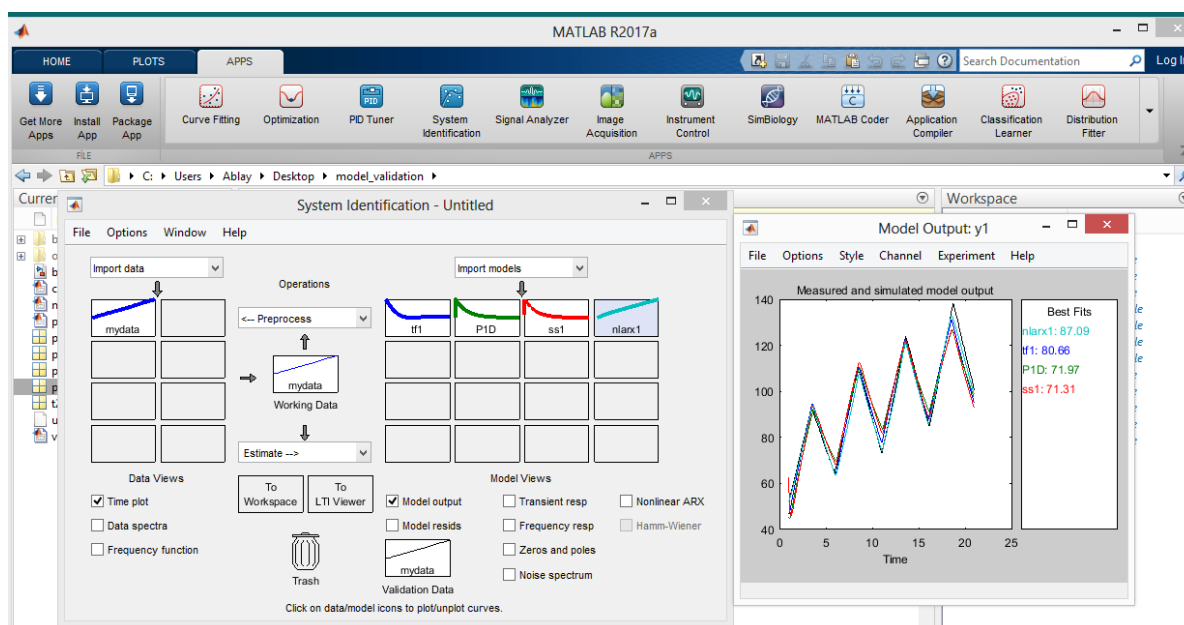


Figure 16. Modeling with the Matlab ‘system identification toolbox’.

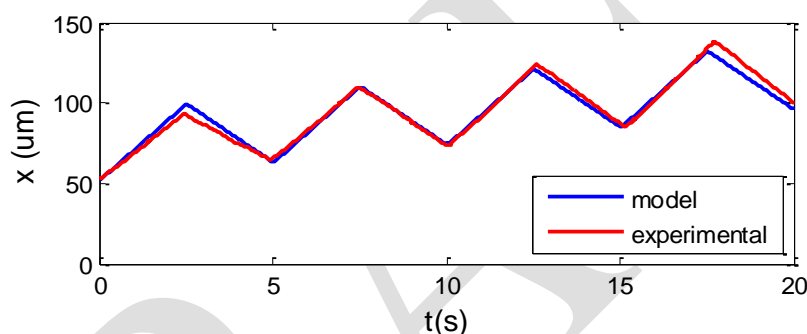


Figure 17. Model verification.

In addition, the parameters of the electrical model are also determined, using the following model,

$$\frac{I_i(s)}{V_i(s)} = \frac{K_e}{\tau_e s + 1} \quad (11)$$

According to our measurements and calculations, the time constant of the electrical model (10) is found as  $\tau_e = L/R \approx 5 \times 10^{-3}$  s, the dc gain is defined as  $K_e = 1/R = 0.062$  mho. Thus, we have concluded that electrical dynamics are much faster than the magnetic particle dynamics.

## CONCLUSION

This work addresses a horizontal magnetic tweezer design for dealing with needs of pico-force measurements and micro-manipulations on single microparticles. For the purposes of analysis, calibration and control designs, the first principles approach was used to obtain the system model. The bump test based method is performed to verify the derived models experimentally. It is shown that the derived model captures the physical properties of the system and provides highly accurate results compared with the data based models. As a result, the magnetic tweezer model can directly be used in effective feedback control mechanisms and automatic calibrations for various applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Turkish Scientific and Research Council (TUBITAK) under project number 116E168.

## REFERENCES

Abbott JJ, Lagomarsino MC, Zhang L, et al. (2009). How Should Microrobots Swim? *The International Journal of Robotics Research* 28(11): 1434–1447.

- Aziz MS, Jalil MA, Suwanpayak N, et al. (2012). Optical manipulation of nano-micro needle array for large volume molecular diagnosis. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology* 40(4): 266–270.
- Belharet K, Folio D and Ferreira A (2010). MRI-based microrobotic system for the propulsion and navigation of ferromagnetic microcapsules. *Minimally invasive therapy & allied technologies* 19(3): 157–169.
- Bessalova V, Perov N and Rodionova V (2016). New approaches in the design of magnetic tweezers—current magnetic tweezers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 415: 66–71.
- Cahill DG, Ford WK, Goodson KE, et al. (2003). Nanoscale thermal transport. *Journal of Applied Physics* 93(2): 793–818.
- Donald BR, Levey CG, McGray CD, et al. (2006). An untethered, electrostatic, globally controllable MEMS micro-robot. *Journal of Microelectromechanical Systems* 15(1): 1–15.
- Fabian R, Tyson C, Tuma PL, et al. (2018). A Horizontal Magnetic Tweezers and Its Use for Studying Single DNA Molecules. *Micromachines* 9(4): 188–200.
- Fonnum G, Johansson C, Molteberg A, et al. (2005). Characterisation of Dynabeads by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293(1): 41–47.
- Happel J and Brenner H (1983). *Low Reynolds Number Hydrodynamics: With Special Applications to Particulate Media*. Mechanics of Fluids and Transport Processes. Springer Netherlands.
- Hejazian M, Li W and Nguyen N-T (2015). Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation. *Lab on a Chip* 15(4): 959–970.
- Jing W, Chen X, Lyttle S, et al. (2011). A magnetic thin film microrobot with two operating modes. In: *2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA)*, pp. 96–101.
- Ju L and Zhu C (2017). Benchmarks of Biomembrane Force Probe Spring Constant Models. *Biophysical Journal* 113(12): 2842–2845.
- Kim M and Zydney AL (2004). Effect of electrostatic, hydrodynamic, and Brownian forces on particle trajectories and sieving in normal flow filtration. *Journal of Colloid and Interface Science* 269(2): 425–431.
- Kosa G, Shoham M and Zaaroor M (2007). Propulsion Method for Swimming Microrobots. *IEEE Transactions on Robotics* 23(1): 137–150.
- Kriegel F, Ermann N and Lipfert J (2017). Probing the mechanical properties, conformational changes, and interactions of nucleic acids with magnetic tweezers. *Journal of Structural Biology* 197(1): 26–36.
- Li M, Xiao X, Liu L, et al. (2013). Atomic force microscopy study of the antigen-antibody binding force on patient cancer cells based on ROR1 fluorescence recognition. *Journal of molecular recognition* 26(9): 432–438.
- Luo H, Sun W and Yeow JT (2018). Modelling and adaptive dynamic sliding mode control of dielectrophoresis-based micromanipulation. *Transactions of the Institute of Measurement and Control* 40(1): 122–134.
- Martel S, Mohammadi M, Felfoul O, et al. (2009). Flagellated Magnetotactic Bacteria as Controlled MRI-trackable Propulsion and Steering Systems for Medical Nanorobots Operating in the Human Microvasculature. *The International journal of robotics research* 28(4): 571–582.
- Onda K and Arai F (2012). Parallel teleoperation of holographic optical tweezers using multi-touch user interface. In: *2012 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA)*, pp. 1069–1074.
- Qiu F, Fujita S, Mhanna R, et al. (2015). Magnetic Helical Microswimmers Functionalized with Lipoplexes for Targeted Gene Delivery. *Advanced Functional Materials* 25(11): 1666–1671.
- Smith SB, Finzi L and Bustamante C (1992). Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science (New York, N.Y.)* 258(5085): 1122–1126.
- Vlaminck ID and Dekker C (2012). Recent Advances in Magnetic Tweezers. *Annual Review of Biophysics* 41(1): 453–472.

## Removal of certain dyes in aqueous media by using Bardakçı clay

Ali Rıza Kul<sup>1</sup>, Hülya Koyuncu<sup>2</sup>, Adnan Aldemir<sup>3,\*</sup>, Hasan Elik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Science, Chemistry Department, 65080, Van, Turkey

<sup>2</sup>Bursa Technical University, Faculty of Engineering And Natural Sciences, Chemical Engineering Department, 16310, Bursa, Turkey

<sup>3</sup>Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department, 65080, Van, Turkey

\*Corresponding author e-mail: adnanaldemir@yyu.edu.tr

### Abstract

Malachite green (MG), a cationic dye, has triarylmethane structure. It is used as anti-fungal agent in aquaculture. However, it has toxic effects and there is a grave concern regarding its use. Because it has harmful effects on human beings and animals, it is necessary to remove MG from aqueous solution. Adsorbents reported for MG removal from wastewaters include breadnut skin, sawdust, hydrochar and rice husk. In this study natural clay from Bardakçı/Van region were utilized as an adsorbent for the removal of MG which is one of the common dyes, from aqueous solution in batch experiments. Effects of initial dye concentration, contact time and temperature were investigated at the adsorption experiments. Concentration of MG in dye solution determined for 240 minute with spectrophotometer at maximum absorption wavelength of 617 nm. The adsorption experiments were conducted at seven different concentrations (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ppm) and three different temperatures (298, 308, 323K). Unknown MG concentration was measured using calibration curve which was plotted between absorbance and certain concentrations of dye solutions. The data were applied to Langmuir, Freundlich and Temkin adsorption isotherms. According to the results, Freundlich isotherm model becomes more convenient option compared with other two isotherm models. Freundlich model coefficients raise as the temperature rises, showing that the adsorption process becomes favorable higher temperature. Activation parameters for instance free energy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) values were assessed. Absolute values of free energy, enthalpy and entropy values of MG onto natural clay are calculated as 3.058 kJ/mol, 17.087 kJ/mol and 62.369 J/mol.K, respectively. It was also found that natural clay has a good adsorption capacity and data demonstrate that natural clay may be an alternative material than costly adsorbents for dye removal from wastewaters.

**Keywords:** dye adsorption, malachite green, thermodynamic parameters, adsorption isotherms, Bardakçı/Van clay

### 1. INTRODUCTION

Removal of dyes from wastewater has been a challenge since long time and adsorption technique has proved best to minimize this task [1-2]. It is now well established that for the wastewater treatment, adsorption is a much better process than other physical techniques like, flocculation, froth flotation, etc. because of its efficiency and economy [3-7]. Moreover, ability of adsorption to remove toxic chemicals without disturbing the quality of water or leaving behind any toxic degraded products has augmented its usage in comparison to electrochemical, biochemical or photochemical degradation processes [8]. Recovery of costly toxic substances from the wastewater is an added advantage of the adsorption procedure.

For the past few years, the focus of the research is to utilize cheap materials as potential adsorbents and the processes developed so far are based on exploring those solid waste products, which can prove economic and bring cost effectiveness. As far as removal of Malachite Green through adsorption is concern, some solid waste materials like activated products of carbon [9-13], sugar cane dust [14], shale oil ash [15] and magnesium chloride [16], etc. have been tested as adsorbents. But most of these materials are either costly or useful in other purposes, while hen feather is an easily available waste material, which can be obtained at negligible cost. In this research tested the adsorbing ability of natural clay and exploited its use as potential adsorbent for the removal of a hazardous dye, Malachite Green. Clays, which have so far used adsorbent to remove only metal impurities from the wastewater [17-20] gave encouraging results for the dye adsorption and the same have been documented in this research.

Malachite Green, which is an important water-soluble dye belonging to triphenylmethane family. It is widely used to dye wool, silk, cotton, leather, etc. materials. In the aquaculture, commercial fish hatchery and animal husbandry it also acts as an antifungal therapeutic agent, while for humans it is used as antiseptic and fungicidal [21–23]. Its oral consumption is carcinogenic and that is why it is applied on the external wounds and ulcers [24]. The available toxicological information reveals that in the tissue of fish and mice Malachite Green easily reduces to persistable leuco-Malachite Green [25], which acts as a tumor promoter. Thus, the detection of Malachite Green in fishes, animal milk and other foodstuff, destined for human consumption, alarm the health hazards against human being [26]. Studies also confirm that the products formed after degradation of Malachite Green are also not safe and have carcinogenic potential [27-28].

In this research, we used natural clay from Bardakçı/Van region as an adsorbent for MG removal in the wastewaters by adsorption process. The Langmuir, Freundlich and Temkin adsorption isotherms equations were used to fit the equilibrium isotherm. The adsorption properties were studied by changing the influencing parameters such as initial solution concentration and contact time. The adsorption experiments were conducted at seven different concentrations and three different temperatures. Thermodynamic activation parameters for instance free energy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) values were assessed. Absolute values of free energy, enthalpy and entropy values of MG adsorption onto natural clay from Bardakçı/Van region were calculated. Finally, best isotherm model and thermodynamic parameters were determined for this adsorption.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

Malachite Green (MG), a cationic dye, has triarylmethane structure. MG (basic green, aniline green, fast green, N,N,N',N'-Tetramethyl-4,4'-diaminotriphenylcarbenium chloride, molecular formula:  $C_{23}H_{25}ClN_2$ , CAS Number: 569-64-2), supplied by Merck Chemical Company, was selected as an adsorbate and not purified prior to use. The MG molecular properties are: molar mass (364.917 g/mol), molar volume (241.9  $cm^3/mol$ ), width (14.3 Å), depth (6.1 Å), thickness (4 Å), and molecular diameter (0.8 nm), according to the ref. evaluations conducted by Pelekani and Snoeyink (Pelekani and Snoeyink, 2000).

In this study natural clay from Bardakçı/Van region were utilized as an adsorbent for the removal of MG.

The shavings from the *Salix Babylonica* which grown on the campus of Van Yüzüncü Yıl University was dried for 48 hours fresh air. Then the shavings were pounded and made very fine-grained and adsorbant shavings were prepared with 250 mesh fine sieved.

### 2.2 Experimental Method

Batch adsorption experiments were performed in the 600 ml erlenmeyer flasks 500 ml of 10, 20, 30, 40, 50 60 and 70 ppm MG solutions were prepared into respectively. Prepared solutions were mixed with magnetic stirrer by adding 1 gram of clay to each solution separately at 25 °C, 35 °C, 50 °C respectively. At different time intervals 5-10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-120-130-140-150-160-180-200-240 minutes. 5 ml samples were taken from the solutions and adsorbents were measured in UV-VIS (SHIMADZU) spectrophotometer device, at a wavelength of 617 nm using crystal cuvettes. Unknown MG concentration was measured using calibration curve which was plotted between absorbance and certain concentrations of dye solutions. These adsorbents and the remaining MG concentrations in the solutions were recorded. Equilibrium experiments were conducted for various times, while the pH was gradually adjusted by adding small amounts of diluted HCl or NaOH solutions (0.1 mol/L). All experiments were carried out in duplicate, with all data being calculated and the average values taken to represent the result. The amount of MG adsorbed per unit mass of the adsorbent was evaluated by using the mass balance Equation 1:

$$qe = \frac{(C_0 - C_e).V}{m} \quad (1)$$

where  $q$  ( $mg \cdot g^{-1}$ ) is the amount adsorbed per gram of adsorbent,  $C_0$  and  $C_e$  are the initial and equilibrium concentrations of MG in the solution ( $mg \cdot L^{-1}$ ), respectively,  $m$  is the mass of natural clay Bardakçı/Van region (g), and  $V$  (L) is the initial volume of the MG solution.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

### 3.1 Equilibrium Isotherm Modeling Studies

Adsorption isotherms provide fundamental physicochemical data to evaluate the applicability of specific adsorbents as they are used to describe how adsorbates interact with them. Several theories of adsorption equilibrium were applied for the analysis of equilibrium adsorption data. In the present work, the equilibrium adsorption data have been analyzed using the three well-known Langmuir, Freundlich and Temkin models.

### 3.2 Langmuir Isotherm Model

The Langmuir isotherm theory supposes that the adsorption comes from the monolayer coverage of adsorbate over a homogenous adsorbent surface and takes place at specific homogeneous sites within the adsorbent. Once dye molecule takes over a site, no further adsorption can take place at that one. A linear representation of the Langmuir adsorption isotherm model is given by the following equation:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2)$$

where  $C_e$  is the equilibrium concentration (mg/L) of the MG,  $q_e$  (mg/g) is the MG amount adsorbed at equilibrium,  $q_m$  (mg/g) and  $K_L$  (L/mg) are Langmuir constants related to the adsorption capacity and adsorption energy, which can be calculated from linear regression of  $C_e/q_e$  versus  $C_e$ . Langmuir isotherm results of MG adsorption on clay from Bardakçı/Van region for 298, 308 and 323 K gives at Figure 1, respectively.

### 3.3 Freundlich Isotherm Model

The Freundlich isotherm considers a heterogeneous surface of the adsorbent assuming that adsorption occurs on sites having different adsorption energy. The energy of adsorption varies as a function of surface coverage. The Freundlich model is also applicable to multilayer adsorption, and its linear representation empirical equation is expressed as follows:

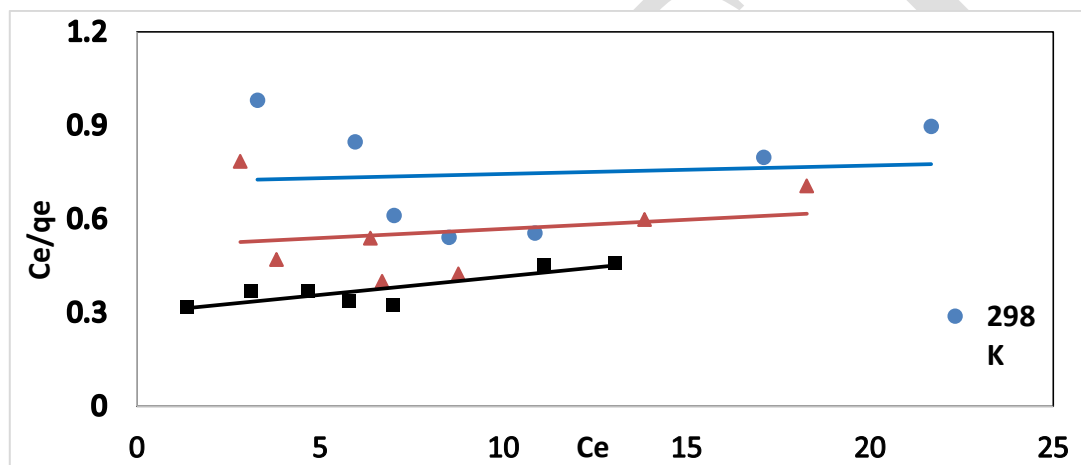


Figure 1. Langmuir adsorption isotherm for MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (3)$$

where  $K_F$  is the Freundlich constant that is related to the adsorption capacity and  $n$  is the heterogeneity factor.  $K_F$  and  $n$  constants are determined by plotting  $\ln q_e$  versus to  $\ln C_e$ .  $\ln K_F$  is obtained from the y axis of the linear line and the slope of this line gives  $1/n$ . Freundlich isotherm results of MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van region for 298, 308 and 323 K gives at Figure 2, respectively.

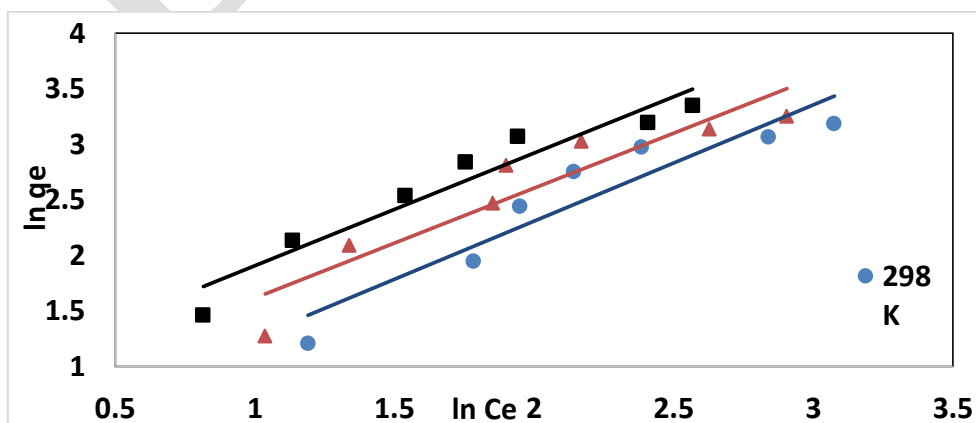


Figure 2. Freundlich adsorption isotherm for MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van



### 3.4 Temkin Isotherm Model

Temkin isotherm is modeled by assuming that the decrease in the heat of adsorption followed the linear trend rather than a logarithmic curve.

$$q_e = B \ln K_T + B \ln C_e \quad (4)$$

$B = RT / b$ ,  $T$  absolute temperature (K),  $R$  The universal gas constant (J / mol K),  $K_T$  equilibrium correlation constant (L/mg) is related to the adsorption temperature and is a constant. The increase in isotherm constants increases with the temperature of the adsorption temperature ( $B$ ), indicating that the adsorption is endothermic. Temkin isotherm results of MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van region for 298, 308 and 323 K gives at Figure 3, respectively.

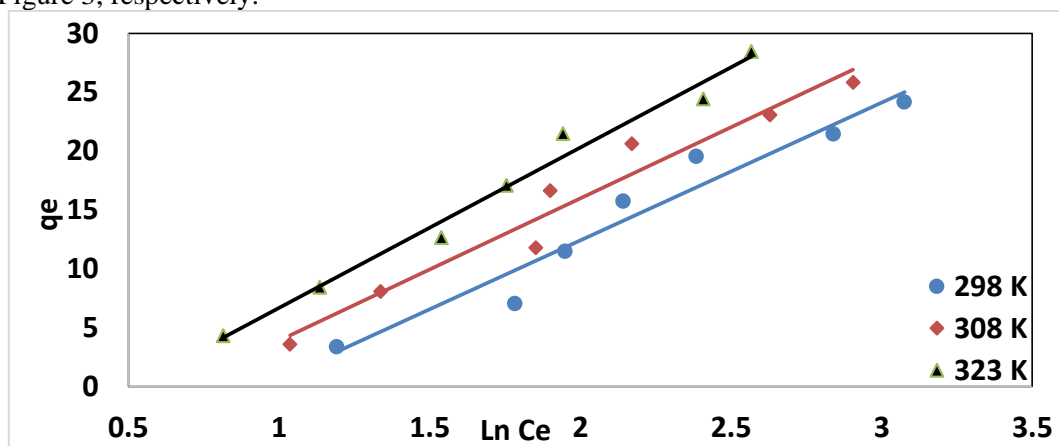


Figure 3 Temkin adsorption isotherm for MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van

Table 1. Adsorption isotherm model parameters of MG adsorption on clay from Bardakçı/Van region

Temp (K)	Langmuir			Freundlich			Temkin		
	$K_L$ (L/g)	$q_m$ (mg/g)	$R^2$	$K_F$ (L/g)	$n$	$R^2$	$K_T$ (L/g)	$B$ (J/mol)	$R^2$
298	0,5532	18,462	0,5827	1,2428	0,9568	0,9849	0,3903	11,7051	0,9454
308	1,3917	27,241	0,5908	1,8755	1,0118	0,9892	0,5079	12,8753	0,9557
323	2,7651	38,547	0,6079	3,4133	1,1665	0,9865	0,8612	11,0217	0,9435

### 3.6 Thermodynamic Studies

Thermodynamic investigation is required to determine importance of adsorption process. The thermodynamic parameters, namely free energy ( $\Delta G^\circ$ ), enthalpy ( $\Delta H^\circ$ ), and entropy ( $\Delta S^\circ$ ) are significant to determine heat change the adsorption process for MG dye on natural clay from Bardakçı/Van region. These parameters are calculated by the equations given below:

$$K_e = \frac{C_{Ads}}{C_e} \quad (7)$$

$$\ln K_e = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT} \quad (8)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (9)$$

where,  $K_e$  is the equilibrium constant,  $C_{Ads}$  represents the dye amount adsorbed mg on the kaolin per liter of the solution at equilibrium, adsorbent of adsorbent per unit liter of solution and  $C_e$  is the equilibrium concentration of dye in the solution (milligrams per liter).  $R$  is the universal gas constant (8.314 J/mol K) and  $T$  is the temperature (K).  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  parameters are calculated from the slope and intercept of the plot natural logarithm of  $K_e$  versus  $1/T$  given in Figure 4. Calculated thermodynamic parameters were listed in Table 2.

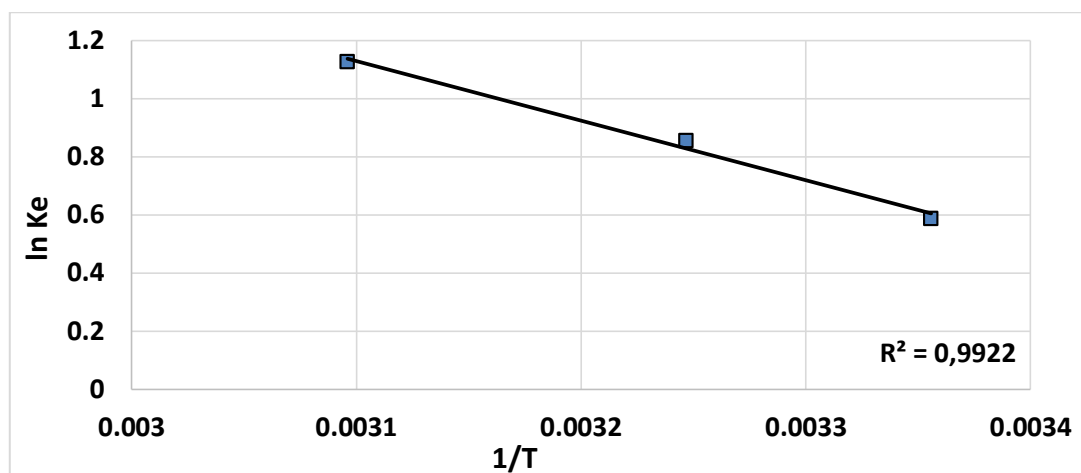


Figure 4. Van't Hoff plot for the adsorption of MG on natural clay from Bardakçı/Van

Table 2. Thermodynamic parameters of MG adsorption on natural clay from Bardakçı/Van region

Temp (K)	Ke	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (J/mol.K)	R <sup>2</sup>
298	0,5889	-1.4989			
308	0,8561	-2.1226	17.087	62.369	0.992
323	1,1271	-3.0582			

#### 4. CONCLUSION

In this study natural clay from Bardakçı/Van region were utilized as an adsorbent for the removal of MG which is one of the common dyes, from aqueous solution in batch process. Concentration of MG in dye solution determined for 240 minute with spectrophotometer at maximum absorption wavelength of 660 nm. The adsorption experiments were conducted at six different concentrations and different temperatures. Unknown MG concentration was measured using calibration curve which was plotted between absorbance and certain concentrations of dye solution. The data were applied to Langmuir, Freundlich and Temkin adsorption isotherms. According to the experimental results, Freundlich isotherm model becomes more convenient option compared with other three isotherm models. Freundlich model coefficients raise as the temperature rises, showing that the adsorption process becomes favorable higher temperature. Activation parameters for instance free energy ( $\Delta G$ ), enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy ( $\Delta S$ ) values were assessed. Absolute values of free energy, enthalpy and entropy values of MG onto natural clay from Bardakçı/Van region are calculated as 3.058 kJ/mol, 17087 J/mol and 62.369 J/mol.K, respectively. It was also found that natural clay from Bardakçı/Van region has a good adsorption capacity for dye removal. Experimental data demonstrate that natural clay may be an alternative material than costly adsorbents such as active carbon for dye removal in wastewaters.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research is supported by the Van Yüzüncü Yıl University, Scientific Research Projects Department (Project Name: Removal of Certain Dyes in Aqueous Media By Using Bardakçı Clay, Project Number: FAP-2018-7614)

#### REFERENCES

- [1] D.M. Ruthven, 1984, Principles of Adsorption and Desorption Processes, John Wiley and Sons, New York.
- [2] M. Suzuki, 1993, Fundamentals of Adsorption IV, Kodansha, Tokyo.
- [3] S.E. Bailey, T.J. Plin, R.M. Bricka, D.D. Adrain, 1999, A review of potentially low cost sorbents for heavy metals, Water Res. 33: 2469–2479.
- [4] P. MacCarthy, R.W. Klusman, S.W. Cowling, J.A. Rice, 1995, Water analysis, Anal. Chem. 67: 525–582.
- [5] F.L. Slejko, 1985, Adsorption Technology: A Step-by-Step Approach to Process Evaluation and Applications, Marcel Dekker, New York.
- [6] I.H. Suffet, M.J. McGuire, 1980, Activated carbon adsorption of organics from aqueous phase, Ann. Arbor Sci. Mich. 1–2.

- [7] L.B. Franklin, 1991, Wastewater Engineering: Treatment Disposal and Reuse, McGraw Hill Inc., New York.
- [8] V.K. Gupta, I. Ali, in: A. Hubbard, 2002, Adsorbents for Water Treatment: Low-cost Alternatives to Carbon, vol. 1, Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Marcel Dekker, USA, 136–166.
- [9] G.M. Walker, L.R. Weatherley, 1999, Kinetics of acid dye adsorption on GAC, Water Res. 33 (8): 1895–1899.
- [10] V.K. Gupta, S.K. Srivastava, D. Mohan, 1997, Equilibrium uptake, sorption dynamics, process optimization and column operations for the removal and recovery of malachite green from wastewater using activated carbon and iron slag, Ind. Eng. Chem. Res. 36 (6): 2207–2218.
- [11] V.K. Gupta, A. Mittal, L. Krishnan, V. Gajbe, 2004, Adsorption kinetics and column operations for the removal and recovery of malachite green from wastewater using bottom ash, Sep. Purif. Technol. 40: 87–96.
- [12] Y. Al-Degs, M.A.M. Khraisheh, S.J. Allen, M.N. Ahmad, 2000, Effect of carbon surface chemistry on the removal of reactive dyes from textile effluent, Water Res. 34 (3): 927–935.
- [13] A.R. Shawwa, D.W. Smith, D.C. Sego, 2001, Color and chlorinated organics removal from pulp mills wastewater using activated petroleum coke, Water Res. 35 (3): 745–749.
- [14] S.D. Khattri, M.K. Singh, 1999, Colour removal from dye wastewater using sugar cane dust as an adsorbent, Adsorption Sci. Technol. 17 (4): 269–282.
- [15] S. Al-Asheh, F. Banat, D. Al-Rousan, 2002, Adsorption of copper, zinc and nickel ions from single and binary metal ion mixtures on to chicken feathers, Adsorption Sci. Technol. 20: 849–864.
- [16] F. Banat, S. Al-Asheh, D. Al-Rousan, 2002, Comparison between different keratin-composed biosorbents for the removal of heavy metal ions from aqueous solutions, Adsorption Sci. Technol. 20: 393–416.
- [17] S. Al-Asheh, F. Banat, D. Al-Rousan, 2003, Beneficial reuse of chicken feathers in removal of heavy metals from wastewater, J. Cleaner Prod. 11: 321–326.
- [18] D.I. Ishikawa, K. Suyama, 1998, Recovery and refining of Au by gold-cyanide ion biosorption using animal fibrous proteins, Appl. Biochem Biotech A: Enzyme Eng. Biotechnol. 72: 719–728.
- [19] S.J. Culp, L.R. Blankenship, D.F. Kusewitt, D.R. Doerge, L.T. Mulligan, F.A. Beland, 1999, Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F(1) mice, Chem.-Biol. Interact. 122 (3):153–170.
- [20] D.J. Alderman, 1985, Malachite green—a review, J. Fish Dis. 8 (3): 289–298.
- [21] Y. Sawa, M. Hoten, 2001, Antibacterial activity of basic dyes on the dyed acrylic fibers, Sen-I Gakkaishi 57 (5): 153–158.
- [22] R.S. Clifton-Hadley, D.J. Alderman, 1987, The effects of malachite green upon proliferative kidney-disease, J. Fish Dis. 10 (2) 101–107.
- [23] S.J. Culp, F.A. Beland, 1996, Malachite green: a toxicological review, J. Am. Coll. Toxicol. 15 (3) 219–238.
- [24] S.J. Srivastava, N.D. Singh, A.K. Srivastava, R. Sinha, 1995, Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, Heteropneustes Fossilis, Aquat. Toxicol. 31 (3): 241–247.
- [25] S. Singh, M. Das, S.K. Khanna, 1994, Biodegradation of malachite green and rhodamine-b by cecal microflora of rats, Biochem. Biophys. Res. Commun. 200 (3): 1544–1550.
- [26] S. Srivastava, R. Sinha, D. Roy, 2004, Toxicological effects of malachite green, Aquat. Toxicol. 66: 319–329.
- [27] K. Wu, T. Zhang, J. Zhao, H. Hidaka, 1998, Photodegradation of malachite green in the presence of  $Fe^{3+}/H_2O_2$  under visible irradiation, Chem. Lett. 8: 857–858.
- [28] C. Hachem, F. Bocquillon, O. Zahraa, M. Bouchy, 2001, Decolourization of textile industry wastewater by the photocatalytic degradation process, Dyes Pigments 49 (2): 117–125.

## Pliyosen yaşlı Afşin-Elbistan kömür havzasının (Kahramanmaraş, Güney Doğu Anadolu) biyostratigrafisi (palinoloji)

Menderes Çenet  
OKU Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Osmaniye-Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: mcenet@osmaniye.edu.tr

### Özet

Pliyosen yaşlı Afşin-Elbistan (Kahramanmaraş) kömür havzası, limnik kil ve gıyda serilerinde, derinliği 50-100 m arasında olan bir veya iki linyit horizonu oluşmuştur. Linyit serisi içine humuslu-kömürlü limnik sedimanlar yerleşmiştir (Haktanır ve Karaca, 1996). Çalışma alanında Emydidae, *Castor prae fiber*, Gerbillinae, *Promimomys* sp. ve *Mimomys* sp. hayvan fosilleri Becker-Platen, (1970) ve Becker-Platen at all., (1975) tarafından saptanmıştır.

29 linyit ve kil örneklerinin palinolojik topluluğu 36 cinsten oluşmaktadır. Bunlardan 3 cins sporlara ait, 33 cins ise polenlere ait olarak tanımlanmıştır. Dikotiledon sınıfı 24 cins ile en fazla taksona sahiptir. Çalışma alanımızdaki polen birliği aynı yaştaki Akça polen birliği (Eskişehir) Benda (1971) ile korelasyon göstermektedir.

Memeli fosilleri sulak alanlar(göl), orman ve otsul alanları simgeler. Otsu bitkilere ait polenlerin, Miyosen'e nazaran daha yüksek oranda çıkması (% 50) olasılıkla geniş çayırlıkların varlığını düşündürmektedir. Bu doğrultuda, çökelim havzasını çevreleyen dağların ormanlarla kaplı olduğunu, ovalık kesimdeki açık alanların ağaçlı savan formasyonu ile kaplı olduğunu yansıtır. Polypodiaceae, Lycopodium ve Sphagnum sporlarının ve özellikle Taxodiaceae, Umbelliferae, Cycadaceae ve Cupressaceae polenlerinin nispeten yüksek oranda bulunuşu, nemli ve ılıman bir iklimi gösterir.

Benda (1971) tarafından yapılan Kızılhisar ve Akça havzasında (Eskişehir) gerçekleştirilen çalışma Türkiye'de Pliyosen yaşlı tek çalışma olduğu için, Sporomorflar üzerine yaptığımız çalışma ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçta flora bileşenlerinin bizim çalışmamızla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyostratigrafi, Paleokoloji, Palinoloji, Pliyosen, Afşin-Elbistan (Kahramanmaraş)

### Biostratigraphic data (palynology) from the Pliocene Formation at Afşin-Elbistan coal basin (Kahramanmaraş, South East Anatolia)

#### Abstract

The pliocene aged Afşin-Elbistan coal reserve, which was deposited in the limnic clay and humus plus coals series, was consisted of either one or two lignite horisones having a depth between 50 and 100 m. The sediments including humus plus coals deposited in the series of limnics (Koçak, vd., 2003).

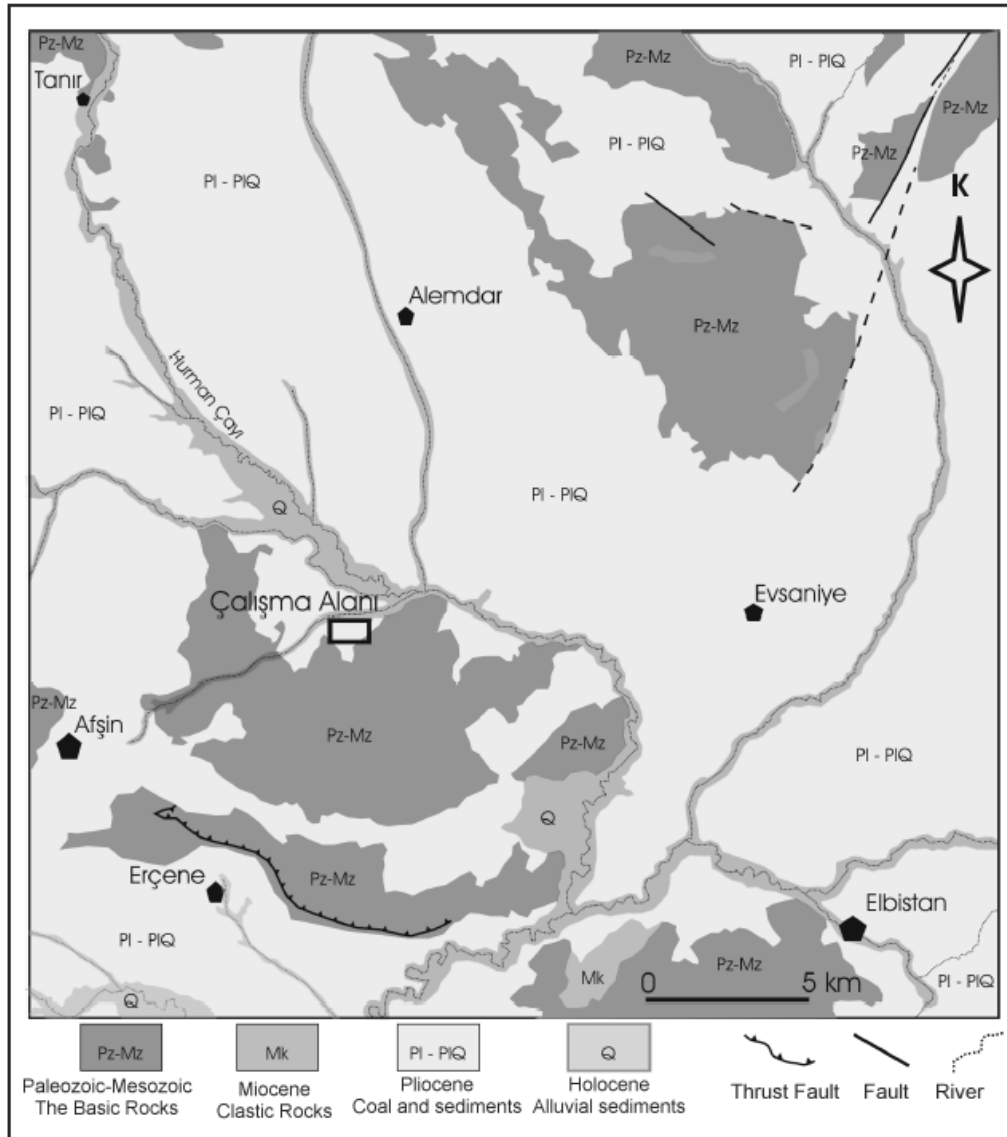
The pollens herein showed a correlation to those found in the Akça (Eskişehir) (Benda, 1971). A limited number of fauna including Emydidae, *Castor prae fiber*, Gerbillinae, *Promimomys* sp. and *Mimomys* sp. were described herein. We have identified 3 families belonging to Pteridophyta, 5 families belonging to Gymnospermae and 21 families belonging to Angiospermae. 43 genus belonging to these 29 families. Out of these, % 49 is woody, % 50 is herbaceous and % 1 indetermine forms. Of the investigated genera, a total 24 genus were predominatly found in the class of dycotyledons. Furthermore, The record of mammalian fossils in the coal basins might indicate the occurence of the wetland, forestry and herbaceous plants evolved in that region. The high percentage of the pollens of herbaceous plants when compared to the Miocene period might indicate the presence of wide meadows. Hence, it might reflect the presence of trees in the mountains surrounding the sediments. Or else, it might reflect forestry savannah formation in the wide areas of the flatland. The presence of the spores of Polypodiaceae, Lycopodium and Sphagnum and the high percentage of the pollens of Taxodiaceae, Umbelliferae, Cycadaceae ve Cupressaceae might indicate the moisture and temperate climate in the coal reserves.

Akca and Kızılhisar basin (Eskişehir) by Benda (1971) made studies conducted in Turkey because it is the only study of Pliocene, has been associated with the work we are doing on sporomorph. As a result, the flora components were consistent with our study.

**Keywords:** Biostratigraphy, Paleocology, Palynology, Pliocene, Afşin-Elbistan (Kahramanmaraş)

## GİRİŞ

1989 yılı TKİ rakamlarına göre sahanın görünür rezervi; 3.357.340.000 tondur. Türkiye'nin en büyük linyit rezervini oluşturmaktadır. (Gökmen vd., 1993). Bu bölgede daha önce yapılan çalışmalar; Becker-Platen (1970), Becker-Platen at all. (1977) tarafından yapılmış paleontolojik çalışmalar olup; Emydidae, *Castor praefiber*, Gerbillinae, *Promimomys* sp. veya *Mimomys* sp. oluşan az sayıda çeşit içeren bir fauna tanımlanmıştır. Benda ve Meulenkamp (1979), çalışmasında Afşin-Elbistan kömür havzasını Pliyosen dönem içerisine koymaktadır. Gürsoy ve diğ. (1981); Çöllolar, Hurman ve Sinekli köyleri arasında kalan sahanın Linyit damarlarından alınan numunelerden, linyitin yaşını Pliyosen olarak belirlemiş, gıdya birimi içinde bulunan Ostrocod'lara göre çökeller için Pliyo-Pliyostenen yaşını vermişlerdir. Ayrıca; Benda (1971) tarafından yapılan Kızılhisar ve Akça kömür havzasında (Eskişehir) gerçekleştirilen çalışma Pliyosen yaşlıdır ve Türkiye'de bu yaşta yapılan tek paleopalinojik çalışmadır.



Şekil 1. Afşin - Elbistan kömürlü Neojen havzasının jeolojik konumu (Perinçek ve Kozlu, 1983'ten sadeleştirilerek alınmıştır).

**Stratigrafi** ; Tarhan (1984) ise, kumtaşı, kiltası, marn, gösel kireçtaşı, çakıltası, tüfit, çamurtaşı ve kömür düzeylerini kapsayan (Afşin linyitleri) Pliyosen yaşlı istifini Nadir formasyonu olarak adlandırmaktadır.

Pleyistosen yaşlı kömürlü seri ise bu taban serilerinin üzerine diskordan olarak gelmekte olup tabanda çakıllı, kumlu seviyeler ile başlar, üste doğru kil, kömür, marn ve kireçtaşı seviyeleri içerir.

a- Neojen öncesi kayaçlar; Permo-Karbonifer kireçtaşı-dolomit, Üst-Kretase kireçtaşı, Eosen nummulitli kireçtaşı ve ofiolitlerden (serpantin) oluşan Neojen öncesi kayaçlar, Neojenin temelini teşkil etmektedir.

b- Neojen formasyonları; Neojen formasyonları altta, marn ve kum (Miosen) üstte linyitli zonunda bulunduğu limnik teşekküller (Plio-Pleistosen) olmak üzere iki bölümde incelenmektedir.

c- Neojen sonrası çökeller (Kuvaterner); Neojen sonrası çökeller genel olarak fluvial fasiyesteki çakıllar, kumlar balçıklar şeklindedir (Koçak, vd., 2003). (Şekil 2)

ERA	PERIOD	EPOCH	SYMBOL	Thickness (m)	STACK	EXPLANATIONS	
CENOZOIC	QUATERNARY	Pleistocene - Holocene	Qal	20		Recent alluvial sediments Discordance	
			Qkm	100-150		Older river sediments: Conglomeratic alluvial cone sediments Sandstone and Pebble (River) Pebble and Sandstone Discordance	
		TERTIARY	Pliocene	Pikç	20		Freshwater carbonate rocks
				Pik	50		Upper clay and marn
				Pig	100		Coal thickness ranging from 1 to 58 meters and 78 meters in thickness reaching Gidya
	Eocene	Miocene	Pim	100		Mudstone - Marn Sequence	
			Mk	50		Discordance Carbonate Rocks dominant Clastic Rocks	
	MES.			Ek	40		Discordance Sandstone - Mudstone - Marn Sequence Discordance
				Mzi			Mesozoic and older rocks community: the Basic Rocks

Şekil 2- Afşin Kömür Havzasının geliştirilmiş stratigrafik sütun kesiti, Çiftçi Y.ve Toker, C. E., (2007)

### MATERYAL VE METOD

İnceleme materyali olarak kömür ana damarından dikey yönde 29 adet kömür ve kil örnekleri alınmıştır. Afşin-Elbistan (Kahramanmaraş) Kömür Havzasının Paleokolojik yönden incelenmesi amacı ile, kömür ana damarından dikey yönde 1 metre ara ile toplam 39 adet kömür ve kil örneği alınmıştır (Şekil 1). Bu örneklerden 29 tanesinde sporomorflar görülürken 10 tanesinin steril olduğu belirlenmiştir.

Tanımlamalar da taramalar için kullanılan Olympus BX50 mikroskobu ile yapılmış ve bu sporomorfların fotoğrafları aynı mikroskobun 10x40'lik büyütme ile çekilmiştir (Şekil 3). Sporomorfların tayinleri için başlıca Thompson ve Pflug (1953), Krutzsch (1970-1971), Hochuli (1978), Chester ve Raine (2001) Nagy (1999) kullanılmıştır.

### SONUÇ

**Paleoekoloji;** Odunsu bitkilerin % 49 oranında bulunması, o dönemde baskın formasyonun orman olduğunu göstermektedir. Ancak otsu bitkilerin de, Miyosen'e nazaran daha yüksek oranda (% 50) çıkması, havzada olasılıkla geniş çayırılıkların varlığını düşündürmektedir. Avrupa geç Miyosen vejetasyonu sıcak iklim etkisi altında gelişen kurak step alanlar ve seyrek ormanlar ve Akdeniz iklimi etkisi altındaki çayırlara doğru ilerler. (Kovar-Eder 1987; Nagy 1990; Rivas-Carballo 1991).

Çalışma alanımızda; Pteridophytes içinde Polypodiaceae sporları % 10,31, Gymnosperm'ler içinde en yüksek yüzdelerle temsil eden bitkiler; Cupressaceae % 12,51, Taxodiaceae % 8,16, Cycadaceae % 7,

Angiospermae'den ise; Umbelliferae % 9,2, Fagaceae % 8,1, Sparganiaceae % 6,52, Chenopodiaceae % 5,72, Gramineae % 4,77, Nymphaeaceae % 4,45, Compositae % 1,76 dir, (Tablo 1.).

Subtropik iklim bitkileri; Cupressaceae, Umbelliferae, Chenopodiaceae, Nymphaeaceae, Compositae  
Boreal iklim bitkileri; Polypodiaceae, Taxodiaceae, Fagaceae, Sparganiaceae, Sphagnum, Larix'dir.

Elde edilen bulgular ışığında Afşin-Elbistan ovasında kömür oluşum süreci başında bir gölün var olduğunu düşündürmektedir. Gölün içerisinde dominant olarak, Sparganiaceae, gölün yüzeyinde ise Nymphaeaceae, göl kenarındaki alanlarda ise; Cupressaceae, Taxodium, *Sequoia*, and Sparganium/Typha *Myrica*, *Platanus* / *Salix* gibi Aquatik Angiospermiler bulunmuş olmalıdır.

Ancak zamanla Sparganiaceae üyelerinin azaldığı, bataklık bitkilerinden Chenopodiaceae üyelerinde görülen büyük artışı gölün su seviyesinin zaman içerisinde azalarak bataklığa dönüştüğü, ayrıca yağışlı ve kurak dönemlerin başladığına işaret etmektedir.

Gölün çevresinde ovalık kesimdeki çok geniş alanları kaplayan ağaçlı bir savandan söz edebiliriz. Bu savanda bol miktarda Umbelliferae, Gramineae, Compositae, Chenopodiaceae ile az miktarda Ephedraceae, Labiatae, Malvaceae ve Dipsacaceae gibi otsu formların yanında Taxodiaceae, *Sequoia*, Fagaceae (*Quercus*, *Fagus*, *Castanea*), Cycadaceae ve *Pterocarya* (Juglandaceae) üyelerinden oluşan ağaç toplulukları bulunmuş olmalıdır.

Dağların yüksekliğinin 3000m lerde olduğu ve bu kesimlerde Pinaceae üyeleri, (*Pinus haploxyton type*, *P. sylvestristype*, *Cedrus* sp. ve *Larix* sp oluşmuş bir ormandan söz edebiliriz. Bulduğumuz sonuçlar dağların alt ve orta kesimlerinde muhtemelen *Fagus* cinsine (*Tricolpopollenites asper*) ve *Quercus* cinsine (*Tricolpopollenites microhenrici*) geniş yapraklı ve *Pinus haploxyton type* gibi ibrelili karışık ormanların varlığını düşündürmektedir.

## TARTIŞMA

Gemici (1993)'ye göre; Pliyosen'de Türkiye'nin iklim ve vejetasyon özellikleri; Pliyosen başından itibaren iklimde soğuma eğilimi görülmüştür, tropik iklim yerini subtropik iklime terk etmiştir. Buna bağlı olarak da ağaçlı savan gelişmiştir. Olasılıkla ılıman kuşak geniş yapraklı-ibrelili karışık ormanları mevcuttur.

Umbelliferae, Compositae, Chenopodiaceae, Cycadaceae, Cupressaceae, *Quercus*, *Sequoia*., Taxodiaceae üyelerinin bol ve sürekli oluşu iklimin subtropik ılıman ve nemli olduğunu desteklemektedir (Kovar-Eder 1987; Traverse 1988; Benda & Meulenkamp 1990; Nagy 1990; Rivas-Carballo 1991).

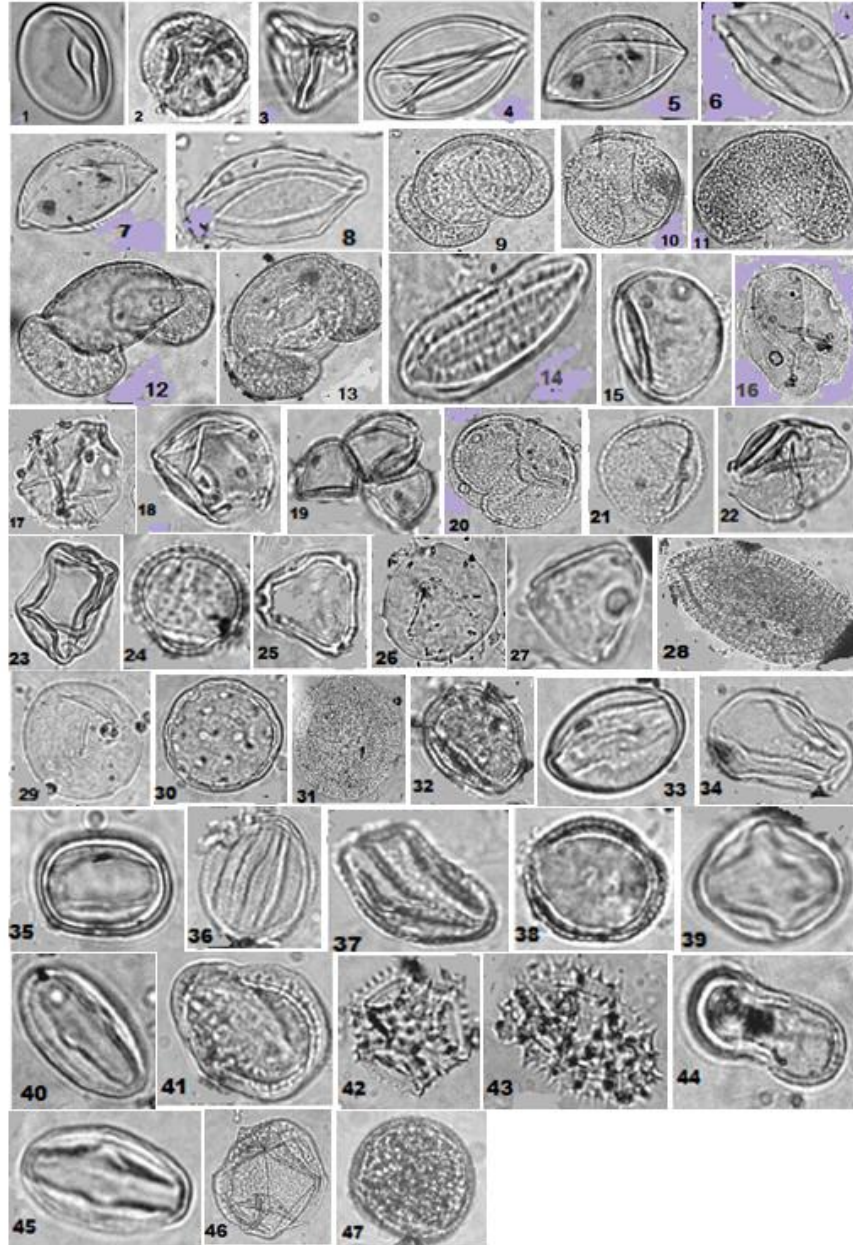
Angiosperm polenleri yüzdesi yüksek fakat saccat Gymnosperm polenlerinin yüzde miktarı düşük çıkmıştır. Crete'deki Castello Tepesinde Benda et al. (1974a) Kızılhisar'daki karakteristik özelliği göstermektedir. Bu çalışma geç Miyosen birliği için önemli otsu Angiospermilerin izafi frekansının karşılaştırılması açısından önemlidir. Umbelliferae formları Pliyosen'in gelişini haber vermektedir. Bizim çalışmamızda Geç Tersiyer Floraya ait Cupressaceae ve Umbelliferae üyelerine ait formların bol bulunması bu görüşümüzü desteklemektedir.

Orta Miyosen'de (Kızılhisar) ağaç çeşidi çok, savanlar az yer kaplarken (Akgün ve Akyol, 1999), Üst Miyosen'e ait Hafik (Akgün vd., 2000) ve Bigadiç (Akyol ve Akgün 1992) otsu formlar ve savan artar ve iklim serin kurak olarak tanımlanır. Ayrıca Gymnospermilerin giderek azalması ve otsu bitkilerin daha fazla çıkması, bulduğumuz sonucu desteklemektedir. Buna karşın çalışma alanımızın iklimi bitki örtüsüne bakıldığında, farklı olarak serin kurak yerine ılıman ve nemli olduğunu söyleyebiliriz. Özellikle Polypodiaceae, , Umbelliferae, *Quercus*, *Castanea*, Cyrtaceae, başta olmak üzere, Juglandaceae, *Tilia*, Oleaceae, Myricaceae, Cycadaceae, *Pterocarya* ve Coniferae'den Cupressaceae, *Taxodium*, *Sequoia*, *Pinus* (haploxyton tip) bitkilerinin egemen olduğunu, bu topluluğa pek ender olarak katıldığı için bölgenin ılıman ve nemli bir dönem geçirdiğini söyleyebiliriz.

Bir diğer önemli sonuç ise Pliyo-Pleyistosen dönemlerinde Türkiye vejetasyonunun yatay ve dikey hareketleri ile ilgilidir. Güney Anadolu'da Amanos Dağları'nda çok sayıda Avrupa-Sibirya elementinin varlığı bilinmektedir. Halen çalışma alanımıza yakın Pınarbaşı (Kayseri) sarıçam, Andırın (Kahramanmaraş) ve Çokak civarında *Fagus orientalis* *Cornus mas*, *Taxus baccata*, *Buxus sempervirens* gibi kuzey yayıllı türlerin bulunması, büyük olasılıkla Pliyo-Pleyistosen döneminden kalmıştır. Ayrıca bu dönemde Anadolu Diyagonalı aracılığıyla çok sayıda Avrupa-Sibirya elementi güneye, Akdeniz elementi kuzeye geçmiş olmalıdır. Çalışma alanımızda mevcut İran-Turan flora elementlerinin ise buzullaşma sonrası, Holosen'den geldiği düşünülebilir. Buna karşılık Toros ve Antitoroslardaki Boreal-Alpin elementlerin ise Pleyistosen'in soğuk dönemlerinde gelmiş olduğunu öngörmekteyiz.

Tablo 1. Tespit edilen bitki gruplarının % oranları

	FAMİLYA	CİNS SAYISI
Sporlar	% 16,04	3
Gymnospermae	% 26,68	9
Gymnospermae Saccat Pollen Nonsaccat	% 1,74	5
Gymnospermae Non-Saccat Pollen	% 24,94	4
Angiospermae	% 57,25	24
Monocotiledones	% 18,91	4
Dicotiledones	% 38,34	20
Toplam	% 100	36



Şekil 3. Tespit edilen sporomorfların mikrofotografarı



- 1- *Laevigatosporites haardti* Thomson & Pflug (25x30 µm)
- 2- *Reticulatisporites caelatus* Thomson & Pflug (20x50 µm)
- 3- *Stereisporites steroides* Thomson & Pflug (20x30 µm)
- 4- *Cycadopites instrastructus* Krutzsch (23x55 µm)
- 5- *Cycadopites lusaticus* Krutzsch (42x20 µm)
- 6- *Cycadopites minimus* Krutzsch (25 µm)
- 7- *Cycadopites minitus* Krutzsch (16 µm)
- 8- *Cycadopites sculptigracilis* Krutzsch (35 µm)
- 9- *Cedripites dacrydioides* Krutzsch (68 µm)
- 10- *Cedripites miocaenicus* Krutzsch (68 µm)
- 11- *Piyosporites labdacus* Thomson & Pflug (76 µm)
- 12- *Pityosporites labdacus* ssp. *reticulatus* Thomson & Pflug (76 µm)
- 13- *Pityosporites microalatus* Thomson & Pflug (85 µm)
- 14- *Ephedripites eocenipites* Krutzsch (68x21 µm)
- 15- *Graminidites crassiglobosus* Krutzsch (25 µm)
- 16- *Graminidites pseudogramineus* Krutzsch (51 µm)
- 17- *Graminidites soellichauensis* Krutzsch (40 µm)
- 18- *Graminidites subtiliglobosus* Krutzsch (25 µm)
- 19- *Sparganiaceapollenites neogenicus* Krutzsch (33 µm)
- 20- *Sparganiaceapollenites polygonalis* Krutzsch (25 µm)
- 21- *Sparganiaceapollenites magnoides* Krutzsch (35 µm)
- 22- *Cyperaceapollenites neogenicus* Krutzsch (34 µm)
- 23- *Magnolipollis neogenicus* Krutzsch (38 µm)
- 24- *Monogemmites pseudosetarius* Krutzsch (24 µm)
- 25- *Myrtaceidites mesonesus* (20x25 µm)
- 26- *Polyporopollenites undulosus* (Wolff) Thomson & Pflug (40 µm)
- 27- *Triatriopollenites butiutus* Thomson & Pflug (18x30 µm)
- 28- *Dipsacus laciniatus* Chester & Raine (62 µm)
- 29- *Multiporopollenites maculosus* Thomson & Pflug (35 µm)
- 30- *Periporopollenites multiporatus* Thomson & Pflug (23x26 µm)
- 31- *Malvaceae* Chester & Raine (65 µm)
- 32- *Tricolpopollenites retiformis* Thomson & Pflug (21 µm)
- 33- *Tricolpopollenites microhenrici* Thomson & Pflug (24 µm)
- 34- *Tricolpopollenites* cf. *asper* Thomson & Pflug (30x38 µm)
- 35- *Tricolpopollenites libarensis* subsp. *fallax* Thomson & Pflug (18x15 µm)
- 36- *Prunella* sp. Chester & Raine (25x30 µm)
- 37- *Sherardia arvensis* Chester & Raine (32 µm)
- 38- *Tricolporopollenites oleoides* Krutzsch & Vanhoorne (22 µm)
- 39- *Tricolporopollenites megaexactus* Thomson & Pflug (13x18 µm)
- 40- *Tricolporopollenites cingulum* Thomson & Pflug (13x18 µm)
- 41- *Tricolporopollenites microreticulatus* Thomson & Pflug (23x27 µm)
- 42- *Tricolporopollenites* cf. *liguliflorae* Hochuli (25x30 µm)
- 43- *Tricolporopollenites* cf. *tubuliflorae* Hochuli (30x60 µm)
- 44- *Umbelliferaepollenites peissenbergensis* Kirschner (25x12 µm)
- 45- *Umbelliferaepollenites nogradensis* Nagy (19x30 µm)
- 46- Indeterminate form 1 (60 µm)
- 47- Indeterminate form 2 (26x30 µm)

## KAYNAKLAR

- Akgün, F., 1992, Palynological age revision of the Neogene Soma coal basin, Bull.Geol.Soc.Greece, XXVIII/3, Athens, 151-70.
- Akgün, F. ve Akyol E., 1992, Yukarıkaşıkara ve Yanıkkaya (Isparta) kömürlerinin karşılaştırmalı palinostratigrafisi ve paleoekolojisi, Türkiye Petrol Jeologları Derneği Bült., 4(1), Ankara, 13-25.
- Akgün, F. Alışan C. ve Akyol E., 1986, Soma Neojen stratigrafisine palinolojik bir yaklaşım, Türkiye Jeol. Kurumu Bült. 29, Ankara, 13-25.
- Akgün, F., Kaya, T., Forsten, A. ve Atalay, Z., 2000, Biostratigrafic data from the upper miocene İncesu formation at Düzyayla, Turkish Journal of Earth Science vol 9, p. 57-67
- Akyol, E. ve Akgün, F. (1992), Bigadiç, Kestelşek, Emet ve Kırka Boratlı Neojen tortullarının palinolojisi ve karşılaştırılması, Maden Tetkik Arama Derg., 11, Ankara, 165-73.
- Akyol, E. ve Akgün, F., 2000, Seyitoğlu G. ve Şen, Ş. (1999) in discussion on
- Akgün, F. and Akyol, E., 1999, "Palynostratigraph of the coal bearing neogene deposits in Büyük Menderes graben, Western Anatolia, geobios 23.06.915" başlıklı yazısına yanıt, yer bilimleri geosund sayı 37.
- Arslan, R., 1979, Kütahya-Tunçbilek sahasındaki sondaj örneklerinin palinolojik incelenmesi, Türkiye Jeol. Kur. Bült., 22, 1, 135-41.
- Becker-Platen, J.D., 1970, Lithostratigraphische Untersuchungen im Känozoikum Südwest-Anatoliens (Türkei), Beih. Geol. Jb., 97, 244p.
- Becker-Platen, J.D., Benda, L. und Steffens, P., 1977, Litho-und biostratigraphische deutung radiometrischer altersbestimmungen aus dem Jungtertiar der Türkei (Kanozoikum und Braunkohlen der Türkei, 18), Geol. Jahr., B 25, 139-67.
- Becker-Platen, J.D., Sickenberg, D.Q. und Tobien, H., 1975, Die Gliederung der Kanozoischen Sedimente der Türkei nach Vertebraten Faunengruppen, Geol.fahr., Reihe B, Heft 15-pp. Hannover, 19-45. Vetebreten: Lokalfaunen der Türkei und ihre Altersstellung, Ibid, pp 47-101.
- Benda, L., 1971 a), Principles of the palynologic subdivision of the Turkish Neogene (Kanozoikum und Braunkohlen der Türkei, 3), Newsl. Stratigr., 1(3), Leiden, 23-6.
- Benda, L., Hessian, K. und Steffens, P., 1975, The Stelling der Vertebraten-Faunengruppen der Türkei innerhallo der chronostratigraphischen systeme von Tethys und Paratethys, Ibid, pp109-117.
- Benda, L., 1971 b), Grundzüge einer polenanalytischen Gliederung des türkischen Jungtertiärs (Kanozoikum und Braunkohlen der Türkei, 4), Beih.Geol.Jb., 113, Hannover, 46p.
- Benda, L. und Meulenkamp, J.E., 1990, Biostratigraphic correlations in the Eastern Mediterranean Neogene 9. Sporomorph associations and event stratigraphy of the Eastern Mediterranean Neogene, Newsl. Stratigr., 23(1), Berlin-Stuttgart, 1-10.
- Benda, L., Meulenkamp J.E. und Zachariasse, W.J., 1974, Biostratigraphic correlations in the Eastern Mediterranean Neogene 1. Correlation between planctonic foraminiferal, uvigerinid, sporomorph and mammal zonations of the Cretan and Italian Neogene, Newsl. Stratigr., 3(3), Leiden, 205-217.
- Benda, L., Innocenti, F., Mazzuoli, R., Radicati, F. and Steffens, P., 1974, Stratigraphic and radiometric data of the Neogene in Northwest Turkey (Cenozoic and Lignites in Turkey, 16), Z.Deutsch.Geol.Ges., 125, Hannover, 183-93.
- Benda, L., Meulenkamp, J.E., Schmidi, R.R., Steffens, P. and Zachariasse W.J., 1977, Biostratigraphic correlations in the Eastern Mediterranean Neogene 2. Correlation between sporomorph associations and marine microfossils from the Upper Oligocene-Lower Miocene of Turkey, Newsl. Stratigr., 6(1), Berlin-Stuttgart, 1-22.
- Benda, L., Meulenkamp, J.E., Meyer K.J., Weerd, A.V., 1987, Biostratigrafic correlations in the eastern mediterranean neogene, Gebruder Bainteger, D-1000, D-7000 Stuttgart.
- Bremer, H., 1978 Paleontoloji, Ege Üniversitesi Yer Bilimleri Fakültesi Bornova
- Chester, P.L. and Raine J.I., 2001, Pollen and spore keys for Quaternary deposits in the northern Pindos Mountains, Greece, Grana 40; 299-387
- Y Çiftçi, Ce Toker, 2007, A Key study for seismic reflection application; geological interpretation of the coaliferous neogene sequence In Afşin-Elbistan, Mineral Res. Expl. Bull., 135, 45-62.
- Gemici, Y., 1993, Tersiyer'den günümüze Türkiye'nin flora ve vejetasyonu, Doğa Türk Botanik D., 17(4), 221-6
- Gemici, Y., Akyol, E. ve Akgün, F., 1993, Şahinali Neojen havzası fosil makro ve mikroflorası, Doğa Türk Botanik D., 17(2), 91-106.

- Gökmen, V., Memikoğlu, O., Dağlı, M., Öz, D., Tuncalı, E., 1993, Türkiye Linyit Envanteri, MTA, Ankara, sf.269-272.
- Gürsoy, E., Özcan, K., Yücel, A.R., 1981. K.Maraş Elbistan D1 Sektörü Kömür Yatağı Jeoloji Raporu. MTA Raporu, Ankara
- Haktanır, K. ve Karaca, A., 1996, Afşin-Elbistan Termik Santrali emisyonlarının çevre topraklarının, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine etkiler, TÜBİTAK, Proje no: KTÇAG-125.
- Hochuli, P.A., 1978, Palynologische Untersuchungen im Oligozän und Unter miozän der Zentralen und Westlichen Paratethys, Beitr.Paläontol. Österreich, 4, 1-132.
- Koçak, Ç., Kürkcü, S. N., Yılmaz, S. 2003. Afşin-Elbistan Linyit Havzasının Yeniden Değerlendirilmesi ve Linyit Kaynakları Arasındaki Yeri, 24-27 Eylül 2003, Türkiye 9. Enerji Kongresi, İstanbul.
- Johanna Kovar-Eder, 1987, Pannonian (Upper Miocene) vegetational character and climatic inferences in the Central Paratethys Area, Ann. Naturhist. Mus.Wien, 88, A, 117-129,
- Krutzsch, W., 1971, Atlas der mittel-und jungtertiären dispersen sporen-und pollen sowie der Mikroplanktonformen des nördlichen Mitteleuropas Lieferung VI, Veb Gustay Fischer Verlag Jena, Berlin
- Krutzsch, W., 1970, Atlas der mittel-und jungtertiären dispersen sporen-und pollen sowie der Mikroplanktonformen des nördlichen Mitteleuropas Lieferung VII, Veb Gustay Fischer Verlag Jena, Berlin
- MTA Raporu, 1977, No: 266/I-IIIV, 290, 2901, 379, 379/I-IA, 332 7216 ve TKİ Kurumu
- Nagy, E., 1990. Palynological correlation of the Neogene of the Central Paratethys. Geological Institute of Hungary, 1-126
- Nagy, E., 1999, Palynological correlation of The Neogen of the Central Paratethys, MAIF Geological Institute of Hungary Budapest.
- Rivas-Carballo, M.R. 1991. The development of vegetation and climate during the Miocene in the south-eastern sector of the Duero Basin (Spain). Review of Paleobotany and Palynology 67, 341-351.
- Thomson, P.W., Pflug, 1953, Pollen u. Sporen des mitteleuropäischen Tertiars, Paleontographica Bd.94 Abt. B
- Traverse, A. 1988. Paleopalynology. Unwin Hyman, London Sydney Wellington, 600 p.
- Perinçek, D. and Kozlu, H., 1983. Stratigraphy and structural relations of the units in the Afşin- Elbistan-Doğanşehir region (Eastern Taurus), Geology of the Taurus Belt, Int. Symp., p. 181198, Ankara-Turkey.

## Sinakalsetin farmasötik preparatlarda 7,7,8,8-tetrasiyanonokinodimetan belirteci ile spektrofotometrik analizi

Cem Önal<sup>1</sup> \*, Şerife Evrim Kepekçi Tekkeli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Abdi İbrahim Pharmaceutical Hadimkoy/Istanbul.TURKEY

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Bezmialem Vakif University, Fatih, Istanbul, Turkey

\*Sorumlu yazar e-mail: cem.onal@abdiibrahim.com.tr

### Özet

Bu çalışmada sinakalsetin farmasötik preparatlarda analizi için 7,7,8,8-tetrasiyanonokinodimetan (TCNQ) belirteci kullanılarak spektrofotometrik analizi yapılması planlanmıştır. Metot ilaç maddesinin TCNQ belirteci ile yük transfer oluşumuna dayanmaktadır. Maksimum dalga boyu 843 nm de ölçülmüştür. Analiz koşulları değişik koşullar denenerek optimize edilmiştir. Özgünlük, doğrussallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı gibi validasyon parametreleri denenmiştir. Konsantrasyon aralığı 50-500 µg mL<sup>-1</sup> arasında doğrusal olarak bulunmuştur. Gözlenebilme sınırı, 0.31 µg mL<sup>-1</sup> olarak ve tayin sınırı 1.02 µg mL<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Bulunan geri kazanım değerleri farmasötik dozaj formlarından herhangi bir girişim olmadığını göstermiştir (geri kazanım değeri ortalama %101.91). Geliştirilen metodun ayrıca farmasötik preparatlardaki analize başarıyla uygulandığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Sinakalset, TCNQ, Validasyon, Farmasötik preparat

### Spectrophotometric Analysis of Cinacalcet Using 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane Reagent at Pharmaceutical Preparations

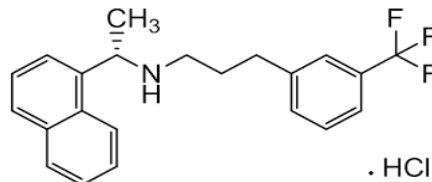
#### Abstract

A spectrophotometric method was developed for determination of cinacalcet (CNT) using 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) reagent in pharmaceutical formulations.. The method is based on formation of colored charge transfer complex with CNT as n-electron donor and with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) as π-acceptor. The maximum absorbance was measured at 843 nm. Different experimental conditions were carefully studied and optimized. Concentration range was found as 50-500 µg mL<sup>-1</sup>. Limit of detection and limit of quantification were found as 0.31 and 1.01 µg mL<sup>-1</sup> respectively. The validity of methods in terms of specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, limit of detection and limit of quantitation were evaluated. The mean recovery for the commercial capsules was 101.91% which indicates that no interference was observed from concomitants usually present in pharmaceutical formulations. The method was applied successfully to the determination of this drug in pharmaceutical dosage form.

**Keywords:** Cinacalcet, TCNQ, Validation, Pharmaceutical Preparation.

#### GİRİŞ

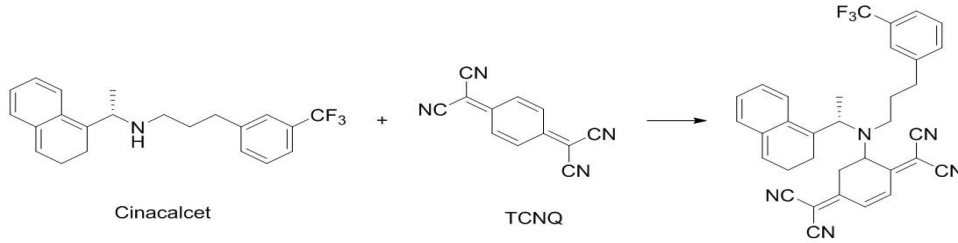
Kimyasal adı N-((1R)-1-(1-naftil) etil)-3-(3-(triflorometil) fenil) propan-1-amine hidroklorür olan sinakalset hidroklorür, (Şekil 1), kalsiyum algılayan reseptörün ekstraselüler kalsiyuma duyarlılığını artırarak, PTH düzeyini doğrudan azaltan kalsimimetik bir ajandır ve ayrıca primer ve sekonder hiperparatiroidizm de kullanılmaktadır [Silverberg ve ark, 1999, Franceschini ve ark. 2003]. Sinakalset esas olarak CYP3A4 ve CYP1A2 olmak üzere birçok enzim tarafından metabolize edilir. Dolaşımdaki ana metabolitleri inaktiftir. Oral yoldan uygulandıktan sonra maksimum sinakalset konsantrasyonları yaklaşık 2-6 saat sonra elde edilir. [Kumar ve ark. 2004].



**Şekil 1:** Sinakalset hidroklorürün kimyasal formülü

Yapılan çalışmalar incelendiğinde sinakalsetin insan plazmasında sıvı kromatografisi-kütle spektrometrik/kütle spektrometrik (LC-MS/MS) analizleri [Ohashi ve ark, 2004, Niroti ve ark. 2011, Yang ve ark. 2011, Padhi ve ark., 2005, Padhi ve ark., 2008], 1,2 naftakinon-4- sulfonat [Darwish ve ark., 2012] belirteci kullanılarak spektrofotometrik ve 7-kloro-4-nitrobenzofurazon [Darwish ve ark., 2013] belirteci kullanılarak spektrofotometrik analizlerine rastlanmıştır.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz metod, sinakalsetin TCNQ belirteci ile yük transfer oluşumuna dayanmaktadır (Şekil 2). Yük transfer oluşumuna dayanan bu metod, oldukça kolay olması, tampon sistemine ihtiyaç duyulmaması, daha az zaman kaybı, belirtecin ucuz olması, kullanılan enstrümanın ucuz olması gibi özelliklerle var olan metotlara göre bir üstünlük sağlamaktadır [Foster, 1969, Mulliken ve Person, 1969, Ayad ve ark, 1980, Oztunc ve ark., 1980]. Geliştirilen bu metod ayrıca ilaç maddesinin farmasötik preparatlardaki analizine de başarıyla uygulanmış olup kalite kontrol laboratuvarlarındaki analiz için de tavsiye edilebilir niteliktedir.



Şekil 2: Sinakalset ve TCNQ arasındaki reaksiyon

## MATERYAL VE METOD

Spektrometrik ölçümler Hitachi spektrometer Model U-2900 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sinakalset Megafine, India Corporate Ofisden (Mumbai, India), farmasötik preparatı ise eczaneden temin edilmiştir. Sinakalsetin stok çözeltisi (1 mg mL<sup>-1</sup>) ve TCNQ (Fluka-Neu-Ulm, Germany) nun % 0.2 lik çözeltisi asetonitrilde hazırlanmıştır.

### Genel analiz yöntemi

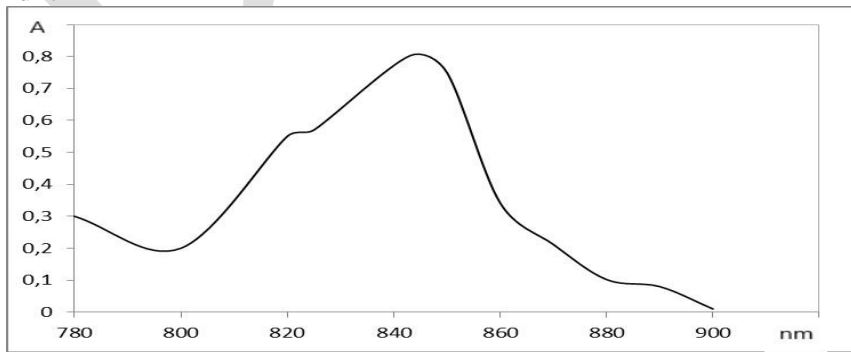
Sinakalsetin stok çözeltisinden 0.25-2.5 mL hacimlerde alınmış üzerlerine 1.5 mL TCNQ belirteci ilave edilmiş ve 80°C de 5 dk ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra her bir balonjoje 5 mL ye asetonitrille tamamlanmış ve boş denemeye karşı absorpsanları 843 nm de kaydedilmiştir. Kalibrasyon grafikleri sinakalsetin konsantrasyonuna karşı absorpsanlarının ölçümü ile hazırlanmıştır.

### Farmasötik preparatlar için analiz yöntemi

10 tablet 250 mL lik balonjojeye alınmış üzerine 125 mL asetonitril ilave edilmiştir. Tabletler 20 dk mekanik karıştırıcıda, 20 dk da ultrasonik karıştırıcıda tutulmuş ve hacmine asetonitrille tamamlanmıştır. Çözelti filtre kağıdından süzülmüş, süzüntü ile genel analiz yönteminde anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Tabletlerdeki sinakalsetin konsantrasyonu kalibrasyon grafiğinin doğru denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır.

## SONUÇ

Sinakalsetin TCNQ belirteci ile absorpsiyon spektrumu şekil 3 de verilmiştir. Maksimum absorpsiyon dalga boyu 843 nm dir.



Şekil 3: Sinakalsetin TCNQ belirteci ile oluşturduğu yük transfer kompleksinin boş denemeye karşı absorpsiyon spektrumu

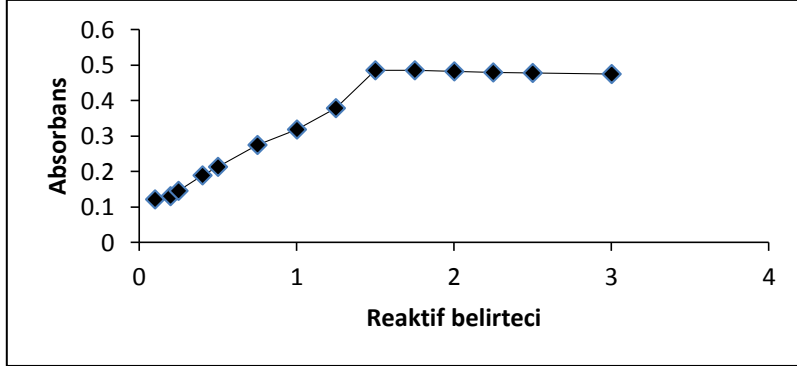
Yük transfer kompleksinin oluşumu için gerekli şartların optimizasyonu için en uygun çözücü seçimi, belirtecin konsantrasyonu, hacmi, reaksiyon ısısı, reaksiyon zamanı gibi parametreler çalışılmıştır.

#### En uygun çözücü seçimi

Yük transfer kompleksinin en iyi şartlarda oluşumu için değişik çözücüler denenmiştir. Asetonitril, kloroform, diklorometan, dietil eter, benzen, aseton, metanol, etanol gibi farklı çözücülerle denemeler yapılmış en yüksek verimin asetonitril kullanılarak elde edildiği saptanmıştır.

#### Belirteç konsantrasyonu

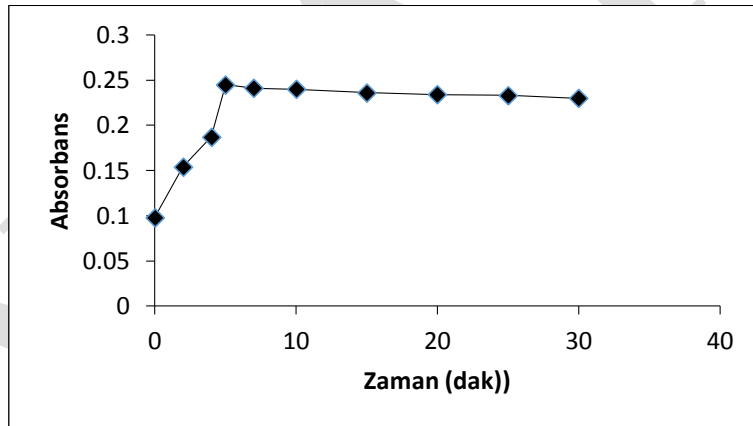
Bu amaçla değişik konsantrasyonlarda TCNQ belirteci ile denemeler yapılmıştır. 1.5 mL % 0.2 lik TCNQ nun en uygun belirteç konsantrasyonu olduğu saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4: % 0.2 lik TCNQ belirtecinin hacminin reaksiyon verimine etkisi

#### Reaksiyon zamanı

Değişik sıcaklıklarda yapılan denemelerde en yüksek sonuçlar 80 °C de elde edilmiştir. Bu nedenle 80°C de optimum bekleme süresi çalışılmış ve en yüksek sonuçların 5 dakikada elde edildiği gözlenmiştir. Şekil 5 de bekleme süresinin türevlendirme reaksiyonuna etkisini göstermektedir.



Şekil 5: 80 °C de bekleme sürelerinin reaksiyon verimine etkisi

#### Metot validasyonu

Validasyon prosedürü Uluslararası Harmonizasyon Konferansında belirlenen kriterler doğrultusunda yapılmıştır [ICH, Q2 (R1), 2005].

#### Kalibrasyon ve Hassasiyet

Yöntem 50-500 µg mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Tablo 1 de doğrusal aralık, reaksiyon denklemi, korelasyon katsayısı, molar absorptivitesi, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı gibi parametreler listelenmiştir.

**Tablo 1:** Yönteme ait analitik parametrelerin sonuçları

Doğrusal aralık <sup>a</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	50-500
Molar absorptivite (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	1.72 x 10 <sup>3</sup>
<i>Kesinlik</i>	
Gün içi kesinlik <sup>b</sup> , %RSD	0.88
Günler arası kesinlik <sup>c</sup> , RSD %	1.07
<i>Regresyon denklemi</i> <sup>d</sup>	
Eğim ± SD	0.0017 ± 0.00029
Intersept ± SD	0.0002 ± 0.00017
Korelasyon katsayısı, <i>r</i>	0.9999
LOD (µg mL <sup>-1</sup> )	0.31
LOQ (µg mL <sup>-1</sup> )	1.02

<sup>a</sup> 6 çalışmanın ortalaması

<sup>b</sup> n=5

<sup>c</sup> 5 farklı gün de çalışılmıştır

<sup>d</sup>  $A = a + bC$  ( $C$  konsantrasyon µg mL<sup>-1</sup> ve  $A$   $\lambda_{max}$  deki absorpsiyon).

### Doğruluk, kesinlik ve seçicilik

Yöntemin doğruluğunu belirlemek için standart ekleme tekniği kullanıldı. Çeşitli miktarlarda sinakset çözeltisi (tabletler stoğundan) düşük, orta, yüksek diye nitelendirilebilecek üç farklı seviyede sinakset içeren standart örneklere ilave edildi. Aşağıdaki eşitlikten geri kazanım hesaplandı.

Geri kazanım % =  $[(C_t - C_u) / C_a] \times 100$

$C_t$  total analit konsantrasyonu;  $C_u$  ilaveden önce numunede bulunan analit konsantrasyonunu; and  $C_a$  ise eklenen saf analit konsantrasyonunu temsil etmektedir. Sonuçlar Tablo 2 de verilmiştir. % 101.91 lik geri kazanım yöntemin yüksek doğruluğa sahip olduğunu göstermektedir.

**Tablo2:** Standart ekleme yöntemi ile geri kazanım sonuçları

Geliştirilen metod	Alınan konsantrasyon (µg mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	İlave edilen konsantrasyon (µg mL <sup>-1</sup> )	Bulunan konsantrasyon <sup>b</sup> (µg mL <sup>-1</sup> ) (Mean ± S.D. <sup>c</sup> )	Geri kazanım (%)	RSD (%)
		50	151.24 ± 1.24	102.48	0.82
	100	200	303.65 ± 3.04	101.83	1.01
		400	505.67 ± 5.02	101.42	0.99

<sup>a</sup>Mimpara tablet (90 mg)

<sup>b</sup>n=5.

<sup>c</sup>Standart sapma

Yöntemin seçiciliği numune bileşenlerinin analizde girişim yapmama durumunun bir ölçüsüdür. Tablet analizlerin de yardımcı maddelerden herhangi biriyle bir girişim söz konusu olmamıştır, Gün içi ve günler arası olmak üzere iki tip kesinlik incelenmiştir. Üç farklı seviyede sinakset konsantrasyonları aynı günde ve ardışık beş günde aynı şekilde analiz edilmiştir ( $n=5$ ). Relatif standart sapma gün için % 0.88, and günler arası için % 1.07 olarak bulunmuştur ve sonuçlar Tablo 1 de gösterilmektedir.

### Sağlamlık

Analitik koşullarda yapılan küçük modifikasyonların yöntemi etkilemediği belirlenmiştir. Örneğin TCNQ konsantrasyonunda % a/h ± 0.5, sıcaklıkta (optimum değer ± 2 °C), ve bekleme süresinde (optimum değer ± 0.25 dak.) değişiklikler yapılmış ve relatif standart sapma değerlerinin % 2 den fazla değişmediği saptanmıştır..

### Tabletlerde analiz

Yeni geliştirilen yöntem Mimpara tablet® adlı farmasötik ürüne uygulanmıştır. Tablo 3 de belirtilen sonuçlara ulaşılmıştır, buna göre yöntemin tabletlere uygulanabilir olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan denemeler tablet yardımcı maddeleriyle girişim olmadığını ortaya koymuştur.

**Table 3:** 90 mg Sinakalset içeren tabletlerin analizi

Ortalama ± S.D	90. 3± 0.49
Geri kazanım (%)	100.04
RSD (%)	0.54

<sup>a</sup>Mimpara tablet (90 mg)

<sup>b</sup>n=5

<sup>c</sup>Standart sapma

### TARTIŞMA

Sonuç olarak geliştirilen yeni spektrofotometrik metot oldukça pratik ve uygulanabilir. Öncesinde komplike numune hazırlama işlemlerine gereksinim duyulmamaktadır. Geliştirilen metot sinakalsetin tabletlerinde yüksek doğruluk ve kesinlikle analizine imkan sağlamaktadır. Bu yöntem ilaca ait rutin analizlerde kullanılabilir niteliktedir.

### KAYNAKLAR

- Ayad MM, Shalaby AA, Abdellatif HE, El-Said HM, 1999. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21: 975.
- Darwish IA, Al-Shehri MM, El-Gendy MA 2013. A Highly Sensitive Fluorimetric Method for Determination of Cinacalcet Hydrochloride in Tablets and Plasma via Derivatization with 7-Chloro-4-nitrobenzoxadiazole. Current Analytical Chemistry, 9: 504-512.
- Darwish IA, Al-Shehri MM, El-Gendy MA 2012. Novel spectrophotometric method for determination of cinacalcet hydrochloride in its tablets via derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. Chemistry Central Journal, 6(11): 1-8.
- Foster R, Organic Charge-Transfer Complexes, Academic Press, New York, 1969.
- Franceschini N, Joy MS, Kshirsagar A 2003. Cinacalcet HCl: a calcimimetic agent for the management of primary and secondary hyperparathyroidism. Expert Opinion on Investigational Drugs, 12: 1413-1421.
- ICH, In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 2005.
- Job P 1928. Formation and stability of inorganic complexes in solution, Analytical Chemistry, 9:113-203.
- Kumar GN, Sproul C, Poppe L, et al. 2004, Metabolism and disposition of calcimimetic agent cinacalcet HCl in humans and animal models. Drug Metabolism Disposition, 32: 1491-1500.
- Mulliken RS, Person WB, Molecular Complexes, A Lecture and Reprint Volume, Wiley, New York, 1969.
- Nirogi R, Kandikere V, Komarneni P, Aleti R, Padala N, Kalaikadiban I 2011. Quantification of cinacalcet by LC-MS/MS using liquid-liquid extraction from 50 µL of plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56(2): 373-81.
- Ohashi N, Uematsu T, Nagashima S, Kanamaru M, Togawa A, Hishida A, Uchida E, Akizawa T, Koshikawa S 2004, The calcimimetic agent KRN 1493 lowers plasma parathyroid hormone and ionized calcium concentrations in patients with chronic renal failure on haemodialysis both on the day of haemodialysis and on the day without haemodialysis. British Journal of Clinical Pharmacology, 57: 726-734.
- Oztunc A, Dokumacı N, Tahtasakal E 1999. The use of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane for the determination of nortriptyline and desipramine in tablets. IL Farmaco, 54: 835-837.
- Padhi D, Harris RZ, Salfi M, Sullivan JT 2005. No effect of renal function or dialysis on pharmacokinetics of cinacalcet (Sensipar/Mimpara), Clinical. Pharmacokinetics, 44: 509-516.
- Padhi D, Harris RZ, Salfi M, Noveck RJ, Sullivan JT 2008. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cinacalcet in hepatic impairment: phase I, open-label, parallel-group, single-dose, single-centre study, Clinical Drug Investigation, 28: 635-643.
- Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris E, Bilezikian JP 1999. A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. NEJM, 341:1249-1255.



Yang F, Wang H, Zhao Q, Liu H, Hu P, Jiang J 2012. Determination of cinacalcet hydrochloride in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 5(61): 237-241.

DRAFT

## The inhibitory role of chestnut honey on urease enzyme to the treatment of gastric diseases

Yakup Kara<sup>1\*</sup>, Zehra Can<sup>2</sup>, Sevgi Kolaylı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Karadeniz Technical University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 61080, Trabzon, Turkey

<sup>2</sup>Bayburt University, Faculty of Applied Sciences, Department of Emergency and Disaster Management, 6900, Bayburt, Turkey

\* Corresponding author e-mail: yaakupkara@gmail.com

### Abstract

Urease is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of urea into carbon dioxide and ammonia. The high urease activity that causes gastroduodenal inflammation produces ammonia and neutralizes the stomach acid, which allows the survival of the pathogenesis of gastric and peptic ulcers and promotes inflammation. The use of urease inhibitors will be the most effective method for the treatment of gastric and urinary infections. In recent years, interest in natural products has increased. The study was determined that, chestnut honey have high antioxidant activity and it may be used as natural inhibitor of urease enzyme. There was determined a strong correlation between antioxidant activity and urease enzyme inhibition.

**Keywords:** Urease, Chestnut, honey, antioxidant, inhibition

### INTRODUCTION

Honey is a source of food collected by bees (*Apis mellifera*) from flower and tree secretions, used by human beings as a source of healing from past to present. (Aparna vd., 1999; Kaskoniene vd., 2010). Honey has an important place thanks to its phenolic compounds, flavonoids, organic acids, vitamins, minerals and enzymes (Baroni et al., 2006). The chemical content of honey varies according to climate, geographical condition and flora (Silva et al., 2016). The relationship between phenolic content of honey and antioxidant capacity, flora and climatic conditions has been shown in studies. (Tomas-Barberán et al., 2001). Gastritis, which may present with symptoms such as burning, pain and bloating in the stomach, means inflammation of the inner stomach wall. *H. Pylori* is known to produce urease synthesis in the stomach and bowel. *Helicobacter pylori* is an important risk factor for gastritis, gastric and duodenal ulcer, gastric cancer and mucosal associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. The basic medium produced by urease synthesis stimulates Gastrin release by eliminating the feed-back effect and contributes to the formation of gastritis by increasing acid secretion. In this study, 5 units chestnut honey was obtained from various beekeepers in the Black Sea region. The aim of this study was to determine the antioxidant capacity and also urease enzyme inhibition of chestnut honey. Thus, its usability for a natural treatment of gastritis has been examined.

### MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents used in the study were procured from the following companies. Folin–Ciocalteu's phenol reagent and TPTZ from Fluka Chemie GmbH (Switzerland), Jack bean urease, urea, acetohydroxamic acid, sodium nitroprusside, iron(III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), iron(II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), and DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium acetate, and glacial acetic acid were obtained from Merck.

#### Honey extraction for antioxidant activity and phenolic analysis

10 g of each honey sample was taken and 50 mL of methanol solvent was added and extraction was carried out in the shaker (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for 24 hours. At the end of the period, the extract was filtered first from ordinary filter paper and then from blue filter paper to remove possible particles. The final concentration was adjusted by addition of methanol. Antioxidant content and antioxidant activity analyzes were performed in this methanolic extract.

Aqueous extracts of 50 mg / mL were prepared from each honey sample. For this purpose, 5 g of each sample was weighed and 100 mL of purified water was added and extraction was performed for 24 hours. The final concentration was adjusted with pure water after filtration through ordinary filter paper and blue filter paper, respectively. In this aqueous extract, urease enzyme inhibition was studied.

#### Determination of antioxidant content and antioxidant capacity

Total phenolic content and total flavonoid content analysis were performed to determine the antioxidant content. DPPH and FRAP analysis were performed to determine antioxidant capacity.

### **Total phenolic content (TPC)**

For the total phenolic content, the method reported by Slinkard and Singleton, based on the principle of reduction of Folin-Ciocalteu agent, was used (Slinkard and Singleton, 1977). After pipetting as specified in the method, absorbance readings were performed at 760 nm. Gallic acid was used as the standard for total phenolic content analysis. The results were given as GAE mg/g sample.

### **Total flavonoid content (TPC)**

The method reported by Fukumoto and Mazza was used to determine the total flavonoid content. (Fukumoto and Mazza, 2000). The absorbance of the samples was read at 415 nm and the total flavonoid content was determined using the Quercetin standard. Total flavonoid content in the sample was calculated as the equivalent of Quercetin. (mg QE/ g sample).

### **Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay**

FRAP analysis provides information on the total antioxidant content of the sample. By the method reported by Benzie and Strain, FRAP analysis is performed by measuring ferric reduction ability. (Benzie and Strain, 1996) After pipetting as indicated in the method, absorbance values were read at 593 nm. FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O was used as standard and results were given in FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (μmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g sample).

### **DPPH assay of total antioxidant capacity**

The sample was mixed with 40 mM DPPH solution in a 1: 1 ratio and allowed to incubate for 50 min at room temperature. (Molyneux, 2004). The absorbance was read at 517 nm and the results were given as the SC<sub>50</sub> value (mg sample per mL). This SC<sub>50</sub> value represents the amount of antioxidant needed to scavenging 50% of DPPH radicals.

### **Urease inhibition analysis**

Urease enzyme inhibition studies were performed according to phenol-hypochlorite method developed by Weatherburn (1967). When phenol (1% phenol + 0.005% sodium nitroprussides) and alkali (0.5% NaOH + 0.1% sodium hypochlorite) reagents are added to the environment where ammonium ions are formed as a result of the disintegration of urea, blue-navy color is formed. After 50 min incubation, the absorbance value at 625 nm wavelength was read. Acetohydroxamic acid (AA), a known inhibitor of urease, was used as positive control.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Phenolic compounds and flavonoids are important indicators of antioxidant properties of honey. Phenolic compounds and flavonoids play a role in the biological activity of honey as well as vitamins, minerals and organic acids. Antioxidant capacity results of chestnut honey are given in Table 1. The flavonoid result of chestnut honey was 8.9 mg QE/100g, while the phenolic compound content was found to be 100.0 mg GAE/100g. Chestnut honey was found to be quite rich in total phenolics. Phenolic compounds, organic acids, vitamins, minerals, enzymes and small peptides in honey contribute to the antioxidant capacity of honey. FRAP analysis is widely used to determine the antioxidant capacity of natural products. DPPH analysis is performed as an indicator of the power to remove free radicals. FRAP value of chestnut honey was 11.05 μmolFeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O / g and DPPH value was 14.50 mg / mL.

In various diseases, the tendency towards natural products is increasing day by day. Inhibition of urease enzyme is tried to be used in the treatment of gastritis which is one of them. The use of urease inhibitors is one of the most effective methods for the treatment of gastric and urinary infections. There are studies on the potential of plant extracts as urease enzyme inhibitors (Patra, 2006). Xiao et al. synthesized the reductive derivatives of flavonoids found in natural products as urease inhibitors and demonstrated that these compounds have high inhibitory ability (Xiao, 2013). Phenolic compounds and flavonoids with antioxidant capacity have positive results in urease inhibition. Our previous studies have shown that the phenolic and flavonoid content of honey is high (Can, 2018). The urease enzyme inhibition power of chestnut honey was found to be high.

**Table 1.** Total Phenolic, Total Flavonoid content and antioxidant activity results of honeys

	Total phenolic content (mg GAE/100g)	Total flavonoid content (mg QE/100g)	FRAP ( $\mu\text{molFeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ )	DPPH-SC <sub>50</sub> (mg/mL)
Chestnut honey (n:5)	100.01±0.04	8.90±0.09	11.05±0.05	14.50±0.22
Trolox				0.004±0.00

**Table 2.** Urease enzyme inhibition of chestnut honey

Samples	Ureaz-IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Chestnut honey (n:5)	0.71±0.15
Acetohydroxamic acid (AA) ( $\mu\text{g/mL}$ )	25.09±0.02

## CONCLUSION

Our study shows that the phenolic and flavonoid compounds are partially responsible for the antioxidant content of honey. In addition to the antioxidant content, chestnut honey has a strong antioxidant activity. There was a strong correlation between antioxidant activity and urease enzyme inhibition. In our study, it was determined that chestnut honey has high antioxidant activity and can be used as natural inhibitor of urease enzyme. Chestnut honey can be used not only as an antioxidant source but also as a natural inhibitor in the urease enzyme.

## REFERANCES

- Aparna. A. R.. & Rajalakshmi. D. (1999). Honey—its characteristics. sensory aspects. and applications. *Food Reviews International*. 15(4). 455-471.
- Baroni, M. V., Nores, M. L., Díaz, M. D. P., Chiabrando, G. A., Fassano, J. P., Costa, C., & Wunderlin, D. A. (2006). Determination of volatile organic compound patterns characteristic of five unifloral honey by solid-phase microextraction– gas chromatography– mass spectrometry coupled to chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(19), 7235-7241.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70–6.
- Can, Z. (2018). Determination of in-vitro antioxidant, anti-urease, anti-hyaluronidase activities by phenolic rich bee products from different region of Turkey.
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- Fukumoto, L.R., and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Kaškonienė. V.. & Venskutonis. P. R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(6). 620-634.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin Journal of Science Technology* 26, 211-219.
- Patra, D. D., Kiran, U., & Pande, P. (2006). Urease and Nitrification Retardation Properties in Natural Essential Oils and Their By-products. *Communications in soil science and plant analysis*, 37(11-12), 1663-1673.
- Slinkard, K., and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Tomas-Barberán, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E., 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 485–496.
- Weatherburn M.W. (1967): Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39 (8) 971-974.

Xiao, Z. P., Peng, Z. Y., Dong, J. J., He, J., Ouyang, H., Feng, Y. T., ... & Zhu, H. L. (2013). Synthesis, structure–activity relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 63, 685-695.

DRAFT

## Effects of *Cauliflower mosaic virus* on morphological parameters of kale

Nuran Cansiz, Mehmet Ali Sevik\*

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey

\*Corresponding author e-mail: malis@omu.edu.tr

### Abstract

Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) is one of the most important leafy herbaceous vegetables consumed in Turkey. Virus diseases cause serious losses in yield of brassica crops worldwide. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) is one of the most common viruses in brassica crops in Turkey. This study was carried out in controlled conditions at the Experimental field of Faculty of Agriculture, Ondokuz Mayıs University in order to determine the effect of CaMV on some morphological parameters of kale plants. Relationships between CaMV infection and kale plant-root height, leaf length-width, stalk length, plant-root fresh weight and plant-root dry weight, and the virus's effect on the contents of leaf chlorophyll and water were investigated. According to the results obtained, in CaMV-infected plants have reduced plant (14.6%) and leaf (16.9%) height, leaf (3.4%) width, stalk height (8.0%), root (15.8%) height, plant fresh (17.7%), dry weight (13.1%); root fresh (18.4%), dry weight (7.1%), and leaf chlorophyll (32.4%) contents.

**Keywords:** *Brassica*, CaMV, morphological parameters, kale

### Yaprak lahananın morfolojik parametrelerine *Cauliflower mosaic virus*' un etkisinin belirlenmesi

#### Özet

Yaprak lahanası (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.), ülkemizde en önemli yaprağı yenen sebze türlerinden birisidir. Virüs hastalıkları dünya çapında brassica bitki türlerinde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Türkiye'de brassica grubu bitkiler en yaygın virüslerden birisi *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)'dir. CaMV'nin yaprak lahanası bitkilerinin bazı morfolojik parametrelerine etkisini belirlemek amacıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Deneme alanında kontrollü koşullarda bu çalışma yürütülmüştür. CaMV enfeksiyonunun yaprak lahanası bitkisinin kök uzunluğu, yaprak uzunluğu-genişliği, sap uzunluğu, bitki kökünün yaş ağırlığı ve bitki kökünün kuru ağırlığı ile virüsün yaprak klorofil ve su içeriği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, CaMV enfeksiyonu, bitki (%14.6) ve yaprak (%16.9) boy, yaprak (%3.4) genişlik, sap yüksekliği (%8.0), kök (%15.8) boy, bitki taze (%17.7), kuru ağırlık (%13.1), kök yaş (%18.4), kuru ağırlık (%7.1) ve yaprak klorofil (%32.4) içeriğinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Brassica*, CaMV, morfolojik parametreler, lahanası

#### GİRİŞ

Ülkemizde lahanaların birçok değerlendirilme şekli olup, çiğ olarak tüketildiği gibi; salatası; kapuskası; etli ve zeytinyağlı sarması ve turşusu yapılmaktadır. Ülkemizde lahanası grubu sebzelerin toplam ekim alanı yaklaşık 20 bin hektar, üretim miktarı ise yıllara göre değişmekte olup 622.000 ton civarındadır. Bu üretimin yaklaşık 80 bin tonu yaprak lahanası olup tamamına yakını Karadeniz Bölgesi'nde üretilmektedir (TurkStat, 2016). Diğer bölgelerimizde, bölgenin değerlendirme şekillerine uygun lahanası çeşitleri üretilerek tüketilmektedir. Lahanası, vitamin, yağ, protein, karbonhidrat, kalsiyum, potasyum, kükürt, magnezyum ve demir içermektedir (Cengiz, 2009).

Yaprak lahanası (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), vitamin ve mineraller açısından oldukça zengin bir serin iklim sebzesidir. Yeşil klorofil pigmentleri içinde bol miktarda betakaroten, askorbik asit (vitamin C) ve kalsiyum barındırır. Antioksidan ve fotokimyasal özellikleri olan yaprak lahanası bitkisi birçok kanser türünün ve kalp hastalığı riskinin azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Alibas, 2009) Yaprak lahanası oldukça zengin besin içeriği ile insanların günlük besin miktarını karşılayabilecek nitelikte olan önemli bir sebze türüdür (Gündoğdu, 2005).

Lahanası grubu sebze türlerinde verim kayıplarına neden olan birçok zararlı ve hastalık etmeni bulunmaktadır (Daniel et al., 2016). Bu hastalık ve zararlılar lahanası üretimini olumsuz etkilemekte, kalite ve pazar değerlerini düşürmektedirler. Lahanalarda yaygın görülen viral etmenler arasında Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) yer almaktadır (Spence et al., 2007).

*Cauliflower mosaic virus*, Caulimovirus grubu üyesi olup dünya genelinde Brassicacea familyasına ait bitkilerde sık rastlanan önemli bir viral hastalık etmenidir. CaMV, Brassicaceae familyasına ait bitkilerin yetiştiriciliğinin yapılabildiği uygun iklim koşullarına sahip her yerde görülebilmektedir (Sutic et al., 1999). Bu çalışmada CaMV'nin yaprak lahanası bitkisinin morfolojik (bitki-kök boyu, yaprak boyu-eni, sap boyu, bitki yaş-kuru ağırlık, kök yaş-kuru ağırlık) ve fizyolojik (klorofil içerik) parametrelere etkisi araştırılmıştır.

### MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümüne ait iklim odasında lahanası bitkilerinde çoğaltılan CaMV izolatu kullanılmıştır. Ticari firmalardan temin edilen yaprak lahanası tohumları viyollere ekilmiş çimlenen yaprak lahanaları saksılara aktarılmış ve denemede kullanılmıştır.

Mekaniksel inokulasyon sırasında kullanılmak üzere, 0.01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH=7.0) hazırlanmıştır (Nguyen et al., 2013). CaMV ile enfekteli taze yapraklar fosfat tampon çözeltisi içeren soğutulmuş steril havan içerisine 1:5 oranında ezilerek, karborandum tozu dökülen yaprak lahanası bitkileri üzerine sürülmüş ve bitkiler sekiz hafta süreyle iklim odasında tutularak gözlemler alınmıştır (Guo et al., 2005). CaMV'nin yaprak lahanası bitkilerinde enfeksiyonunu belirlemek için double-antibody sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) testi uygulanmıştır.

Virüsün yaprak lahanası bitkilerinde morfolojik ve fizyolojik parametrelere etkisini belirlemek için; bitki boyu (cm), kök boyu (cm), yaprak boyu (cm), yaprak eni (cm), sap boyu (cm), bitki yaş ağırlık (g), bitki kuru ağırlık (g), kök yaş ağırlık (g), kök kuru ağırlık (g) ve yaprak klorofil içerik ölçümleri yapılmıştır.

Bitkilerin klorofil içerikleri hasattan önce Konica Minolta SPAD-502 Plus cihazı ile ölçülmüştür. Her bir bitkide en üstteki üçer tane yaprakta, her bir yaprakta üç farklı noktadan ölçülerek ortalama klorofil içeriği kaydedilmiştir (Xie et al., 2016).

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada CaMV'nin yaprak lahanasının verimine etkisine ait bulgular elde edilmiştir. Mekanik inokulasyondan 15 gün sonra inokulasyon yapılan yapraklarda hafif mozayik şeklinde belirtiler görülmüştür. Haftalar ilerledikçe bitkinin tüm yapraklarında mozaik belirtileri şiddetli mozaik haline dönüştüğü kaydedilmiştir (Şekil 1). Yapraklar DAS-ELISA yöntemi ile analiz edilerek bitkilerde CaMV enfeksiyonları tespit edilmiştir.



Şekil 1. CaMV inokule edilen yaprak lahanası bitkilerinde gözlenen belirtiler

Deneme sonunda lahanası bitkisine ilişkin verim ve bazı fizyo-morfolojik özelliklere (bitki-kök boyu, yaprak boyu-eni, sap boyu, bitki-kök yaş ağırlık, bitki-kök kuru ağırlık, klorofil içerik) ait değerler elde edilmiştir.

CaMV'nin yaprak lahanası bitkisinin birçok morfolojik ve fizyolojik parametrelerine olumsuz yönde etkisi olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı bitkiler ile kıyaslandığı zaman CaMV ile enfekteli bitkilerde; bitki (%14.64) ve yaprak (%16.9) boyunda, yaprak (%3.48) eninde, yaprak sap (%8) ve kök (%15.8) boyunda, bitki yaş (%17.77) ve kuru (%13.1) ağırlığında, kök yaş (%18.4) ve kuru (%7.14) ağırlığında ve klorofil (%32.44) içeriğinde belli oranlarda azalma olduğu tespit edilmiştir.

Brassica grubu sebze türlerinde CaMV enfeksiyon oranı %70'leri geçebilmekte önemli verim kayıplarına yol açabilmektedir. Örneğin virüsün karnabahar verimini %20'ye kadar azaltabildiği bildirilmiştir (Shephard, 1981; Sutic et al., 1999). Spence et al. (2007), Kenya'da kurmuş oldukları sera denemelerinde, beyaz baş ve yaprak lahanası bitkilerinde TuMV'nin tek başına veya CaMV ile karışık enfeksiyonlarda lahanası fidelerinin sayısında ve ağırlığında azalmaya sebep olduğunu belirlemişlerdir.

Yine 2002 yılında yapılan bir çalışmada, TuMV inokulasyonu tek başına verimi azaltmazken inokulasyon sonrası CaMV ve CaMV+TuMV inokulasyonları verimin önemli ölçüde azalmasına yol açmıştır. Mekanik

inokulasyon sonrası CaMV ve TuMV+CaMV uygulamalarında verim kaybı bulguları (% 63-76), inokulasyon öncesine göre (% 23-24) göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Hunter et al., 2002).

## SONUÇ

Yaprak lahanası, ülkemizde yaprağı yenen en önemli sebzeler arasında yer almaktadır. Brassicaceae familyasına ait bitki türlerinde yaygın görülen virüslerden birisi de CaMV'dir. Bu virüsün yaprak lahanası bitkilerinde morfolojik ve fizyolojik parametrelere etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda virüsün yaprak lahanası bitkisine ilişkin verim ve bazı fizyolojik özelliklere (bitki-kök boyu, yaprak boyu-eni, sap boyu, bitki-kök yaş ağırlık, bitki-kök kuru ağırlık, klorofil içeriği) ait değerler elde edilmiştir. CaMV'nin yaprak lahanası bitkisinin bazı morfolojik ve fizyolojik parametrelerine olumsuz etki ettiği saptanmıştır. Ancak arazi şartlarında daha detaylı çalışmaların yapılmasına da ihtiyaç bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Alibas I. 2009. Microwave, vacuum, and air drying characteristics of collard leaves. *Drying Technology*, 27: 1266-1273.
- Cengiz S. 2009. Karalâhananın insan HDL reseptörüne (SR-B1) etkisi, KTÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Trabzon.
- Daniel C, Collier R, Thomas J, Hommes M. 2016. Effects of landscape and region on pests and pathogens in Brassica vegetables and oilseed rape. *IOBC-WPRS Bulletin*, 118, 99-105.
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Rao GZ. 2005. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Science*, 168: 57-63.
- Gündoğdu A. 2005. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetişen karalâhanalarda (*Brassica oleracea* var. *acephala*) bazı element tayinleri. KTÜ, Fen Bilimler Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 165s, Trabzon.
- Hunter PJ, Jones JE, Walsh JA. 2002. Involvement of *Beet western yellows virus*, *Cauliflower mosaic virus*, and *Turnip mosaic virus* in internal disorders of stored white cabbage. *Phytopathology*, 92: 816-826.
- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SYW, Duchene S, Vetten HJ, Lesemann D, Ohshima K 2013. *Turnip mosaic potyvirus* probably first spread to Eurasian Brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One*, 8: 1-13.
- Shepherd RJ. 1981. *Cauliflower mosaic virus*. AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 243.
- Spence NJ, Phiri NA, Hughes SL, Mwaniki A, Simons S, Oduor G, Chacka D, Kuria A, Ndirangu S, Kibata GN, Marris GC. 2007. Economic impact of *Turnip mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* and *Beet mosaic virus* in three Kenyan vegetables. *Plant Pathology*, 56: 317-323.
- Sutic DD, Ford RE, Tosic MT. 1999. *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- TurkStat, 2016. Turkish Statistical Institute Database, <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Xie TT, Su PX, An LZ, Shan LS, Zhou ZJ, Chai ZP, 2016. Physiological characteristics of high yield under cluster planting: photosynthesis and canopy microclimate of cotton. *Plant Production Science*, 19(1), 165-172.



## Evaluation of turnip plants reaction to *Cauliflower mosaic virus*

Mehmet Ali Sevik\*, Nuran Cansiz

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey

\*Corresponding author e-mail: malis@omu.edu.tr

### Abstract

*Cauliflower mosaic virus* (CaMV), a member of the genus Caulimovirus, is one of the most important viruses the Brassicaceae family. Objective of the present study was to determine the reactions to CaMV of turnip (*Brassica rapa* var. *rapa*) plants. A study was conducted at Faculty of Agriculture, the University of Ondokuz Mayıs, Samsun, Turkey. The saps obtained by grinding CaMV-infected leaves in 0.01 M phosphate buffer (pH: 7.0) were mechanically inoculated to turnip plants using carborundum powder as abrasive. Observations were recorded according to the disease rating scale (0-9) throughout 60 days of each experiment. The results of study showed that the incidence of virus in turnip crop was 94.4%. The plants showed systemic symptoms developed at two weeks post inoculation (wpi). For eight weeks, the average weekly scales were 0, 0.1, 0.6, 1.3, 2.6, 4.2, 4.8, and 5.1, respectively. The virus infections were detected in turnip plants using double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

**Key words:** *Brassica*, reaction, turnip, virus, CaMV

### Şalgam bitkilerinin *Cauliflower mosaic virus*'a karşı reaksiyonunun değerlendirilmesi

#### Özet

Brassicaceae familyasına ait bitki türlerinin en önemli virüslerinden birisi, Caulimovirus cinsi içerisinde yer alan *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)'dir. Şalgam (*Brassica rapa* var. *rapa*) bitkilerinin CaMV'sine karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla, Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nde bir çalışma yürütülmüştür. CaMV ile enfekteli yaprakların 0.01 M fosfat tamponunda (pH 7.0) ezilerek elde edilen bitki öz suyu, aşındırıcı karborandum tozu kullanılarak şalgam bitkilerine mekanik olarak inokulu edilmiştir. İnokulasyondan sonra denemelerden gözlemler alınarak, 60 gün boyunca hastalık derecelendirme ölçeğine (0-9) göre kaydedilmiştir. Deneme sonunda şalgam bitkisinde virüs enfeksiyon oranı %94.4 olarak belirlenmiştir. İnokulasyondan iki hafta sonra (wpi) bitkilerin sistemik semptomlar geliştirdikleri gözlenmiştir. Sekiz hafta boyunca ortalama haftalık skale değeri sırasıyla 0, 0.1, 0.6, 1.3, 2.6, 4.2, 4.8 ve 5.1 olarak kaydedilmiştir. Şalgam bitkilerinde virüsün varlığı, Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Brassica*, reaksiyon, şalgam, virüs, CaMV

#### GİRİŞ

Brassicaceae familyası yaklaşık 375 cins, 3200 türü kapsayan kültür bitkileri, süs bitkileri ve yabancı otlardan oluşmaktadır. *Brassica* cinsi içerisinde yaklaşık 159 tür bulunmaktadır (Schlegel, 2009). Bunların birçoğunu önemli sebze türleri oluşturmaktadır.

Şalgam (*Brassica rapa*) turpgiller familyasında yer alan önemli bir bitki türüdür. Çeşitli büyüklükteki etli yumrusu insan ve hayvanlar için değerli bir besin kaynağıdır. Şalgam bitkisi yumrusu, otu ve tohumları için olmak üzere üç farklı amaçla yetiştirilmektedir. Şalgam, birçok ülkede yeşil yem bitkisi olarak silaj yapımında kullanılabilir (Tansı et al., 1999). Dünyanın pek çok yerinde otlama ve yumru yem temini amacıyla kullanılan *Brassica* grubu bitki türleri yüksek protein, enerji ve sindirilebilir besin maddesi içeren ürünler verirler (Rao and Horn 1995). Ayrıca turpgiller familyasına ait bitkiler arıcılık açısından da değerlendirilmesi gereken türlerdendir (Sıralı et al., 2013).

Türkiye' de yem şalgamı son yıllarda kaba yem kaynağı olarak değerlendirilmeye başlanılmış olup, şalgam 2016 yılı ekiliş alanı 756 da, üretim miktarı ise 1.651 tondur (TÜİK, 2016). Şalgam, çayır ve meraların kurduğu veya üretimin yetersiz olduğu dönemlerde bol ve kaliteli yeşil ot verebilen, özellikle sulu koşullarda çok verimli bir bitkidir (Parlak and Sevimay, 2007). Yem şalgamı, ülkemizde ve özellikle Ege Bölgesi'nde üretimi artan, yumrulu yem bitkileri grubunda yer almaktadır. Süt sığırcılığı işletmeleri yem şalgamına yoğun ilgi göstermekte olup, yumruları doğrudan hayvanlara yedirilmektedir (Kır et al., 2007).

Şalgam bitkilerinde verim ve kaliteyi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Birçok viral hastalık etmeni şalgam bitkilerinde enfeksiyon gerçekleştirebilmektedir (Broadbent, 2015). *Brassica* grubu sebze türlerinde *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), simptomlara neden olabilmekte ve ürünün kalite ve kantitesinde kayıplara yol açmaktadır (Hunter et al., 2002). CaMV ilk olarak şalgam ve lahana bitkilerinde rapor edilmiştir. Dünyada yaygın bir virüs olan CaMV Caulimoviridae familyası içerisinde yer almaktadır (Sutic et al., 1999). Virüs yaprak bitleri ve mekaniksel olarak kolayca taşınabilmektedir (Tomlinson, 1987).

Virüs bitki türü ve çeşidine bağlı olarak farklı *Brassica* türünde sistemik enfeksiyonlar gerçekleştirebilmekte farklı hastalık gelişim süreçlerine neden olabilmektedir. Sunulan bu çalışmada, enfekteli şalgam bitkilerinde hastalık gelişim süreçlerinin ve bitkilerin virüse reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla gözlem ve analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Denemede kullanılan CaMV izolatu düzenli olarak iklim odasında yetiştirilen lahana fidelerinde çoğaltılmıştır. Ticari firmalardan temin edilen şalgam tohumlarının viyollere ekimi yapılmıştır. Çimlenen fideler saksılara aktarılmış 2-4 yapraklı döneme gelene kadar kontrollü şartlar altında bekletilmiştir.

Şalgam bitkileri inokulasyon dönemi geldiğinde, CaMV ile enfekteli taze yapraklar, 0.01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7.0) kullanılarak (Nguyen et al., 2013) soğutulmuş steril havan içerisinde 1:5 oranında ezilmiştir. Karborandum tozu serpiyen şalgam bitkileri üzerine inokulasyon yapılmıştır (Guo et al., 2005).

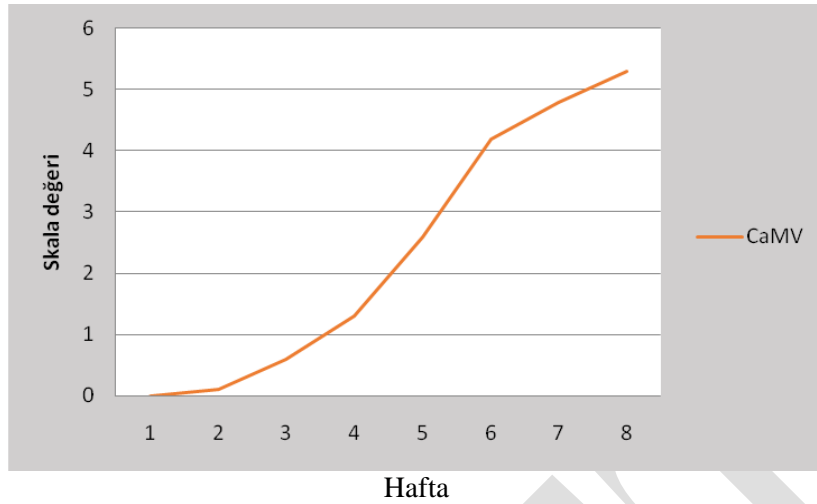
Mekanik inokulasyondan sonra fideler, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji laboratuvarına ait iklim odasında izlemeye alınmış ve gösterdiği reaksiyonlar kaydedilmiştir. Bitkilerde virüsün varlığı double-antibody sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) yöntemi kullanılarak teyit edilmiştir. Bitkiler sekiz hafta boyunca 0-9 skala (Fjellstrom ve Williams, 1997) değerine göre gözlem yapılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Mekanik inokulasyondan sonra ilk hafta içerisinde şalgam fidelerinde herhangi bir belirti görülmemiş ve virüs tespit edilmemiştir. İkinci haftadan itibaren hafif mozaik ile başlayan sistemik belirtiler gözlemlenmeye başlanmıştır (Şekil 1). Oluşan bu belirtiler haftalar ilerledikçe şiddetli hale gelip yapraklarda kıvrıkcıklaşma, kabarcıklaşma gelişme geriliği ve deformasyonlara neden olmuştur (Şekil 2)



Bitkiler sekiz hafta boyunca hastalık değerlendirme ölçeğine (0-9) göre kaydedilmiştir. Ortalama haftalık skala değerleri ölçümleri sırasıyla 0, 0.1, 0.6, 1.3, 2.6, 4.2, 4.8 ve 5.1 olarak bulunmuştur (Şekil 3).



**Şekil 3.** İnokulasyondan sonra şalgam bitkilerinde haftalık gelişim süreci  
İnokulasyondan sonra şalgam bitkilerinde hastalık gelişim sürecinde skala değerleri haftalık olarak artış göstermiş ve sekizinci hafta sonucunda ortalama 5.1’lik bir skala değeri bulunmuştur (Şekil 3).

Şalgam bitkilerinde virüs enfeksiyonları, deneme sürecinde DAS-ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, şalgamda hastalıklı bitki oranı % 94.4 olarak belirlenmiştir.

## SONUÇ

CaMV birçok Brassica türünde enfeksiyon gerçekleştirebilmekte farklı hastalık gelişim süreçlerine neden olabilmektedir. Sunulan bu çalışmada, CaMV ‘nin şalgam bitkileri üzerine etkisi araştırılmıştır. Enfekteli şalgam bitkilerinde hastalık gelişim süreçlerinin ve bitkilerin virüse reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla gözlem ve analizler yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, virüsün şalgam bitkilerinde sistemik semptomlara neden olduğu, bu semptomların şiddetinin enfeksiyondan iki hafta sonradan itibaren haftalara göre giderek artış gösterdiği ve yüksek bir enfeksiyon oranına (%94.4) neden olduğu saptanmıştır. Ancak yine de arazi şartlarında daha detaylı çalışmaların yapılmasına da ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Broadbent L. 2015. Investigation of virus diseases of Brassica crops. Cambridge University Press.
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Rao GZ. 2005. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after Turnip mosaic virus infection. Plant Science, 168: 57-63.
- Fjellstrom RG, Williams PH 1997. Fusarium yellows and Turnip mosaic virus resistance in *Brassica rapa* and *B. juncea*. HortScience, 32: 927-930.
- Hunter PJ, Jones JE, Walsh JA. 2002. Involvement of Beet western yellows virus, Cauliflower mosaic virus, and Turnip mosaic virus in internal disorders of stored white cabbage. Phytopathology, 92: 816-826.
- Kır B., Demiroğlu G., Soya H. 2007. Bazı yem şalgamı (*Brassica rapa* L.) çeşitlerinde verim özellikleri üzerinde bir araştırma. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi; 44: 87-97.
- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SYW, Duchene S, Vetten HJ, Lesemann D, Ohshima K 2013. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian Brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. PLoS One, 8: 1-13.
- Parlak AÖ, Sevimey C. 2007. Arpa ve buğday hasadından sonra bazı yem bitkilerinin ikinci ürün olarak yetiştirilme imkanları. Tarım Bilimleri Dergisi, 13: 101-107.
- Rao S, Horn F, 1995. Cereals and brassicas for forage. Forages, 1: 451-62.
- Schlegel RH, 2009. Dictionary of plant breeding. CRC press. Boca Raton, FL, 584p.
- Sıralı R, Atnan U, Zambı O, Dikmen A, Çağlar S, 2013. Turpgiller (Brassicaceae) familyasına ait bazı türlerin arıcılık açısından önemi. Akademik Ziraat Dergisi, 2: 107-15.
- Sutic DD, Ford RE, Tosic MT. 1999. Handbook of plant virus diseases. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

- Tansı V, Kumova U, Kızıl S, 1999. Bazı yem bitkilerinin arı merası olarak kullanılma olanakları ve tohum verim kalitelerinin saptanması üzerine bir araştırma. ÇÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 14: 81-90.
- Tomlinson JA. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. Annals of Applied Biology, 110: 661-681.
- TÜİK. 2016. Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel üretim istatistikleri veri tabanı. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>

DRAFT

## Evaluation of carba NP test for detection of carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* strains from clinical samples

Aynur Aybey, Elif Demirkan\*

Bursa Uludağ University, Faculty of Science and Literature, Department of Biology, Gorukle, Bursa, Turkey

Corresponding author e-mail: edemirkan@uludag.edu.tr

### Abstract

Carbapenems are the first antibiotics used in multiple resistant extended spectrum beta lactamase (ESBL)-producing bacterial infections. The widespread use of carbapenems in treatment of various serious infections caused by ESBL-producing strains induced the existence of carbapenemase-producing strains. The identification of carbapenemase-producing organisms is important for the spread of resistant isolates in our region and for the control of infection. In this study, 42 of *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated from the various clinical samples obtained Bursa Uludağ University, Medical Faculty Hospital, Department of Microbiology were used. Imipenem as carbapenem was used to determine antimicrobial susceptibility profiles of the isolates by the broth microdilution method with cation-adjusted Mueller-Hinton broth. Carba NP test was applied to determine the sensitivity and resistance of *K. pneumoniae* strains occurred in the presence of carbapenemase enzyme. At the end of half an hour incubation resulted in the conversion of phenol red to yellow at few strains and evaluated as positive. This situation became more evident after 1 and 2 hours. A 38 out of 42 strains were selected as carbapenem-resistant from broth microdilution, 18 (including susceptible samples) out of 42 strains in fresh phenol red-imipenem solution were found positive after 1 hour incubation. 29 out of 38 resistant strains in old and fresh solution were found positive, 9 of them found as negative after 2 hours incubation. Therefore 76.3 % of carbapenemase enzyme positivity was found from clinical samples. According to the results, fresh or old phenol red-imipenem solution did not change after 2 hours. Samples at 2 hours incubation were given more evident results. It was also observed that carbapenem resistance was considerably high among *K. pneumoniae* strains

**Keywords:** carbapenemase, imipenem, phenol red, carba NP.

### INTRODUCTION

The spread of carbapenemase-producing isolates in hospital settings is a major public health concern. Early detection of carbapenemase producers is essential to assure adequate therapy and favorable outcomes. Resistance to the most widely used carbapenems, i.e., imipenem and meropenem, can be mediated by a variety of mechanisms, including  $\beta$ -lactamases, porin changes, and changes in penicillin-binding proteins. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzymes are among the most common  $\beta$ -lactamases mediating carbapenem resistance among isolates of *Enterobacteriaceae* (Bradford et al., 2004; Smith et al., 2003; Yigit et al., 2002). Potential carbapenemase producers are currently screened first by susceptibility testing, using breakpoint values for carbapenems (Nordmann et al., 2011). However, this technique is time-consuming, and many carbapenemase producers do not confer obvious resistance levels to carbapenems. There is a need for laboratories to search for carbapenemase producers (Livermore et al., 2012).

The Carba NP test (CNPt) is a biochemical test for rapid detection (maximum 2 hours) of carbapenemase production on Gram-negative bacilli (Nordmann et al., 2012). It is based on *in vitro* hydrolysis of imipenem by a bacterial lysate, which is detected by changes in pH values using the indicator phenol red (red to orange/yellow). The CNPt was reported to be highly sensitive for detection of *K. pneumoniae* carbapenemases (Tijet et al., 2013).

The goal of this study was to conduct a rapid assessment of currently available antimicrobial susceptibility testing methods (broth microdilution and Carba NP tests) to determine whether these methods were capable of consistently detecting KPC-mediated carbapenem resistance in fresh clinical isolates of *K. pneumoniae*. Additionally, it was aimed to show the effects of modified Carba NP test to detect KPC producing strains.

### MATERIALS AND METHODS

#### Samples and Bacterial Strains

In this study, it was selected 42 isolates of *K. pneumoniae* from Bursa Uludağ University, Medical Faculty, all serviced by a central microbiology laboratory, on the basis of varying susceptibility patterns to imipenem. The isolates were from a variety of body sites (blood, urine, etc.) and obtained in a 1 month period. The carbapenem-resistant quality control isolates *K. pneumoniae* 1534 (containing the KPC-1 carbapenemase). All

bacterial strains were grown on Muller Hinton Agar (MHA) and then Muller Hinton Broth (MHB) before using for Carba NP test.

### The Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Klebsiella pneumoniae*

The antimicrobial susceptibility profiles of the isolates were determined by the broth microdilution method with cation-adjusted MHB as described in the Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]). Imipenem as carbapenem was used to determine antimicrobial susceptibility profiles of the isolates.

### Carba NP Test

The Carba NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) test was performed as follows. One calibrated loop (10 µL) of the tested strain directly recovered from the antibiogram was resuspended in a Tris-HCl 20 mmol/L lysis buffer, vortexed for 1 minute and further incubated at room temperature for 30 minutes. This bacterial suspension was centrifuged at  $10,000 \times g$  at room temperature for 5 minutes. 30 µL of the supernatant, corresponding to the enzymatic bacterial suspension, was mixed in a 96-well tray with 100 µL of a 1 mL solution made of 3 mg of imipenem monohydrate, pH 7.8, phenol red solution, and 0.1mmol/L ZnSO<sub>4</sub>. The phenol red solution was prepared by mixing 2 mL of a phenol red solution 0.5% (wt/vol) with 16.6 mL of distilled water. The pH value was then adjusted to 7.8 by adding drops of 1 N NaOH. A mixture of the phenol red solution and the enzymatic suspension being tested was incubated at 37°C for a maximum of 2 hours. Additionally, phenol red-imipenem solution was prepared and stored at 4°C for a day (It was called old phenol red-imipenem solution). This results were compared and evaluated with fresh phenol red-imipenem solution results.

## RESULTS AND DISCUSSION

To check the antimicrobial susceptibility profiles of the isolated *K. pneumoniae* strains from clinical samples, minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem were determined and all results were shown in Table 1. After these results, *K. pneumoniae* strains were evaluated as resistance or susceptible According to CLSI breakpoints. A 38 out of 42 strains were selected as carbapenem-resistant from broth microdilution.

**Table 1.** Imipenem susceptibility test results against isolated *K. pneumoniae* strains

Strain no	Specimen types of isolated strains	MIC (µg/ml)	CLSI interpretation
1,3,11,15,17,19,21,26,28,40,42	Urine (n=11)	16-32	R
2,8,9,38,41	Operation instruments (n= 5)	16-64	R
4,5,24,27,35	Endotracheal aspirate (n=5)	16-32	R
6,16,20,22,34	Wound (n=5)	32-128	R
7	Phlegm (n=1)	32	R
10,12,13,14,18,23,29,30,31,32	Blood (n=10)	16-128	R, S (29,30,31,32)
33	Periton (n=1)	16	R
36,39	Bile (n=2)	16-32	R
37	Tissue biopsy (n=1)	16	R
25	Abscess (n=1)	32	R
Control	<i>K. pneumoniae</i> 1534	16	R

According to CLSI breakpoints, S = susceptible, R = resistant. S: (MIC ≤ 2 mg/l), R: MIC ≥ 16 mg/l).

When the Carba NP test was used, the color of the wells started to turn from red to orange or yellow (Figure 1a and 1b) for strains that were producing carbapenemases (Table 1), whereas wells corresponding to bacterial extracts of isolates that did not produce carbapenemase remained red, whatever their level of carbapenem susceptibility (Table 1). The color changed from red to yellow 30 minutes after incubation for KPC producers began (data not shown). In most cases, incubation for 30 minutes was not sufficient for obtaining a frank color change for carbapenemase producers. At the end of half an hour incubation resulted in the conversion of phenol red to yellow at few strains and evaluated as positive. This situation became more evident after 1 and 2 hours (Table 2)

**Table 2.** Summary of susceptibility testing for 42 isolates

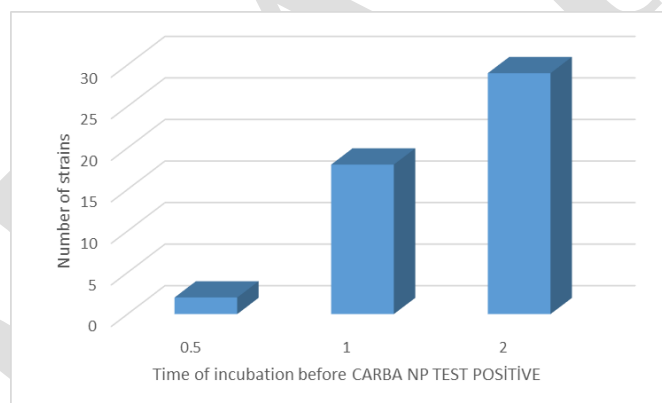
Methods	Resistance	Susceptible
Broth microdilution	38	4
Carba NP (30 min incubation)	2	40
Carba NP (1 hour incubation)	18	24
Carba NP (2 hour incubation)	29	13

A 18 (including susceptible samples) out of 42 strains in fresh phenol red-imipenem solution were found positive after 1 hour incubation. 29 out of 38 resistant strains in old and fresh solution were found positive, 9 of them found as negative after 2 hours incubation (Figure 2). Therefore 76.3 % of carbapenemase enzyme positivity was found from clinical samples.



**Figure 1.** Interpretation of Carba NP test results after 1 hour incubation (a) and 2 hour incubation (b).

A: Strain no, B: Phenol red solution, C: Fresh phenol red-imipenem solution, D: 1 day old phenol red-imipenem solution.



**Figure 2.** Number of the strains that were positive at Carba NP test.

According to the results, fresh or old phenol red-imipenem solution did not change the results after 2 hours. Samples at 2 hours incubation were given more evident results. When the Carba NP test is used for that purpose, we expect that the time to detect carbapenemase producers will decrease by at least 24 hours (Figure 1).

It was also observed that carbapenem resistance was considerably high among *K. pneumoniae* strains at Bursa Uludağ University, Medical Faculty Hospital.

## CONCLUSION

The Carba NP test has multiple benefits. It is inexpensive, rapid, reproducible, and highly sensitive and specific, but after 2 hours incubation. Using this accurate test would improve detection of patients infected or colonized with carbapenemase producers.

## REFERENCES

- Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* spp. possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*, 39: 55–60.
- Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al 2012. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother*, 67: 1569–1577.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—sixth edition. NCCLS document M7–A6. Wayne (PA).
- Nordmann P, Naas T, Poirel L 2011. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 17:1791–1798.
- Nordmann P, Poirel L, Dortet L 2012 Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 18,1503–1507.
- Tijet N, Boyd D, Patel S, Mulvey M, Melano R 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57:4578–4580.
- Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, et al 2003. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 51:711–4.
- Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW, Steward CD, Rasheed JK, Valera LL, et al 2002. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC analogs. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:3817–22.



## Synergistic effects of some membrane active cationic antimicrobial peptides in combination with conventional antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*

Aynur Aybey

Bursa Uludağ University, Faculty of Science and Literature, Department of Biology, Gorukle, Bursa, Turkey

Corresponding author e-mail: aynuraybey@uludag.edu.tr; aybeyaynur@gmail.com

### Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are gaining attention as viable alternatives to antibiotics due to the broad spectrum of activities and abundantly present in multicellular organisms that act against pathogenic bacteria. The combination of cationic AMPs and conventional antibiotics enables to reduce the overall cost and widen the power of synergistic effects. In this study, the cationic membrane active AMPs were screened and then the most effective AMPs against *Pseudomonas aeruginosa* strains were synthesized and purified by using solid-phase synthesis, analytical HPLC, preparative HPLC, and MALDI TOF mass spectrometry. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of 10 of AMPs and 10 of antibiotics were determined. The effects of antibiotics and AMPs in combination were assessed by checkerboard assay in order to eliminate the antibiotics that could not be potentiated by peptide-induced membrane permeabilization. In combination assays, azithromycin, ciprofloxacin and colistin (3 of antibiotics) were most efficiently potentiated in the presence of 0.25 µg/ml K11, IsCT-P, P1, T9W, MSI-78, Cecropin B1, Pep-1-k, and K<sub>4</sub>S4. MICs of these antibiotics in these combinations were decreased at least 4- fold as compared to those of the antibiotics and AMPs alone. As judged from the results obtained with 0.0625 µg/ml peptide concentration, the most pronounced synergistic effects of some AMPs were found when they were combined with only ciprofloxacin and azithromycin. AMPs used in this study were reported to boost the activities of two of antibiotics with a great synergistic effect. Thus, a new hope has emerged for fighting the battle by combining these conventional antibiotics with these selected AMPs.

**Keywords:** AMPs, antibiotics, synergy, *Pseudomonas aeruginosa*.

### INTRODUCTION

Antimicrobial peptides (AMPs) are key components of native immunity. AMPs that have been isolated from bacteria, fungi, plants and animal including human are usually cationic and amphiphilic. AMPs are mostly gene encoded peptides initially synthesized as pre-pro-peptides which after cleavage of per- and pro-segment from N-terminal become fully functional (Bals 2000). AMPs cause membrane lysis at high concentration and no-membrane lysis at low concentration. Moreover, wide spectrum, selective target, lower toxicity and diverse mechanism of action make AMPs an ideal candidate as future medicine (Hancock and Patrzykat, 2002).

Unlike most common small molecule antibiotics, AMPs have been refined by evolution to work synergistically within the host environment. Thus, AMPs appear to be top candidates to broaden our limited therapeutic arsenal, and they are very well suited to be used in synergistic combinations with currently available antibiotics as they have been shown to efficiently permeabilize bacterial membranes to enhance activity of current antibiotics (Cassona and Otvos, 2010). The effects of AMPs combined with antibiotics often exceed those of the individual drugs, whether in antibacterial activities (Giacomette et al., 2005; Livermore et al., 2013). Drug design research faces a long and difficult challenge to overcome drug resistance, whereas drug combinations require no drug modification and lower doses can be used while enhancing the therapeutic potential (Desbois and Coote, 2011). It is particular interest to explore the possibility for circumventing resistance to currently used antibiotics by examining a AMP-antibiotics combinations on clinical isolates exhibiting a known resistance pattern.

In this study, the most pronounced synergistic effects of some selected AMPs were found in combination with ciprofloxacin and azithromycin. AMPs were reported to boost the activities of these antibiotics with a great synergistic effect. Thus, a new hope has emerged for fighting the battle by combining conventional antibiotics with AMPs.

## MATERIALS AND METHODS

### Screening and Selection of AMPs

The literature was screened in order to select the most effective peptides towards *P. aeruginosa* strains. After collecting the information about compounds already reported in the literature, peptides with the lowest MIC values towards *P. aeruginosa* in combination with relatively short amino acid sequences were selected for synthesis.

### Bacterial Strains, Growth Conditions and Chemicals

*P. aeruginosa* (ATCC 27853) strain was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and then grown overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  (300 rpm) in cation-adjusted MHB II broth adjusted to  $\text{pH } 7.4 \pm 0.2$  (MHB, Becton Dickinson, 212322). The MBC (minimal bactericidal concentration) was determined by plating on wells with no visible growth on brain heart infusion agar (BHI, Oxoid, CM1135) containing 1.5% agar (AppliChem, A7354). All antibiotics used were purchased from TCI or Sigma Aldrich and prepared as stock solutions of 1024  $\mu\text{g/ml}$  and 2048  $\mu\text{g/ml}$ .

### General Procedures for Peptide Analysis, Purification and Synthesis

All peptides were synthesized by microwave-assisted solid-phase synthesis (SPPS) on an automated CEM Liberty synthesizer at Natural Products and Peptides Group, Department of Drug Design and Pharmacology, University of Copenhagen, DK. The crude products were purified by preparative HPLC, and the expected molecular weights of purified peptides were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

### Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The bacterial growth-inhibitory ability of AMPs and antibiotics were determined by microtiter MIC determination in MHB II (Muller Hinton Broth II) according to CLSI guidelines (Wayne 2005). The AMPs and antibiotics were tested against *P. aeruginosa* (ATCC 27853) in triplicates. Bacterial cells were diluted in sterile PBS to  $\text{OD}_{546} 0.13$  corresponding to approximately  $1 \times 10^8$  CFU/ml. This suspension was further diluted 1:100 in MHB before adding to wells. First 100  $\mu\text{l}$  MHB was added to each well and then 200  $\mu\text{l}$  of each AMP sample and each antibiotic in MHB II were added to row A. AMPs and antibiotics were serially diluted then 100  $\mu\text{l}$  diluted bacterial culture were placed into plates. In addition 200  $\mu\text{l}$  MHB as reference wells (negative/sterility control) and 100  $\mu\text{l}$  diluted bacterial culture in 100  $\mu\text{l}$  MHB (positive/growth control) were included. Incubation was performed for 20-24 h at  $37^{\circ}\text{C}$  by shaking. The MICs were determined by adding 40  $\mu\text{l}$  0.002% MTT to all wells to visualize the growth after incubation.

### Combination Assay

The effects of antibiotics and AMPs in combination were assessed by using the broth microdilution technique. Each microtiter well containing 100  $\mu\text{l}$  of 0.25  $\mu\text{g/ml}$  AMPs in MHB and serially dilution of antibiotics (from 2 x MIC) in MHB was inoculated with 100  $\mu\text{l}$  overnight bacterial culture diluted to give a final concentration of approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Serial dilution of antibiotics (from 2 x MIC) in MHB without AMPs was also performed as control besides positive and negative control. After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 20-24 h, the MIC of the AMP-antibiotic combination was determined, and then the reduction in MIC of the antibiotic was calculated.

### Checkerboard Assay

Serial two-fold dilutions of the tested antibiotics in cation-adjusted MHB II were placed alone and in combination with 0.25  $\mu\text{g/ml}$  of AMPs in wells of a microtiter plate and inoculated with an appropriate bacterial inoculum so that each well contained approximately  $5 \times 10^5$  CFU/ml. After incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 h, the MIC was determined as the well containing the lowest concentrations of the two compounds (antibiotic and AMP) in which no visible growth was observed. Concentrations of each antibiotic when tested in combination started at 2 x MIC. The synergistic interactions were expressed as the fractional inhibitory concentration index (FICI) as follows:  $\text{FICI} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$ , where FIC A is the MIC of antibiotic A in the combination/MIC of drug A alone, and FIC B is the MIC of drug B in the combination/MIC of peptide B alone (Eliopoulos and Moellering, 1991).

The peptide-antibiotic interaction is defined as synergy when the fractional inhibitory concentration (FIC) index is  $\leq 0.5$ ; as additive with an FIC index  $> 0.5$  but  $\leq 1$ ; as indifference with an FIC index of  $> 1$  but  $< 4$ , and as antagonism with an FIC index  $\geq 4$ .

## RESULTS

### Selected AMPs

The complete literature survey of the most effective AMPs towards *P. aeruginosa* is compiled and important AMPs were selected by checking features of the comprise length, charge and cytotoxicity towards mammalian cells, which all are essential when selecting starting points for synthesis of more potent membrane active cationic AMPs.

**Table 1.** Properties of selected AMPs with high potency towards *P. aeruginosa* strains from literature

Name	Sequence	MIC (µg/ml)	Length	Charge
<b>Pep-1-K</b>	KKTWWKTWWTKWSQPKKKRKV-NH <sub>2</sub>	1	21	+9
<b>L<sub>8</sub>K<sub>9</sub>W<sub>1</sub>-(L-Pro)</b>	KWKKLLKKPLKLPKLLK-NH <sub>2</sub>	1	18	+10
<b>K<sub>4</sub>-S4(1-16)</b>	ALWKTLLKKVLKAAAK-NH <sub>2</sub>	1	16	+6
<b>P1</b>	KWKLFFKKIGIGKFL-NH <sub>2</sub>	1	14	+6
<b>IsCT-P</b>	ILKKIWKPIKKLF-NH <sub>2</sub>	1	13	+10
<b>K<sub>6</sub>L<sub>2</sub>W<sub>3</sub></b>	KLWKKWKKWLK-NH <sub>2</sub>	1	11	+7
<b>T9W</b>	RFRRLRKKWRKRLKKI-NH <sub>2</sub>	1	16	+12
<b>K11</b>	KWKSFIKKLTKKFLHSAKKF-NH <sub>2</sub>	0.25	20	+9
<b>MSI-78(4-20)</b>	KFLKKAKKFGKAFVKIL-NH <sub>2</sub>	0.1	17	+6
<b>Cecropin B1</b>	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIV-NH <sub>2</sub>	<0.5	20	+6

### Synthesized AMPs

Selected AMPs were synthesized, purified, calculated their mass to charge ratio (m/z) and molecular weights (datas not shown). AMP structures were drawn in ChemBioDraw Ultra 14.0 to allow calculation of their mass to charge ratio (m/z), together molecular weights (MW) including TFA as counterions for positively charged residues (Lys/Arg/His and N-terminus). All AMPs were purified (>98% homogeneity) and weighted out and stored in freezer until use.

### Antimicrobial Activities of AMPs and Antibiotics

The MICs of antibiotics and AMPs were determined by the MHB microdilution technique. All MICs of AMPs were found to be somewhat higher than reported in literature (Table 1 and Table 3). This is most likely due to the extended use of non-CLSI protocols in many previous studies on AMPs. As it can be seen synergic antibiotics with AMPs under next caption, these synergic antibiotics were selected to use for further synergy test towards *P. aeruginosa* ATCC27853.

**Table 2.** Mass to charge ratio (m/z) and molecular mass of AMPs

Name	Sequence	m/z	MW (g/mol)
<b>Pep-1-K</b>	KKTWWKTWWTKWSQPKKKRKV-NH <sub>2</sub>	2843.6421	3984.64
<b>L<sub>8</sub>K<sub>9</sub>W<sub>1</sub>-(L-Pro)</b>	KWKKLLKKPLKLPKLLK-NH <sub>2</sub>	2229.5738	3370.25
<b>IsCT-P</b>	ILKKIWKPIKKLF-NH <sub>2</sub>	1653.1222	2338.32
<b>Cecropin B1</b>	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIV-NH <sub>2</sub>	2443.4555	3356.23
<b>K<sub>4</sub>-S4(1-16)</b>	ALWKTLLKKVLKAAAK-NH <sub>2</sub>	1780.1815	2465.45
<b>P1</b>	KWKLFFKKIGIGKFL-NH <sub>2</sub>	1704.0967	2389.86
<b>K<sub>6</sub>L<sub>2</sub>W<sub>3</sub></b>	KLWKKWKKWLK-NH <sub>2</sub>	1570.0024	2369.17
<b>T9W</b>	RFRRLRKKWRKRLKKI-NH <sub>2</sub>	2267.5113	3636.19
<b>K11</b>	KWKSFIKKLTKKFLHSAKKF-NH <sub>2</sub>	2492.5341	3519.35
<b>MSI-78(4-20)</b>	KFLKKAKKFGKAFVKIL-NH <sub>2</sub>	1993.3162	2905.80

**Table 3.** MIC values of antibiotics and AMPs towards *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Antibiotics	MICs ( µg/ml)	AMPs	MICs ( µg/ml)
Ampicillin (AMP)	>256	IsCT-P	32-64
Azithromycin (AZM)	128-64	P1	64
Tobramycin (TOB)	0.5-0.25	T9W	2-4
Fosfomicin (FOS)	32	MSI-78 (4-20)	16
Ciprofloxacin (CIP)	0.25-0.5	K <sub>4</sub> -S4 (1-16)	16-32
Amikacin (AMK)	2	L <sub>8</sub> K <sub>9</sub> W <sub>1</sub> -(L-Pro)	64
Colistin (COL)	2	Cecropin B1	32-128
Tetracycline (TET)	128-64	Pep-1-K	64
Meropenem (MER)	0.5	K <sub>6</sub> L <sub>2</sub> W <sub>3</sub>	16-32
Gentamicin (GEN)	0.5-1	K11	8-16

### AMP-induced Membrane Permeabilization to Conventional Antibiotics

In this part of the study, it was firstly determined the most effective antibiotics with AMPs towards *P. aeruginosa* ATCC 27853 and then eliminated the nonactive antibiotics. The most active antibiotics were used for further synergy tests.

In these combinations, MICs of AZM and CIP with IsCT-P, P1, T9W, MSI-78 (4-20), K<sub>4</sub>-S4 (1-16) and Cecropin B1, CIP with K11, COL with T9W, TET with IsCT-P were decreased by at least 4-fold compared with antibiotics used alone. In combination assays, the most effective antibiotics with 0.25 µg/ml of AMPs

were determined as AZM, CIP, TET in combination. AMP, AMK, FOS, MER, GEN and TOB as antibiotics and L<sub>8</sub>K<sub>9</sub>W<sub>1</sub>-(L-Pro), K<sub>6</sub>L<sub>2</sub>W<sub>3</sub> as AMPs were eliminated for further studies. Most effective combinations were shown in bold type in Table 4. MICs in combination were used for Fractional inhibitory concentration (FIC) to see the synergy between antibiotics and AMPs.

#### Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index of AMPs/antibiotics towards *P. aeruginosa* strain

To test the synergy between AMPs and antibiotics, it was adapted the checkerboard methodology that was widely used to determine interactions between antibacterial compounds. Based on the initial results the most promising AMPs were combined with the commonly used antibiotics azithromycin, ciprofloxacin and colistin towards *P. aeruginosa* ATCC 27853 to give the results shown in Tables 5. In all cases, it was observed either synergy, i.e. a fractional inhibitory concentration (FIC) <0.5, indicating that the MIC of each compound in combination was decreased at least 4 fold as compared to the compounds used alone, near synergy (FIC <0.56) or additive interactions (FIC = 0.5-1).

Synergistic effects (FICI < 0.5) were seen against *P. aeruginosa* for almost half of the AMP-antibiotic combinations. AMPs being synergistic at a concentration of 0.0625 µg/ml in combination with antibiotics against *P. aeruginosa* ATCC 27853 were selected. A number of AMPs, e.g. T9W, K11, IsCT-P, P1 and Pep-1-K showed strong synergistic activity with ciprofloxacin against *P. aeruginosa*. Only one AMP P1 with azithromycin against *P. aeruginosa* displayed synergy under these conditions. As judged from the results obtained with 0.0625 µg/ml AMP concentration, the most pronounced synergistic effects of AMP were found when they were combined with ciprofloxacin and azithromycin. Other antibiotics, that appeared effective against *P. aeruginosa* did not show any strong synergistic effects when combined with AMPs at a 0.0625 µg/ml concentration.

**Table 4.** Combination antibiotics with 0.25 µg/ml of AMPs towards *P. aeruginosa* ATCC 27853.

	Antibiotics	AMK	AMP	AZM	CIP	COL	GEN	FOS	MER	TET	TOB
<b>AMPs</b>	<b>MICs alone (µg/ml)</b>	2	≥ 256	128	0.5	2	1	32	0.5	64	0.5
IsCT-P	64	2	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	2	1	>32	0.25	<b>16</b>	0.25
P1	64	4	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	1	1	>32	0.25	32	0.25
T9W	2	4	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	<b>0.25</b>	<b>1</b>	>32	0.25	32	0.5
MSI-78 (4-20)	16	2	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	1	1	>32	0.5	32	0.5
K <sub>4</sub> -S <sub>4</sub> (1-16)	32	4	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	1	1	>32	0.25	64	0.5
L <sub>8</sub> K <sub>9</sub> W <sub>1</sub> -(L-Pro)	64	2	>256	64	0.25	2	1	>32	0.25	32	0.25
Cecropin B1	32	2	>256	<b>32</b>	<b>0.125</b>	1	2	>32	0.5	32	0.25
Pep-1-K	64	4	>256	64	<b>0.125</b>	1	1	>32	0.5	32	0.25
K <sub>6</sub> L <sub>2</sub> W <sub>3</sub>	16	4	>256	64	0.25	1	1	>32	0.25	32	0.25
K11	16	2	>256	64	<b>0.125</b>	1	1	>32	0.5	32	0.25

## DISCUSSION

10 of membrane active cationic AMPs were selected from literature for this study why features of the selected AMPs such as length, charge were really important to design more effective, cell selective and specific targeted AMPs. The cell membranes of bacteria are rich in acidic phospholipids, such as phosphatidyl glycerol and cardiolipin. These phospholipid head groups are heavily negatively charged. Therefore, the outmost leaflets of the bilayer which is exposed to the outside of the bacterial membranes are more attractive to the attack of the positively charged AMPs (Matsuzaki, 2008). So the interaction between the positive charges of AMPs and the negatively charged bacterial membranes is mainly the electrostatic interactions, which is the major driving force for cellular association. An electrostatic interaction between the cationic AMPs and the negatively charged bacterial cell surface plays an important role in their antibacterial activity (Hancock 2001). Pep-1-K, L<sub>8</sub>K<sub>9</sub>W<sub>1</sub>-(L-Pro), K<sub>4</sub>-S<sub>4</sub>(1-16), P1, IsCT-P, K<sub>6</sub>L<sub>2</sub>W<sub>3</sub>, T9W, K11, MSI-78(4-20) and Cecropin B1 in this studies are membrane active cationic AMPs that have strong antimicrobial activity against several pathogens (Jiang et al., 2012; Lim et al., 2006; Monteiro et al., 2015; Novan-Venezia et al., 2002; Park et al., 2006; Park et al., 2009; Osamo et al., 2015; Shin et al., 2014; Zhu et al., 2006).

**Table 5.** FIC index of selected AMPs/antibiotics combinations against *P. aeruginosa* ATCC 27853

Antibiotics	AMPs	FICI	MICs (combination) (µg/ml)		MICs alone (µg/ml)	
			Antibiotics	AMPs	Antibiotics	AMPs
CIP	IsCT-P	0.2519	0.0625	0.0625	0.25	32
CIP	P1	0.2509	0.0625	0.0625	0.25	64
CIP	T9W	0.1562	0.0312	0.0625	0.25	2
CIP	MSI-78(4-20)	0.1406	0.0039	2	0.25	16
CIP	K <sub>4</sub> -S <sub>4</sub> (1-16)	0.5019	0.125	0.0625	0.25	32
CIP	Cecropin B1	0.5019	0.125	0.0625	0.25	32
CIP	Pep-1-K	0.2509	0.0625	0.0625	0.25	64
CIP	K11	0.2578	0.0625	0.0625	0.25	8
AZM	IsCT-P	0.0189	2	0.125	128	32
AZM	P1	0.0166	2	0.0625	128	64
AZM	T9W	0.3125	8	0.5	128	2
AZM	MSI-78 (4-20)	0.0234	2	0.125	128	16
AZM	K <sub>4</sub> -S <sub>4</sub> (1-16)	0.0195	2	0.125	128	32
AZM	Cecropin B1	0.1289	16	0.125	128	32
COL	T9W	0.75	1	0.5	2	2

Multidrug combinations are sometimes used for the treatment of bacterial infections. Thus it is reasonable to propose a combination therapy utilizing AMPs and chemical antibiotics because the mechanism of action of membrane permeabilizing AMPs is so dramatically different from the chemical antibiotics. AMPs synergize with some antibiotics increasing the permeability of bacterial membranes. AMPs could enhance the activity of some enzymes that decrease the integrity of peptidoglycan layer, allowing antibiotics that affect cell wall synthesis to act more efficiently.

Ciprofloxacin (CIP) has been combined with some antibiotics and AMPs to improve its antimicrobial activity against *P. aeruginosa* (Tamma et al., 2012; Pankuch et al., 2008). Results from this study suggest that lower doses of antibiotic as CIP could be used to control (bacteriostatic effect) or eliminate (bactericidal effect) *P. aeruginosa* when used in combination with selected AMPs (IsCT-P, P1, T9W, Pep-1-K, K11). The use of lower doses of antibiotic may decrease the emergence of bacterial populations resistant to these agents, and may enable circumvention of existing antimicrobial resistance.

## CONCLUSION

In summary, synergistic combinations have proved to be the powerful therapy which can overcome the disadvantage of individual AMPs and provide new alternatives against pathogens. More researches should be carried out to discover new synergistic combination. This combination therapy allows the use of lower concentrations of selected AMPs and restores the effectiveness of antibiotics.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was a small part of a project that was supported by Tübitak 2219 Postdoctoral Scholarship Programme in 2016. I am grateful to Assoc. Prof. Henrik Franzyk from University of Copenhagen, Department of Drug Design and Pharmacology for teaching methods about design, synthesis, purification of AMPs.

## REFERENCES

- Bals R 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res.* 1: 141-150.
- Cassone M, Otvos L 2010. Synergy among antibacterial peptides and between peptides and small-molecule antibiotics. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(6):703-16.
- Desbois AP, Coote PJ 2011. Bactericidal synergy of lysostaphin in combination with antimicrobial peptides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 30(8):1015-1021.
- Eliopoulos GM, Moellering RC 1991. Antimicrobial combinations. In: Lorian V (ed) *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd edn. The Williams & Wilkins Co., Maryland, pp 432-492.
- Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, et al. 2005. In vitro activity of MSI-78 alone and in combination with antibiotics against bacteria responsible for bloodstream infections in neutropenic patients. *Int J Antimicrob Agents.* 26(3):235-240.
- Hancock RE 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet (Infect. Dis.)* 1: 156-164.

- Hancock RE, Patrzykat A 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2: 79-83.
- Jiang HJ, Chun LJ, Shan HQ, Dong LG 2012. The Design and Construction of K11: A Novel  $\alpha$ -Helical Antimicrobial Peptide. *Int J Microbiol.* ID:764834.
- Lim SS, Yoon S-P, Park Y, Zhu WL, Park I-S, Hahm K-S, Shin SY 2006. Mechanism of antibacterial action of a synthetic peptide with an Ala-peptoid residue based on the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT. *Biotechnol Lett.* 28:1431-1437.
- Livermore DM, Warner M, Mushtaq S 2013. Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 68(10):2286–2290.
- Matsuzaki K 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:1-10.
- Monteiro C, Pinheiro M, Fernandes M, Maia S, Seabra C, Ferreira-da Silva F, Reis S, Gomes P, Martins MCL 2015. A 17-mer membrane active MSI-78 derivative with improved selectivity toward bacterial cells. *Mol pharmaceutics.* 12: 2904-2911.
- Navon-Venezia S, Feder R, Gaidukov L, Carmeli Y, Mor A 2002. Antibacterial Properties of Dermaseptin S4 Derivatives with In Vivo Activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3): 689-694.
- Osama AK, Abdelahhab B, Nada AA, Koshy P 2015. Elucidating the mechanism of peptide interaction with membranes using the intrinsic fluorescence of tryptophan: perpendicular penetration of cecropin B-like peptide into *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Adv.* 5:14214.
- Park Y, Park SN, Park S-C, Shin SO, Kim J-Y, Kang S-J, Jeong C-Y, Hahm K-S 2006. Synergism of Leu-Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1764: 24-32.
- Park KY, Nan YH, Park Y, Kim JI, Park IS, Hahm K-S, Shin SY 2009. Cell specificity, anti-inflammatory activity, and plausible bactericidal mechanism of designed Trp-rich model antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1788:1193-1203.
- Pankuch GA, G Lin, H Seifert, PC Appelbaum 2008. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:333–336.
- Shin SY 2014. Effect of double replacement of L-Pro, D-Pro, D-Leu or Nleu in Hydrophobic Face of Amphipathic  $\alpha$ -Helical Model Antimicrobial Peptide on Structure, Cell Selectivity and Mechanism of Action. *Bull Korean Chem Soc.* 35(11): 3267.
- Tamma P, S Cosgrove, L Maragakis 2012. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 25:450–470.
- Wayne PA 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute MS100-S15.*
- Zhu WL, Lan H, Park I-S, Kim JI, Jin HZ, Hahm K-S, Shin SY 2006. Design and mechanism of action of a novel bacteria-selective antimicrobial peptide from the cell-penetrating peptide Pep-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 349:769-774.

## Sülfametoksazol'ün Sulu Çözeltilerden Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT Kullanılarak Gideriminin Modellenmesi

Özlem ERDAL<sup>1\*</sup>, Veyis SELEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ozlemerdal6@gmail.com

### Özet

Antibiyotikler, insan sağlığı için tıpta, hayvan sağlığı için veterinerlikte ve koruma amaçlı olarak tarımda oldukça yaygın olarak kullanılan farmasötiklerin başında gelmektedir. Antibiyotiklerin büyük bir kısmı metabolize olmadan idrar ve dışkı yoluyla atılmaktadır ve böylece antibiyotik içeren atıklar çevrede bulunmaktadır. Sonuç olarak hem su hem de toprak kirliliğine ve antibiyotik direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Bu durum, hem yeni hastalıkların ortaya çıkmasına hem de mevcut hastalıkların tedavisinin zorlaşmasını sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı antibiyotiklerin çevreye verilmeden önce uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada, tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılan sülfametoksazol (SMZ) antibiyotiğinin sulu çözeltilerden manyetik özellik kazandırılan çok duvarlı karbon nanotüpler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT) kullanılarak giderimi Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak modellenmiştir. Gerçekleştirilen modelleme çalışmasında cevap değişkeni olarak seçilen antibiyotik giderim yüzdesi üzerine etkin olan parametreler, çözelti başlangıç pH'ı, SMZ konsantrasyonu, adsorbent konsantrasyonu ve temas süresi olarak seçilmiştir. Matematiksel model denklemini geliştirmek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemlerinden (CYY) olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) kullanılmıştır. Yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucunda yüksek bir regresyon katsayısı değeri (R<sup>2</sup>=0.991) elde edilmiştir. SMZ antibiyotiğinin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile adsorpsiyonu üzerine, adsorbent konsantrasyonunun, çözelti başlangıç pH'ının ve SMZ konsantrasyonunun kuadratik, temas süresinin lineer olduğu gözlemlenmiştir. Çözelti başlangıç pH'ı ve SMZ konsantrasyonu ile çözelti başlangıç pH'ı ve adsorbent konsantrasyonu arasındaki ikili etkileşimin oldukça önemli olduğu (P < 0.05) sonucuna varılmıştır. **Anahtar Kelimeler:** Adsorpsiyon, Cevap Yüzey Yöntemi (CYY), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT, Sülfametoksazol (SMZ).

### Modelling of Sulfamethoxazole Adsorption from Aqueous Solutions onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs

#### Abstract

Antibiotics are one of the most widely used pharmaceuticals for human health in medicine, animal health in veterinary medicine and protection of products in farming. Most of the antibiotics are excreted by urine and feces without being metabolized, and thus the wastes containing antibiotics are in the environment. As a result, it causes both water and soil pollution and development of antibiotic resistance. This situation makes both the emergence of new diseases and the difficult treatment of existing diseases. For these reasons, antibiotics should be removed before being given to the environment. In this study, removal of sulfamethoxazole (SMZ) antibiotic, which is frequently used in medical applications, from aqueous solutions using magnetic multi-walled carbon nanotubes (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs) was modeled by Response Surface Method (RSM). In the modeling study, parameters effective on percentage of antibiotic removal selected as the response variable were selected as the initial pH of solution, the concentration of antibiotic, the concentration of adsorbent and the contact time. In order to develop the mathematical model equation, Central Composite Design (CCD) was used from Response Surface Methods. As a result of variance analysis (ANOVA), a high regression coefficient value (R<sup>2</sup>=0,991) was obtained. Onto the adsorption of SMZ with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs, it was observed that the concentration of adsorbent, the initial pH of solution and the concentration of SMZ were quadratic and the contact time was linear. It was concluded that the double interaction between the initial pH of solution and the concentration of SMZ and the initial pH of solution and the concentration of adsorbent was very important (P<0,05).

**Keywords:** Adsorption, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs, Response Surface Methods (RSM), Sulfamethoxazole (SMZ).

### GİRİŞ

Antibiyotikler, mikrobiyal enfeksiyonları önlemek veya tedavi etmek için kullanılan, tarımdan, çiftlik ve kümes hayvanlarında büyüme destekleyicisi olarak kullanımına kadar çok geniş yelpazede uygulama alanı bulan farmasötik biyoaktif bileşenlerdir (Song vd., 2017 ve Soran vd., 2017). Antibiyotiklerin büyük bir kısmının insanlarda metabolize edilmeden idrar ve dışkı ile atılması, hayvanlarda kullanımı sonrasında tarım

arazilerinde gübre olarak toprağa karışması ve antibiyotik içeren atık suların çevreye deşarj edilmesi mikroorganizmaların direnç geliştirmesine ve bu antibiyotiklerden istenilen düzeyde faydalanılmamasına neden olmaktadır (Qiao vd., 2015). Atık su arıtım tesislerinde biyolojik arıtım proseslerinde aktif çamur yapısında bulunan mikroorganizmalarda bu antibiyotiklerden etkilenerek direnç geliştirmekte ve yeterli arıtım düzeyine ulaşılmasını engellemektedir (de Sousa vd., 2018). Dolayısıyla özellikle antibiyotik direnci oluşumunun önüne geçmek için atık suların arıtılması büyük bir önem arz etmektedir (Lan vd., 2016).

Antibiyotiklerin atık sulardan arıtımında kullanılan yaygın yöntemlerden biri olan adsorpsiyon, antibiyotik içeren atık suların arıtımında yüksek giderim verimi, proses işletim maliyetlerinin düşük olması ve işletim kolaylığı açısından diğer yöntemlere nazaran bir adım öndedir (Jang vd., 2018). İşlem sırasında kullanılan adsorbentün üretimi, proses maliyetini doğrudan etkileyen en önemli etkenlerden biridir. Yapılan çalışmalar sonucunda etkin ve kolay üretim yöntemleri çok duvarlı karbon nanotüpler (ÇDKNT)'in üretim maliyetini düşürdüğünü göstermektedir (Selen vd., 2016). ÇDKNT, benzersiz kimyasal yapıları ve yüksek spesifik yüzey alanları nedeniyle büyük bir ilgi görmektedir (Zhao vd., 2016) ve bu özellikleri ÇDKNT'in adsorpsiyon yöntemi için uygun bir adsorbent olduğunu göstermektedir.

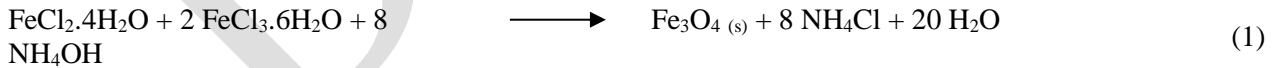
Adsorpsiyon prosesi ile gerçekleştirilen arıtım işleminin sonunda adsorplayıcı katı materyalin sulu ortamdan ayrılması ve geri kazanılarak ikincil bir atık sorununun ortadan kaldırılması gerekmektedir. Atık su arıtımı sonrası katı ve sıvı fazın birbirinden ayrılmasında kullanılan santrifüj ve filtrasyon işlemlerinin kolay bir şekilde bloke olması ve katı kaybının yaşanmasından dolayı yetersiz kalmaktadır. Bu problemin üstesinden gelebilmek için son yıllarda manyetik özellik kazandırılmış yeni nesil adsorbentlerin geliştirilmesine önem verilmektedir (Soran vd., 2017). Adsorbentlere kazandırılan manyetik özellik sayesinde, büyük miktardaki atık suların hızlı bir şekilde arıtılması mümkün olduğu gibi sıvı fazda da herhangi bir adsorbent kalıntısı kalmamaktadır.

Cevap Yüzey Yöntemi (CYY), matematiksel ve istatistiksel tekniklerden oluşan, bağımsız değişkenler ve bir veya birden fazla cevap arasındaki ilişkiyi analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir (Dehghani vd., 2017). Ayrıca, deneylerin tasarlanması, çeşitli bağımsız değişkenlerin görece öneminin değerlendirilmesi ve süreçlerin optimize edilmesi içinde kullanılır (Ghorbani ve Kamari, 2017). CYY, geleneksel yöntemlere kıyasla minimum sayıda deneme, daha düşük işlem maliyeti ve daha az ekstra kimyasal kullanımı gibi birçok avantaja sahiptir. Ek olarak, CYY geleneksel yöntemlerden farklı olarak, tüm bağımsız değişkenlerin cevap değişkenleri üzerindeki birleşik etkilerini de göstermektedir (Tabassi vd., 2017). CYY, dört temel adım içermektedir. Bunlar; yöntemin optimum bölgeye taşınması, optimum bölgede cevabın davranışı, optimum koşulların tahmini ve doğrulama süreçleridir.

Bu çalışmada, tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılan sülfametoksazol (SMZ) antibiyotiğinin sulu çözeltilerden manyetik özellik kazandırılan çok duvarlı karbon nanotüpler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT) kullanılarak giderimi Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak modellenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

ÇDKNT'ler kimyasal buhar biriktirme yöntemi kullanılarak daha önceki bir çalışmamızda sentezlenmiştir (Selen vd., 2016). ÇDKNT'ler manyetik karakter kazandırmak ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT yapısının sentezlenmesi için Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> aşağıda verilen reaksiyon denklemlerine göre; demir (II) klorür (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O), demir (III) klorür (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) ve amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) kullanılmıştır (Bayazit ve Kerkez, 2014).



Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT sentezi, 80 °C sıcaklıkta sabit tutulan bir su banyosu (Nükleon NSB-12) içerisine 500 ml'lik üç boyunlu cam bir balonda gerçekleştirilmiştir. Balon içerisine koyulan 200 ml distile saf su içerisinde molar oranlarda FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ve FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1:2) eklenerek mekanik karıştırıcı vasıtasıyla şiddetli karıştırma (Daihan HS-120A) yapılmış ve demir klorürlerin çözünmesi sağlanmıştır. İnert atmosfer ortamının sağlanması için balon içerisindeki karışımdan azot gazı (N<sub>2</sub>) sürekli olarak geçirilmiştir ve buharlaşmadan kaynaklı kaybın önüne geçmek için geri soğutucu kullanılmıştır. Karışımın üzerine önce ÇDKNT ilave edilmiş (4:1 w/w), ardından da 80 °C sıcaklıkta pH 11-12 oluncaya kadar %25'lik NH<sub>4</sub>OH damla damla eklenmiştir. Reaksiyona 30 dakika boyunca mekanik karıştırma altında devam edilmiştir. Reaksiyon sona erdirildikten sonra karışım oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve distile saf su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen reaktanlar uzaklaştırılmıştır. Yıkama suyu pH'sı ile distile saf suyun pH'sı aynı oluncaya kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT'ler neodyum mıknatıs ile sulu fazdan ayrılarak ve 60 °C'lik etüvde kurutulmuş ve adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.



Adsorpsiyon çalışmaları 50 ml'lik çalışma hacminde 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik çözeltisi ve adsorbentten oluşan adsorpsiyon ortamının daha iyi bir süspansiyon karakteristiğine sahip olabilmesi için sabit hızda (120 rpm) ve sabit sıcaklıkta çalkalamalı bir su banyosu kullanılmıştır. Ortamda adsorplanmadan kalan SMZ miktarı spektrofotometrik (Shimadzu UV 1800) olarak belirlenmiştir. SMZ çözeltilerinin başlangıç pH'ları istenilen değerlere derişik ve seyreltik HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Herhangi bir andaki adsorplanan antibiyotik miktarı ve adsorpsiyon verimi sırasıyla aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Giderim, \%} = \left( \frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

Bu eşitlikte;  $C_0$ , başlangıç antibiyotik konsantrasyonunu (mg/L);  $C_t$ , herhangi bir t anındaki antibiyotik konsantrasyonunu (mg/L) göstermektedir.

Adsorpsiyon prosesinde etkin olan parametrelerin ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ÇDKNT konsantrasyonu, çözelti başlangıç pH'ı, antibiyotik konsantrasyonu ve temas süresi) SMZ antibiyotiğinin sulu çözeltilerden  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ÇDKNT ile giderimi üzerine etkileri 20 °C'deki çalkalamalı bir su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarım Merkezi Kompozit Dizayn (MKD)'a göre her bir parametrenin 5 farklı seviyesi kullanılarak 6 merkez nokta, 8 uç noktalar ve 16 faktöriyel tasarım noktaları olmak üzere toplam otuz deneyden oluşmaktadır. Bu değerler sırasıyla Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Belirlenen deneysel tasarım noktalarına göre gerçekleştirilen deneylerde cevap değişkeni olan SMZ antibiyotiğinin yüzde giderim değerleri takip edilmiştir. Gerçekleştirilen bütün deneyler 3 paralel olarak yapılmış ve elde edilen sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır. Modelleme çalışması, verilerin regrasyon ve grafiksel analizini oluşturmak için Design Expert 10 (Stat-Ease, Minneapolis) yazılımı kullanılmıştır.

**Tablo 1.** SMZ giderimi için bağımsız değişkenler, deneysel değerleri ve MKD için seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Kod	-2.0 (-□)	-1.0 (Düşük)	0.0 (Merkez)	+1.0 (Yüksek)	+2.0 (+□)
Başlangıç Çözelti pH'ı	A	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
Başlangıç SMZ Konsantrasyonu, mg/L	B	15	30	45	60	75
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ÇDKNT Konsantrasyonu, g/L	C	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Temas Süresi, dk	D	6	12	18	24	30

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Design Expert 10 yazılımını kullanarak gerçekleştirilen varyans analizi (ANOVA) sonucunda, parametrelerin lineer, kuadratik ve ikili etkileşimleri için etki değerleri belirlenmiştir. % 95 güven seviyesinde kuadratik model Prob>F değeri <0.0001 ile önemli bulunmuş ve Prob>F değerinin 0,05'den küçük olduğu A, B, C, D, AB, AC, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup> ve C<sup>2</sup> model terimlerinin SMZ antibiyotiğinin gideriminde etkin olduğu belirlenmiştir. SMZ antibiyotiğinin adsorpsiyonu için ANOVA analizi sonucunda önerilen model denklemi (kodlanmış faktörler cinsinde ve gerçek değerler cinsinden) A= Başlangıç çözelti pH'sı, B= SMZ Kons. (mg/L), C=  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ÇDKNT (g/L) ve D= Temas süresi (dk) olmak üzere aşağıda verilmiştir; Kodlanmış değerler cinsinden;

$$\text{SMZ Giderimi, \%} = 55.15 - 17.16 A - 6.80 B + 10.09 C + 1.23 D + 2.44 AB - 2.28 AC - 0.53 AD - 0.26 BC - 0.49 BD + 0.34 CD - 3.21 A^2 + 1.20 B^2 - 1.46 C^2 + 0.10 D^2$$

Modelin uyum derecesi çoklu korelasyon katsayısı, R<sup>2</sup>'nin değerine bakılarak belirlenir. Önerilen doğrusal modelin cevap değişkenindeki (SMZ Giderimi, %) değişimleri % 99.1 gibi yüksek bir oranda tanımlayabildiğini göstermektedir. Modelin açıklayıcılığının daha iyi tanımlandığı daha gerçekçi düzeltilmiş R<sup>2</sup><sub>adj</sub> terimi % 98.3 olarak belirlenmiş ve Tablo 3'de gösterilmiştir. Sinyal gürültü oranını temsil eden yeterli kesinlik (adequate precision) değerinin 4'ün üstünde olması beklenir. Yaptığımız çalışmada bulunan sinyal gürültü oranı 46.433 olarak belirlenmiştir. Tanımlayıcı istatistik verilere göre elde edilen modelin anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. P-değeri, katsayıların her bir bileşenin sonucu üzerine olan etkisini kontrol etmek için kullanılmaktadır. Bu katsayılar tarafından bağımsız değişkenler arasındaki etkileşim belirlenebilmekte ve düşük olasılık değerlerine sahip değişkenler modele katkıda bulunurken diğerleri modelden çıkarılabilmektedir. Lineer, kuadratik ve etkileşimleri terimlerin P-değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Dört bağımsız değişken için tasarlanan deneysel plan ve gözlenen giderim değerleri.

Deney No	(A) Başlangıç Çözelti pH'ı	(B) Başlangıç SMZ Kons., mg/L	(C) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ÇDKNT Kons., g/L	(D) Temas Süresi, dk	SMZ Giderimi, %	
					Deneyssel	Model
1	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	66.47	63.63
2	+1.0	-1.0	-1.0	-1.0	28.84	30.07
3	-1.0	+1.0	-1.0	-1.0	46.23	46.63
4	+1.0	+1.0	-1.0	-1.0	22.00	22.82
5	-1.0	-1.0	+1.0	-1.0	87.44	88.20
6	+1.0	-1.0	+1.0	-1.0	45.74	45.53
7	-1.0	+1.0	+1.0	-1.0	71.24	70.18
8	+1.0	+1.0	+1.0	-1.0	34.05	37.25
9	-1.0	-1.0	-1.0	+1.0	70.38	67.45
10	+1.0	-1.0	-1.0	+1.0	30.65	31.76
11	-1.0	+1.0	-1.0	+1.0	48.24	48.51
12	+1.0	+1.0	-1.0	+1.0	23.05	22.56
13	-1.0	-1.0	+1.0	+1.0	94.16	93.39
14	+1.0	-1.0	+1.0	+1.0	48.71	48.58
15	-1.0	+1.0	+1.0	+1.0	74.38	73.42
16	+1.0	+1.0	+1.0	+1.0	35.47	38.36
17	-2.0	0.0	0.0	0.0	72.88	76.60
18	+2.0	0.0	0.0	0.0	12.03	7.98
19	0.0	-2.0	0.0	0.0	71.49	73.54
20	0.0	+2.0	0.0	0.0	48.70	46.32
21	0.0	0.0	-2.0	0.0	27.73	29.11
22	0.0	0.0	+2.0	0.0	71.19	69.48
23	0.0	0.0	0.0	-2.0	54.09	53.10
24	0.0	0.0	0.0	+2.0	57.37	58.03
25	0.0	0.0	0.0	0.0	54.10	55.15
26	0.0	0.0	0.0	0.0	57.28	55.15
27	0.0	0.0	0.0	0.0	56.47	55.15
28	0.0	0.0	0.0	0.0	55.77	55.15
29	0.0	0.0	0.0	0.0	53.17	55.15
30	0.0	0.0	0.0	0.0	54.12	55.15

Deneyssel olarak elde edilen SMZ giderim (%) değerleri ile Design Expert 10 yazılımı ile elde edilen teorik SMZ giderim (%) değerleri arasındaki ilişki Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'den görüldüğü gibi deneyssel olarak elde edilen giderim değerlerinin, oluşturulan model tarafından elde edilen teorik giderim değerleri ile uyumlu olduğu ve model tarafından açıklanabileceği net olarak görülmektedir.

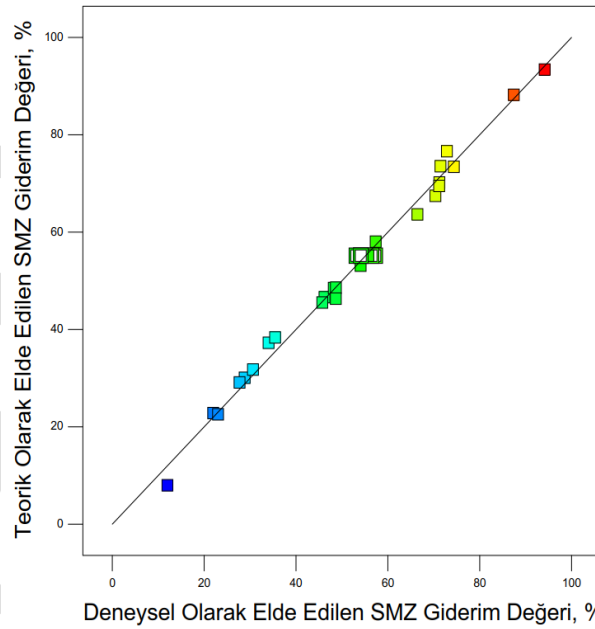
Cevap değişkeni olan giderim yüzdesi üzerine etkisi incelenen etkin parametrelerin (başlangıç çözelti pH'sı, SMZ konsantrasyonu, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT konsantrasyonu ve temas süresi) tekli etkileri Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'den başlangıç çözelti pH'sının, SMZ konsantrasyonunun ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT konsantrasyonunun artan düzeylerindeki etkilerinin kuadratik olduğu net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, Şekil 2'de temas süresinin artışına paralel olarak giderim yüzdesinin arttığı ve bu parametrenin etkisinin lineer olduğu görülmektedir.

A, B, C, D, AB, AC, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup> ve C<sup>2</sup> model terimlerinin SMZ antibiyotiklerinin Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile gideriminde etkin olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT konsantrasyonu, pH, SMZ konsantrasyonu ve süre parametrelerinin SMZ giderimini önemli ölçüde etkilediği görülmektedir. Değişkenlerin birbirinden etkilendiği ortamlarda ortam optimizasyonu incelenirken bileşenlerin birbirleriyle olan etkileşimlerini belirlemek önemlidir. CYY değişkenler arasında bu etkileşim tabakalı grafikler ve 3 boyutlu grafikler kullanılarak kolaylıkla belirlenebilmektedir. Tabakalı grafikler optimum sınırları gösteren yapıdadır. Çalışmada düşünülen sınırların ötesine uzanan gerçek optimum noktalar ulaşabilir. Üç boyutlu cevap-yüzey grafikleri Şekil 3'de gösterilmektedir.

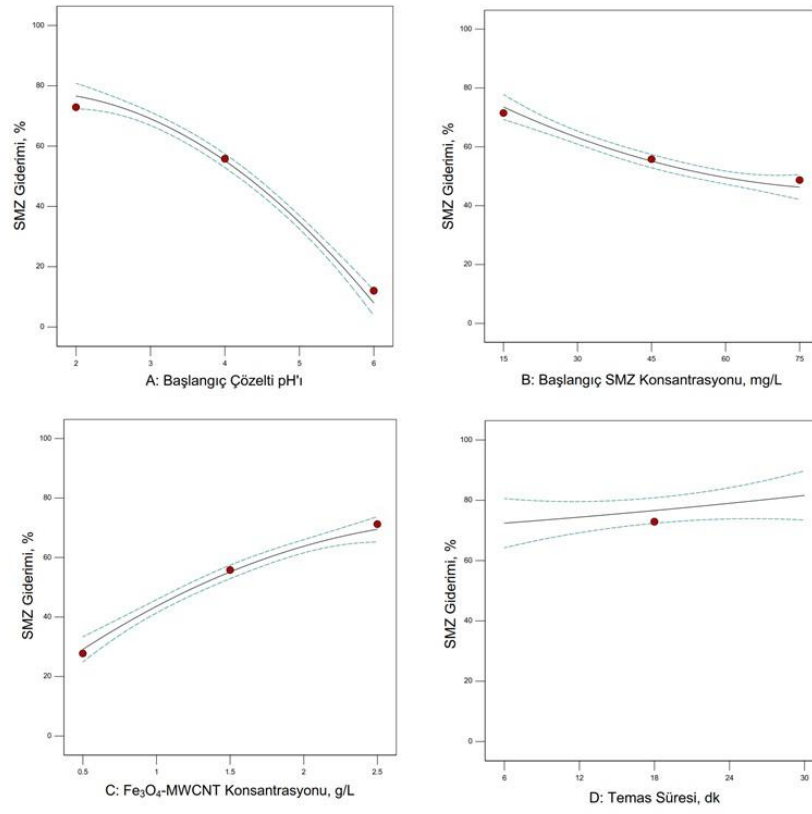
**Tablo 3.** SMZ gideriminin yanıt yüzeyinde ikinci dereceden model ve regresyon katsayıları için varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Kareler Toplamı	DF	Ortalama kare	F-value	Prob > F
Model	11254.5	14	803.9	118.79	< 0.0001
A-Başlangıç Çözelti pH'ı	7063.4	1	7063.4	1043.77	< 0.0001

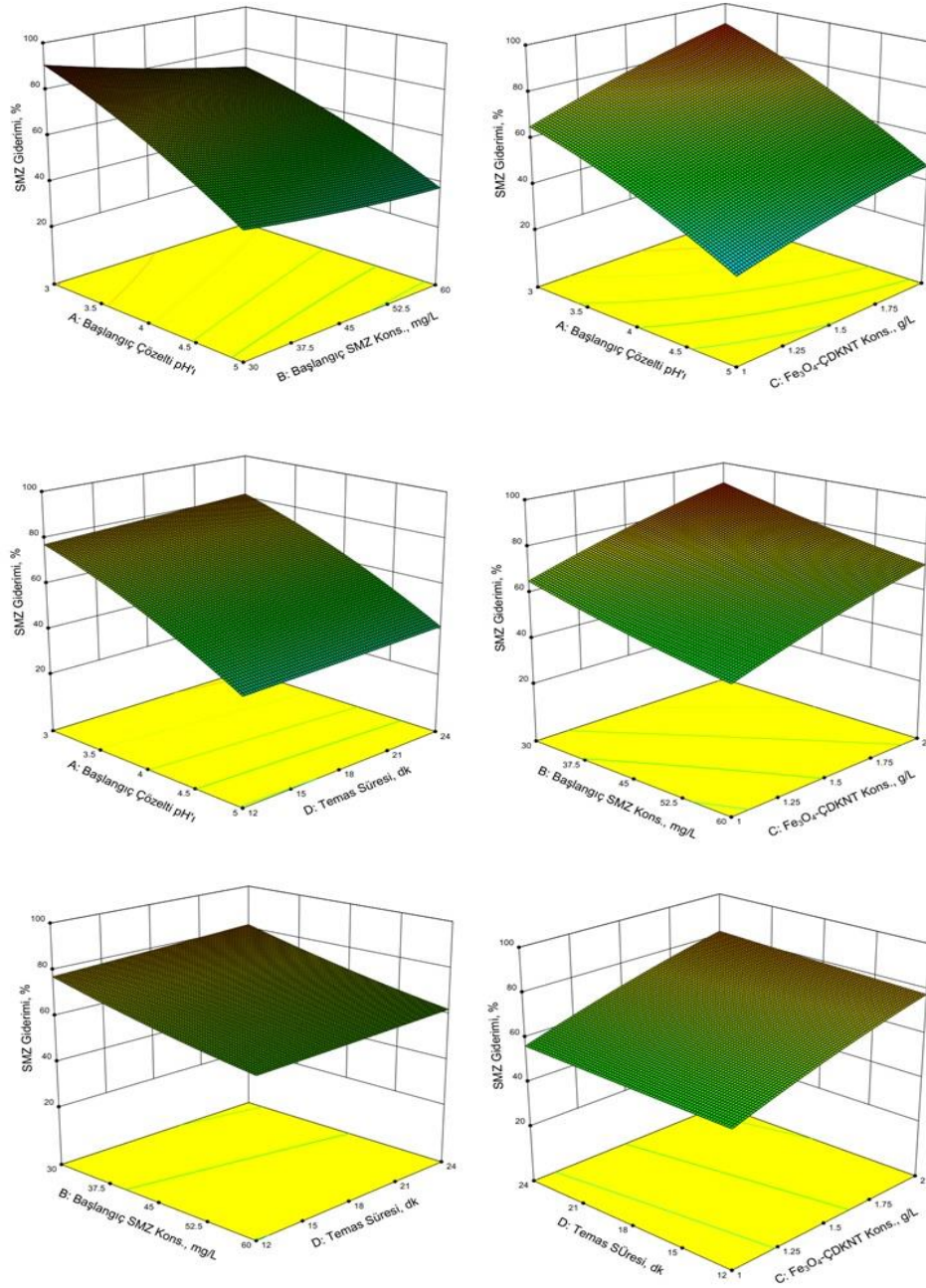
B-Başlangıç SMZ Kons.	1111.2	1	1111.2	164.21	< 0.0001
C-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ÇDKNT Kons.	2445.2	1	2445.2	361.33	< 0.0001
D-Temas Süresi	36.48	1	36.48	5.39	0.0347
AB	95.01	1	95.01	14.04	0.0019
AC	83.13	1	83.13	12.28	0.0032
AD	4.55	1	4.55	0.67	0.4252
BC	1.05	1	1.05	0.15	0.6998
BD	3.79	1	3.79	0.56	0.4657
CD	1.87	1	1.87	0.28	0.6068
A <sup>2</sup>	283.49	1	283.49	41.89	< 0.0001
B <sup>2</sup>	39.18	1	39.18	5.79	0.0295
C <sup>2</sup>	58.76	1	58.76	8.68	0.0100
D <sup>2</sup>	0.30	1	0.30	0.044	0.8372
Residual	101.51	15	6.77		
Lack of fit	88.76	10	8.88	3.48	0.0905
Pure error	12.75	5	2.55		
Cor total	11356	29			
Mean	52.45				
R <sup>2</sup>	0.991				
R <sup>2</sup> <sub>Adj</sub>	0.983				
R <sup>2</sup> <sub>Pre</sub>	0.953				
Std. Dev.	2.60				
C.V. %	4.96				
PRESS	529.62				
Adequate precision	46.433				



Şekil 1. Deneysel olarak elde edilen SMZ giderim (%) değerlerine karşı teorik olarak elde edilen SMZ giderim (%) değerleri grafiği.



**Şekil 2.** Cevap değişkeni olan giderim yüzdesi (Giderim, %) üzerine etkisi incelenen etkin parametrelerin tekli etkilerinin gösterimi.



Şekil 3. Üç boyutlu cevap yüzey grafikleri.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MF.18.55 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Bayazit SS, Kerkez O, 2014. Hexavalent chromium adsorption on superparamagnetic multi-wall carbon nanotubes and activated carbon composites. *Chemical Engineering Research & Design*, 92: 2725-2733.
- de Sousa DNR, Insa S, Mozeto AA, Petrovic M, Chaves TF, Fadini PS, 2018. Equilibrium and kinetic studies of the adsorption of antibiotics from aqueous solutions onto powdered zeolites. *Chemosphere*, 205: 137-146.
- Dehghani MH, Faraji M, Mohammadi A, Kamani H, 2017. Optimization of fluoride adsorption onto natural and modified pumice using response surface methodology: Isotherm, kinetic and thermodynamic studies. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34: 454-462.
- Ghorbani F, Kamari S, 2017. Application of response surface methodology for optimization of methyl orange adsorption by Fe-grafting sugar beet bagasse. *Adsorption Science & Technology*, 35: 317-338.

- Jang HM, Yoo S, Choi YK, Park S, Kan E, 2018. Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of tetracycline on Pinus taeda-derived activated biochar. *Bioresource Technology*, 259: 24-31.
- Lan YK, Chen TC, Tsai HJ, Wu HC, Lin JH, Lin IK, Lee JF, Chen CS, 2016. Adsorption Behavior and Mechanism of Antibiotic Sulfamethoxazole on Carboxylic-Functionalized Carbon Nanofibers-Encapsulated Ni Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, 32: 9530-9539.
- Qiao HT, Liu Y, Dong YH, Li SR, Wang P, Jin T, 2015. Adsorption of sulfamonomethoxine antibiotics to cucurbit[6]uril polymer: kinetics and thermodynamic studies. *Desalination and Water Treatment*, 54: 113-121.
- Selen V, Guler O, Ozer D, Evin E, 2016. Synthesized multi-walled carbon nanotubes as a potential adsorbent for the removal of methylene blue dye: kinetics, isotherms, and thermodynamics. *Desalination and Water Treatment*, 57: 8826-8838.
- Song QQ, Fang Y, Liu ZY, Li LL, Wang YR, Liang JL, Huang Y, Lin J, Hu L, Zhang J, Tang CC, 2017. The performance of porous hexagonal BN in high adsorption capacity towards antibiotics pollutants from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 325: 71-79.
- Soran ML, Opris O, Lung I, Kacso I, Porav AS, Stan M, 2017. The efficiency of the multi-walled carbon nanotubes used for antibiotics removal from wastewaters generated by animal farms. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 16396-16406.
- Tabassi D, Harbi S, Louati I, Hamrouni B, 2017. Response surface methodology for optimization of phenol adsorption by activated carbon: Isotherm and kinetics study. *Indian Journal of Chemical Technology*, 24: 239-255.
- Zhao H, Liu X, Cao Z, Zhan Y, Shi XD, Yang Y, Zhou JL, Xu J, 2016. Adsorption behavior and mechanism of chloramphenicols, sulfonamides, and non-antibiotic pharmaceuticals on multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, 310: 235-245.

## Sulu Çözeltilerden Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT üzerine Sülfametoksazol Adsorpsiyonu: Kinetik, İzoterm ve Termodinamik Çalışma

Özlem ERDAL<sup>1\*</sup>, Veyis SELEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ozlemerdal6@gmail.com

### Özet

Adsorpsiyon, kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın kullanılır ve nispeten düşük maliyetlidir. Ek olarak, adsorpsiyonun sulu çözeltilerden antibiyotik giderimi için daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Adsorpsiyon için kullanılan adsorbanlar düşük maliyetli, kolay ulaşılabilir, yenilenebilir ve düşük toksisite olmalıdır. Bu çalışmada, manyetik çok duvarlı karbon nanotüpler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT'ler) kimyasal buhar biriktirme yöntemiyle sentezlenmiş ve sülfametoksazolün (SMZ) sulu çözeltilerden gideriminde kullanılmıştır. Adsorpsiyon çalışmaları 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. 50 ml SMZ çözeltisi ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT içeren erlen bir su banyosuna yerleştirilmiş ve 60 dakika 120 rpm'de karıştırılmıştır. 0 ila 60 dakika arasında değişen temas sürelerinde sıcaklığın (293, 303, 313 ve 323 K) etkisini belirlemek için deneyler yapılmıştır. Zaman akışından farklı sıcaklıklarda elde edilen deneysel veriler, sözde I. mertebe ve sözde II. mertebe adsorpsiyon kinetik modeller kullanılarak analiz edilmiştir. Deneysel veriler, sözde II. mertebeden kinetik modele uymuştur. 20 ile 80 mg/L arasında değişen başlangıç SMZ konsantrasyonlarını içeren sulu çözeltiler, çeşitli sabit sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 °C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT'lerle temas ettirilmiş ve izoterm çalışmaları için kullanılan denge verileri elde edilmiştir. Denge periyodunun sonunda süspansiyonlar, neodyum bir mıknatıs yardımıyla ayrılmıştır ve SMZ konsantrasyonları, 267 nm'de bir UV-vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. Denge adsorpsiyon verileri Langmuir, Freundlich ve Redlich-Peterson izoterm modelleri kullanılarak analiz edilmiş ve adsorpsiyon prosesi için termodinamik parametreler ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) belirlenmiştir. Adsorpsiyon prosesinin termodinamik parametreleri de değerlendirilmiştir.  $\Delta H^\circ$ 'nin negatif değeri, adsorpsiyon işleminin ekzotermik olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Adsorpsiyon, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT'ler, Sülfametoksazol (SMZ), Termodinamik Parametreler.

### Adsorption of Sulfamethoxazole onto Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs from Aqueous Solution: Kinetics, Isotherm and Thermodynamic Study

#### Abstract

Adsorption is the most widely used because of the ease of operation and it is comparatively low cost. In addition, adsorption has been proven to be more effective for the treatment of antibiotics from aqueous solutions. The adsorbents that are used for adsorption must be low cost, easily available, renewable and low toxicity. In this study, magnetic multi-walled carbon nanotubes (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs) were synthesized chemical precipitation method and they were used to removal of sulfamethoxazole (SMZ) from aqueous solutions. Adsorption studies were conducted in 250 mL flasks. The flask, which contained the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs and 50 mL of the SMZ solution, was placed in a water bath and mixed at 120 rpm for 60 min. The experiments were performed to determine the effect of temperature (293, 303, 313 and 323 K) for contact periods ranging from 0 to 60 min. The experimental data which were obtained from time course at different temperature were analyzed by using pseudo-first order and pseudo-second order adsorption kinetic models. The experimental data fit the pseudo-second order kinetic model. The aqueous solutions containing initial SMZ concentrations changing from 20 to 80 mg/L were contacted with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs at the various constant temperatures (20, 30, 40 and 50 °C) and to obtained equilibrium data used for the isotherm studies. At the end of equilibrium period, suspensions were separated by a neodyum magnet, and the SMZ concentration was determined with a UV-vis spectrophotometer at 267 nm. The equilibrium adsorption data were analyzed using the Langmuir, Freundlich and Redlich-Peterson Isotherm models and determined the thermodynamic parameters ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) for the adsorption process. The thermodynamic parameters of the adsorption process also were evaluated. The negative value of  $\Delta H^\circ$  indicated that the adsorption process was exothermic.

**Keywords:** Adsorption, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MWCNTs, Kinetics, Sulfamethoxazole (SMZ), Thermodynamic Parameters.

### GİRİŞ

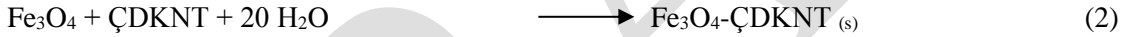
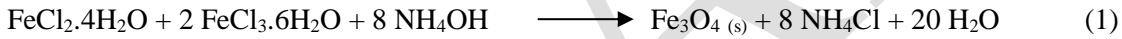
Antibiyotikler insan sağlığı için tıpta, hayvan sağlığı için veterinerlikte ve ayrıca koruma amaçlı olarak tarımda oldukça yaygın olarak kullanılan kimyasalların başında gelmektedir. Kullanım sonucunda antibiyotiklerin büyük bir kısmı metabolize olmadan idrar ve dışkı yoluyla atılmaktadır ve antibiyotik içeren

atıklar fazla dikkat edilmeden alıcı ortamlara deşarj edilmektedirler. Antibiyotikler alıcı ortamlarda bir miktar bozulmaya uğrasalar da yer altı ve yer üstü suları yoluyla içme sularına kadar ulaşır birikerek patojen mikroorganizmaların direnç kazanmasına ve/ veya atık su arıtımında etkin olan mikroorganizmaların ölümlerine ya da aktivitelerinde azalmalara neden olmaktadır. Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi ve bu antibiyotiklerin hastalıkların tedavisinde cevap verememesi antibiyotiklerle ilgili en önemli problemlerden birisidir. Antibiyotiklerin gerek atık sularından ve gerekse kirlenmiş çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılmasında birçok metot kullanılmaktadır. Antibiyotik içeren atık suların arıtımında yaygın olarak kullanılan yöntemler üç ana grup altında toplanabilir. Bunlar; fiziksel (Jang vd., 2018), kimyasal (Frontistis vd., 2018) ve biyolojik (Miran vd., 2018) arıtım yöntemleridir. Antibiyotik içeren atık su arıtım yöntemleri arasında yer alan adsorpsiyon, yüksek giderim verimi, proses işletim kolaylığı ve proses işletim maliyetinin düşüklüğü ile bu yöntemler içerisinde bir adım öne çıkmaktadır. Atık sularındaki antibiyotikler gibi organik kirleticilerin uzaklaştırılmasında uygun adsorbentlerin kullanılması adsorpsiyon prosesinin etkin olarak uygulanabilirliği için önemlidir. Adsorpsiyon ile sulu çözeltilerden antibiyotik giderimi konusunda yapılan çalışmalarda, aktif karbon (Moral-Rodriguez vd., 2016), nano tabakalı grafen oksit (Rostamian ve Behnejad, 2018), fonksiyonize edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (Xiong vd., 2018), zeolit (de Sousa vd., 2018), manyetik nanopartikül (Danalioglu vd., 2017) gibi birçok katı materyalin adsorbent olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Bu adsorbentlerin antibiyotik gideriminde iyi birer adsorplayıcı oldukları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada, Sülfametoksazol (SMZ) antibiyotiğinin manyetik karakter kazandırılan çok duvarlı karbon nanotüpler (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT) ile sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında, kinetik ve termodinamik parametreler ile adsorpsiyon izotermi incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

ÇDKNT'ler kimyasal buhar biriktirme yöntemi kullanılarak daha önceki bir çalışmamızda sentezlenmiştir (Selen vd., 2016). ÇDKNT'ler manyetik karakter kazandırmak ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT yapısının sentezlenmesi için Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> aşağıda verilen reaksiyon denklemlerine göre; demir (II) klorür (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O), demir (III) klorür (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) ve amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) kullanılmıştır (Bayazit ve Kerkez, 2014).



Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT sentezi, 80 °C sıcaklıkta sabit tutulan bir su banyosu (Nükleon NSB-12) içerisine 500 ml'lik üç boyunlu cam bir balonda gerçekleştirilmiştir. Balon içerisine koyulan 200 ml distile saf su içerisinde molar oranlarda FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ve FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1:2) eklenerek mekanik karıştırıcı vasıtasıyla şiddetli karıştırma (Daihan HS-120A) yapılmış ve demir klorürlerin çözünmesi sağlanmıştır. İnert atmosfer ortamının sağlanması için balon içerisindeki karışımdan azot gazı (N<sub>2</sub>) sürekli olarak geçirilmiştir ve buharlaşmadan kaynaklı kaybin önüne geçmek için geri soğutucu kullanılmıştır. Karışımın üzerine önce ÇDKNT ilave edilmiş (4:1 w/w), ardından da 80 °C sıcaklıkta pH 11-12 oluncaya kadar %25'lik NH<sub>4</sub>OH damla damla eklenmiştir. Reaksiyona 30 dakika boyunca mekanik karıştırma altında devam edilmiştir. Reaksiyon sona erdirildikten sonra karışım oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve distile saf su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen reaktanlar uzaklaştırılmıştır. Yıkama suyu pH'sı ile distile saf suyun pH'sı aynı oluncaya kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT'ler neodyum mıknatıs ile sulu fazdan ayrılarak ve 60 °C'lik etüvde kurutulmuş ve adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

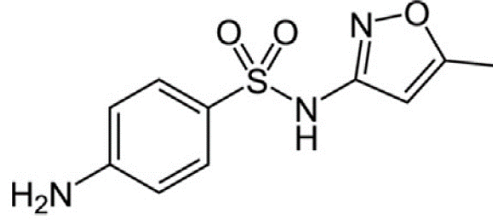
Adsorpsiyon çalışmaları 50 ml'lik çalışma hacminde 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik çözeltisi ve adsorbentten oluşan adsorpsiyon ortamının daha iyi bir süspansiyon karakteristiğine sahip olabilmesi için sabit hızda (120 rpm) ve sabit sıcaklıkta çalkalamalı bir su banyosu kullanılmıştır. Ortamda adsorplanmadan kalan SMZ antibiyotiğinin (Şekil 1) miktarı spektrofotometrik (Shimadzu UV 1800) olarak 267 nm'de belirlenmiştir. SMZ çözeltilerinin başlangıç pH'ları istenilen değerlere derişik ve seyreltik HCl ve NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Herhangi bir andaki adsorplanan antibiyotik miktarı ve adsorpsiyon verimi sırasıyla aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{M} \quad (3)$$

$$\text{Giderim, \%} = \left( \frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (4)$$



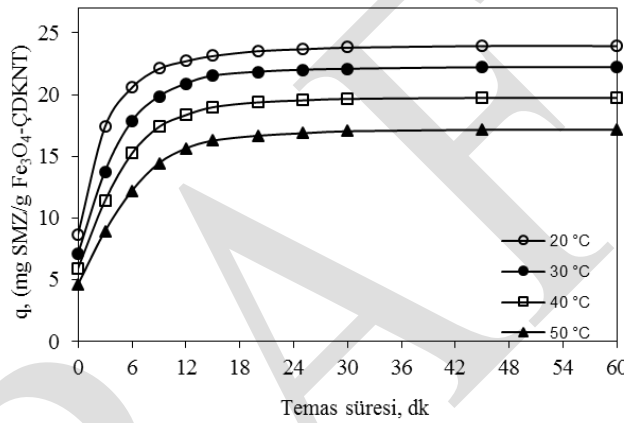
Bu eşitliklerde;  $q_t$ ,  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT birim kütlesi başına uzaklaştırılan antibiyotik miktarını (mg/g);  $C_0$ , başlangıç antibiyotik konsantrasyonunu (mg/L);  $C_t$ , herhangi bir t anındaki antibiyotik konsantrasyonunu (mg/L); V, çözelti hacmini (L) ve M, kullanılan  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT kütlesini (g) göstermektedir.



Şekil 1. Sülfametoksazol (SMZ) antibiyotiğinin molekül yapısı (Wu vd., 2016).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

SMZ'nin sulu çözeltilerden  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT ile giderimi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla başlangıç pH'ı 3.0 olan 40 mg/L konsantrasyonundaki SMZ çözeltileri ile 1.0 g/L konsantrasyonundaki  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT farklı sabit sıcaklıklarda (20, 30, 40 ve 50 °C) süreye bağlı olarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2.  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT ile SMZ antibiyotiğinin adsorpsiyonuna sıcaklığın etkisi (Şartlar: 50 ml 40 mg/L SMZ çözeltisi, 1.0 g/L  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT,  $pH_b=3.0$ ).

Şekil 2'den de görüldüğü gibi sıcaklık artışıyla birlikte adsorplanan antibiyotik miktarı azalmaktadır. Sıcaklığın 20 °C'den 50 °C'ye çıkarılmasıyla adsorplanan SMZ miktarı 23.98 mg/g  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT değerinden 17.17 mg/g  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT değerine düşmüştür.

Adsorpsiyon prosesinin mekanizması çeşitli kinetik modeller (sözde I. mertebe ve sözde II. mertebe) kullanılarak tanımlanabilir. Farklı sabit sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50 °C) süreye bağlı olarak elde edilen adsorpsiyon verileri sözde I. mertebeden ve sözde II. mertebeden kinetik modellere uygulanmıştır. Sözde I. mertebeden kinetik model (Lagergren, 1898) (5) nolu eşitlik ile gösterilmiştir;

$$\frac{dq_t}{dt} = k_{1,ad} (q_e - q_t) \quad (5)$$

Bu eşitlik  $t=0$  da  $q_t=0$  için integre edilirse (6) nolu eşitlik elde edilir.

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_{1,ad} t}{2.303} \quad (6)$$

Sözde II. dereceden kinetik model (Ho ve McKay, 1999) (7) nolu eşitlik ile gösterilmiştir;

$$\frac{dq_t}{dt} = k_{2,ad} (q_e - q_t)^2 \quad (7)$$

Bu eşitlikte  $t=0$  da  $q_t=0$  için integre edilirse (8) nolu eşitlik elde edilir.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_{2,ad} q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (8)$$

Burada,  $k_{1,ad}$  sözde I. mertebeden hız sabitini ( $dk^{-1}$ ),  $k_{2,ad}$  sözde II. mertebeden hız sabitini ( $g/mg dk$ ),  $t$  temas süresini ( $dk$ ),  $q_e$  ve  $q_t$  ise dengedeki ve herhangi bir andaki birim kütle başına adsorplanan SMZ miktarını ( $mg/g$ ) ifade etmektedir.

Doğrusallaştırılmış sözde I. mertebeden kinetik modele göre  $\log(q_e - q_t)$ ,  $t$ 'ye karşı, doğrusallaştırılmış sözde II. mertebeden kinetik modele göre  $t/q_t$ ,  $t$ 'ye karşı grafiğe geçirildiğinde (şekiller sunulmamıştır) elde edilen kinetik model sabitleri sırasıyla Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'den de görüldüğü gibi  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT ile SMZ antibiyotiğinin adsorpsiyon prosesinin sözde II. mertebeden kinetik modele daha iyi uyduğu hem denklemlere ilişkin regresyon katsayılarından hem de deneysel ve teorik olarak hesaplanan denge verilerinin karşılaştırılmasından görülmektedir.

**Tablo 1.**  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ait sözde I. mertebeden ve sözde II. mertebeden kinetik model sabitleri.

Sıcaklık (°C)	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )	Sözde I. Dereceden Kinetik Model			Sözde II. Dereceden Kinetik Model			$E_A$ (kJ/mol)
		$q_{e,h}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$k_{1,ad}$ (dk <sup>-1</sup> )	$R^2$	$q_{e,h}$ (mg g <sup>-1</sup> )	$k_{2,ad}$ (g mg <sup>-1</sup> dk <sup>-1</sup> )	$R^2$	
20	23.98	13.35	0.2096	0.984	24.33	0.0554	0.999	11.91
30	22.20	15.17	0.2050	0.999	22.68	0.0430	0.999	
40	19.76	14.30	0.1948	0.998	20.28	0.0401	0.998	
50	17.16	13.44	0.1778	0.995	17.73	0.0343	0.997	

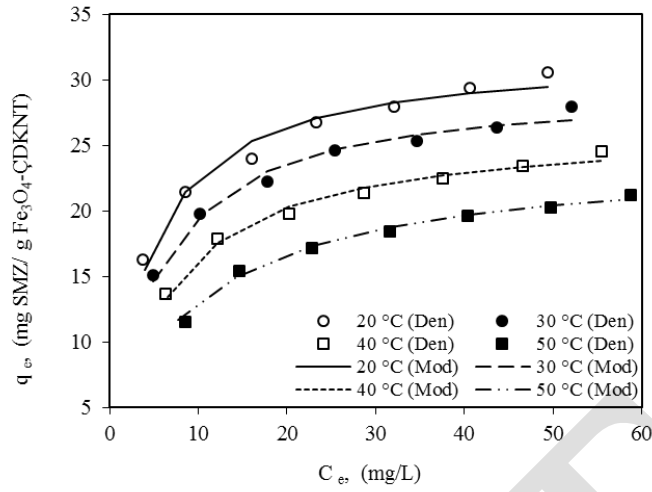
İzoterm çalışmaları, başlangıç konsantrasyonu 20 ile 80 mg/L arasında değişen SMZ çözeltileri ile 1.0 g/L dozundaki  $Fe_3O_4$ -ÇDKNT 20, 30, 40 ve 50 °C sabit sıcaklıklarda dengeye ulaşınca kadar (60 dk) temas ettirilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde elde edilen denge verileri, sırasıyla eşitlik (9), (10) ve (11)'de gösterilen doğrusal olmayan formdaki Langmuir, Freundlich ve Redlich-Peterson izotermine uygulanarak adsorpsiyon prosesine ait izoterm sabitleri hesaplanmıştır.

$$q_e = \frac{q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (9)$$

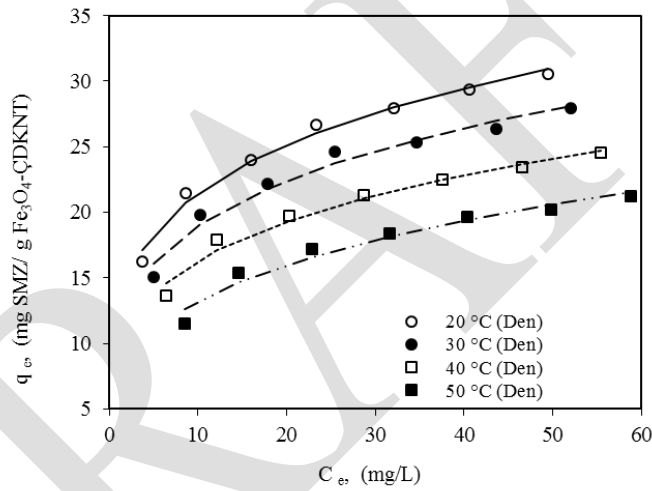
$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (10)$$

$$q_e = \frac{K_{RP} C_e}{1 + \alpha C_e^\beta} \quad (11)$$

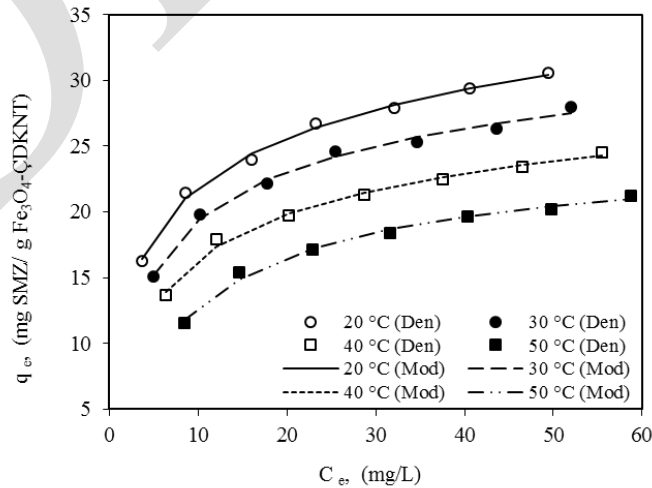
Bu eşitliklerde yer alan sabitlerden  $q_{max}$  maksimum adsorpsiyon kapasitesini ( $mg/g$ ),  $K_L$  ise adsorpsiyon dengesi ile ilgili Langmuir izoterm sabitini ( $L/mg$ ) gösterirken,  $K_f$  ve  $n$  Freundlich izoterm sabitlerini,  $K_{RP}$ ,  $\alpha$  ve  $\beta$  Redlich-Peterson izoterm sabitlerini göstermektedir. İzoterm eşitliklerinin çözümleri Polymath 6.1 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir sıcaklık değerinde (20, 30, 40 ve 50 °C) Langmuir, Freundlich ve Redlich-Peterson adsorpsiyon izotermine ait izoterm grafikleri ve sabitleri sırasıyla Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5 ve Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4'te verilmiştir.



Şekil 3. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ilişkin Langmuir izotermi.



Şekil 4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ilişkin Freundlich izotermi.



Şekil 4. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ilişkin Redlich-Peterson izotermi.

**Tablo 2.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ait Langmuir izoterm denklemi ve sabitleri.

İzoterm Sıcaklığı (°C)	Langmuir İzoterm Sabitleri		
	R <sup>2</sup>	q <sub>max</sub> (mg/g)	K <sub>L</sub> (L/mg)
20	0.973	31.99	0.238
30	0.982	29.57	0.197
40	0.985	26.45	0.163
50	0.992	24.03	0.112

**Tablo 3.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ait Freundlich izoterm denklemi ve sabitleri.

İzoterm Sıcaklığı (°C)	Freundlich İzoterm Sabitleri		
	R <sup>2</sup>	K <sub>f</sub> (mg/g)	n
20	0.988	12.70	4.385
30	0.975	11.05	4.234
40	0.978	9.322	4.114
50	0.964	6.993	3.620

**Tablo 4.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyonuna ait Redlich-Peterson izoterm denklemi ve sabitleri.

İzoterm Sıcaklığı (°C)	Redlich-Peterson İzoterm Sabitleri			
	R <sup>2</sup>	K <sub>RP</sub>	□	□
20	0.997	18.97	1.084	0.850
30	0.993	9.414	0.496	0.891
40	0.994	6.772	0.402	0.892
50	0.992	2.950	0.142	0.967

Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4'te sunulan regresyon katsayılarından (R<sup>2</sup>) görüldüğü gibi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT ile SMZ'nin adsorpsiyon prosesinin Langmuir izotermine daha iyi uyduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (de Sousa vd., 2018).

Çalışılan sıcaklık aralığında hesaplanan prosesin entalpi (ΔH) değeri -19.15 kJ/mol olarak bulunmuştur. Entalpi değişiminin negatif oluşu adsorpsiyon prosesinin ekzotermik olduğunu göstermiştir. Çalışılan tüm sıcaklıklarda serbest enerji değişiminin (ΔG<sup>o</sup>) negatif işaretli olması (-26.81, -27.25, -27.66, -27.54) prosesin söz konusu sıcaklıklarda kendiliğinden gerçekleşeceğini göstermektedir. Çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde pozitif olan ΔS<sup>o</sup> değerleri (0.0261, 0.0267, 0.0272, 0.0260) ise Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ÇDKNT yüzeyine çözelti ortamındaki SMZ moleküllerinin rastgele adsorplandıklarının bir göstergesi (Dizge vd., 2008) ve adsorbentin SMZ moleküllerine olan affinitesinin bir sonucu olarak ifade edilmiştir (Mittal, 2006).

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MF.18.55 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Bayazit SS, Kerkez O, 2014. Hexavalent chromium adsorption on superparamagnetic multi-wall carbon nanotubes and activated carbon composites. *Chemical Engineering Research & Design*, 92: 2725-2733.
- Danalioglu ST, Bayazit SS, Kerkez O, Alhogbi BG, Salam MA, 2017. Removal of ciprofloxacin from aqueous solution using humic acid- and levulinic acid- coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Chemical Engineering Research & Design*, 123: 259-267.
- de Sousa DNR, Insa S, Mozeto AA, Petrovic M, Chaves TF, Fadini PS, 2018. Equilibrium and kinetic studies of the adsorption of antibiotics from aqueous solutions onto powdered zeolites. *Chemosphere*, 205: 137-146.
- Dizge N, Aydinler C, Demirbas E, Kobya M, Kara S, 2008. Adsorption of reactive dyes from aqueous solutions by fly ash: Kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*, 150: 737-746.
- Frontistis Z, Mantzavinos D, Meric S, 2018. Degradation of antibiotic ampicillin on boron-doped diamond anode using the combined electrochemical oxidation - Sodium persulfate process. *Journal of Environmental Management*, 223: 878-887.

- Ho YS, McKay G, 1999. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 34: 451-465.
- Jang HM, Yoo S, Choi YK, Park S, Kan E, 2018. Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of tetracycline on Pinus taeda-derived activated biochar. *Bioresource Technology*, 259: 24-31.
- Lagergren S, 1898. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 24: 1-39.
- Miran W, Jang J, Nawaz M, Shahzad A, Lee DS, 2018. Biodegradation of the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole by sulfamethoxazole acclimatized cultures in microbial fuel cells. *Science of the Total Environment*, 627: 1058-1065.
- Mittal A, 2006. Use of hen feathers as potential adsorbent for the removal of a hazardous dye, Brilliant Blue FCF, from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 128: 233-239.
- Moral-Rodriguez AI, Leyva-Ramos R, Ocampo-Perez R, Mendoza-Barron J, Serratos-Alvarez IN, Salazar-Rabago JJ, 2016. Removal of ronidazole and sulfamethoxazole from water solutions by adsorption on granular activated carbon: equilibrium and intraparticle diffusion mechanisms. *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society*, 22: 89-103.
- Rostamian R, Behnejad H, 2018. A comprehensive adsorption study and modeling of antibiotics as a pharmaceutical waste by graphene oxide nanosheets. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 117-123.
- Selen V, Guler O, Ozer D, Evin E, 2016. Synthesized multi-walled carbon nanotubes as a potential adsorbent for the removal of methylene blue dye: kinetics, isotherms, and thermodynamics. *Desalination and Water Treatment*, 57: 8826-8838.
- Wu YX, Xi BD, Hu GJ, Wang DH, Li AM, Zhang WH, Lu L, Ding HJ, 2016. Adsorption of tetracycline and sulfonamide antibiotics on amorphous nano-carbon. *Desalination and Water Treatment*, 57: 22682-22694.
- Xiong WP, Zeng GM, Yang ZH, Zhou YY, Zhang C, Cheng M, Liu Y, Hu L, Wan J, Zhou CY, Xu R, Li X, 2018. Adsorption of tetracycline antibiotics from aqueous solutions on nanocomposite multi-walled carbon nanotube functionalized MIL-53 (Fe) as new adsorbent. *Science of the Total Environment*, 627: 235-244.

## Catalytic properties of Co-B / $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for hydrogen generation by hydrolysis of NaBH<sub>4</sub>

Seda Hoşgün<sup>1\*</sup>, Mine Özdemir<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ESOGU, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Chemical Engineering, Eskisehir, Turkey.

<sup>2</sup>ESOGU, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Chemical Engineering, Eskisehir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: serol@ogu.edu.tr

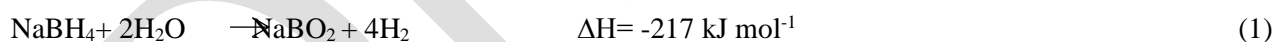
### Abstract

The supported cobalt-boride catalyst was synthesized for the hydrogen generation by hydrolysis of sodium borohydride. Impregnation and chemical reduction method was used to prepare the catalyst and  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was used as a catalyst support material. The catalyst was characterized by XRF, FTIR and XPS analysis. Its catalytic activity was investigated. The influences of catalyst amount, NaBH<sub>4</sub> concentration, NaOH concentration and reaction temperature on to hydrolysis reaction of NaBH<sub>4</sub> were studied. Furthermore, the reusability of Co-B/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst and the kinetics of hydrolysis reaction of NaBH<sub>4</sub> were also investigated. The activation energy of reaction was calculated as 57.09 kJ mol<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Hydrogen generation, Co-B/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Catalyst, NaBH<sub>4</sub>, Catalytic hydrolysis.

### INTRODUCTION

Energy storage is nowadays recognised as a key element in modern energy supply chain. This is mainly because it can enhanced grid stability, increase penetration of renewable energy resources, improve the efficiency of energy systems, conserve fossil energy resources and reduce environmental impact of energy generation (Aneke and Wang, 2016). Hydrogen is considered to be a promising next-generation energy source due to its high heat value and possible generation from renewable sources (Aydin et al., 2016). Hydrogen storage and conversion are essential for the hydrogen economy. Hydrogen can be stored traditionally in pressurized tanks, by adsorption on high surface area, nanostructured materials (activated carbon, carbon nanotubes etc.) and hydrogen storing alloys, but all of these methods have some drawbacks such as low volumetric and gravimetric storage, high energy consumption, and unsafety considerations (Yuan et al., 2012). Chemical hydrides (NaBH<sub>4</sub>, NaH, LiH, NaAlH<sub>4</sub>, etc.) are promising candidates for pure hydrogen production and stored at room temperature. Among them, sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) is the most advantages hydride due to its high hydrogen content (%10.8 wt.), non-flammability, non-toxicity and stability in alkaline solution (Amendola et al., 2000). The hydrolysis reaction of NaBH<sub>4</sub> was shown in Eqs. (1):



The alkaline NaBH<sub>4</sub> solution can hydrolyzed in the presence of suitable catalyst. Many studies have been on to improve catalytic systems for NaBH<sub>4</sub> hydrolysis. Catalysts containing noble metals (Pt, Rh, Ru) have shown the best performance in hydrolysis process of NaBH<sub>4</sub> (Özkar and Zahmakıran, 2005). But high cost of noble metals limited the applications of these catalysts. Some alloys and metals, such as nickel and cobalt are expected to be cheaper alternative catalysts especially cobalt based catalysts and their borides have recently emerged to potentially replace noble metals in hydrogen generation from NaBH<sub>4</sub> solution (Ozerova et al., 2012).

Many synthesis methods of Co-B catalysts are reported in the literature such as wet impregnation, chemical reduction and sol-gel (Jeong et al., 2005). Among these methods, wet impregnation and chemical reduction are the most commonly used and simple method to synthesized Co-B particles. Although unsupported Co-B is active for hydrolysis of sodium borohydride, it is not stable and difficult to reuse and operate (Lu et al., 2012). These catalysts were supported on the surface of some inert carriers to realize a well dispersion of Co-B particles, prevent the agglomeration of catalyst particles and increase reusability of them (Tian et al., 2010). Generally activated carbon, carbon nanotube, zeolites and some clays were used as a catalyst support. In recent years, there has been considerable research in the use of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> as a carrier for immobilizing the metal catalyst (Wang et al., 2016). In this work  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported Co-B catalyst was synthesized with impregnation and chemical reduction method. The catalyst was characterized using XRF, FTIR and XPS. The influences of reaction conditions were investigated by hydrogen generation from alkaline NaBH<sub>4</sub> solution.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Cobalt (II) chloride hexahydrate ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , %99.9 %) and  $\text{NaBH}_4$  (%98) were purchased from Merck and Across chemical respectively.  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{NaOH}$  were purchased from Sigma Aldrich.

### Catalyst preparation

Supported CoB catalyst was prepared by impregnation-chemical reduction method. The cobalt metal loadings in catalyst were 15 wt.%. Cobalt chloride solution was impregnated onto  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  support material and stirred at 700 rpm for an hour at 75 °C. The samples were then reduced by  $\text{NaBH}_4$  solution at room temperature. The mole ratio of  $\text{NaBH}_4$  and Co metals was adjusted as a 3:1. After reduction cobalt boride particles solution was stirred at 400 rpm for an hour at room temperature. The precipitates were carefully washed with distilled water to remove the soluble ions and filtered. Then dried in an oven at 105°C for 24 hours. After drying and crushing, powder samples were used for catalytic hydrolysis of  $\text{NaBH}_4$ .

### Catalyst characterization

The chemical analysis of the catalyst was determined using X-ray fluorescence analyzer (XRF Panalytical Zetium). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra was performed using Bruker Tensor 27 spectrometer in 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  at 8  $\text{cm}^{-1}$  resolution. The surface electronic state was analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) using SPECS SAGE-150 spectrometer with  $\text{MgK}\alpha$  (1486.6 eV) as the X-ray source.

### Catalytic activity test

The catalytic activity of catalyst was tested by hydrolysis of sodium borohydride solution. Hydrolysis reaction was carried out in a 150 mL jacketed-heated batch reactor. The reactor was kept at the desired temperatures by circulating water from a constant temperature bath with  $\pm 0,1$  C sensitivity. A magnetic stirrer was used for constant stirring and adjusted at 400 rpm. An alkaline stabilizes solution of  $\text{NaBH}_4$  was prepared by addition of  $\text{NaOH}$ . In the experiments, a definite amount of catalyst was added into reactor. Then 20 mL of freshly prepared alkaline sodium borohydride solution was fed into reactor. The volume of hydrogen generation was measured by water displacement method as a function of time until hydrogen generation was completed. The hydrogen generation rate ( $\text{mL g}_{\text{Co}}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) for the synthesized catalyst was calculated based on the metal loading of Co.

## RESULTS

### Catalyst characterization

Chemical composition of Co-B/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  catalyst before hydrolysis and after hydrolysis reaction can be seen in Table 1. The FTIR spectra of the Co-B/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  catalyst and the XPS spectra of the Co-B/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  catalyst are shown in Figures 1 and 2, respectively.

**Table 1.** Chemical composition of Co-B/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  catalyst

Wt. %	$\text{Co}_3\text{O}_4$	NiO	$\text{SiO}_2$	Cl	$\text{SO}_3$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{Na}_2\text{O}$	CuO	ZnO	CaO	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	L.O.İ.
Before hydrolysis	16.11	0.052	0.250	0.138	0.036	67.643	-	0.045	0.019	0.028	0.066	15.61
After hydrolysis	15.21	0.052	0.253	-	0.060	64.357	2.057	0.024	0.017	0.035	-	17.93

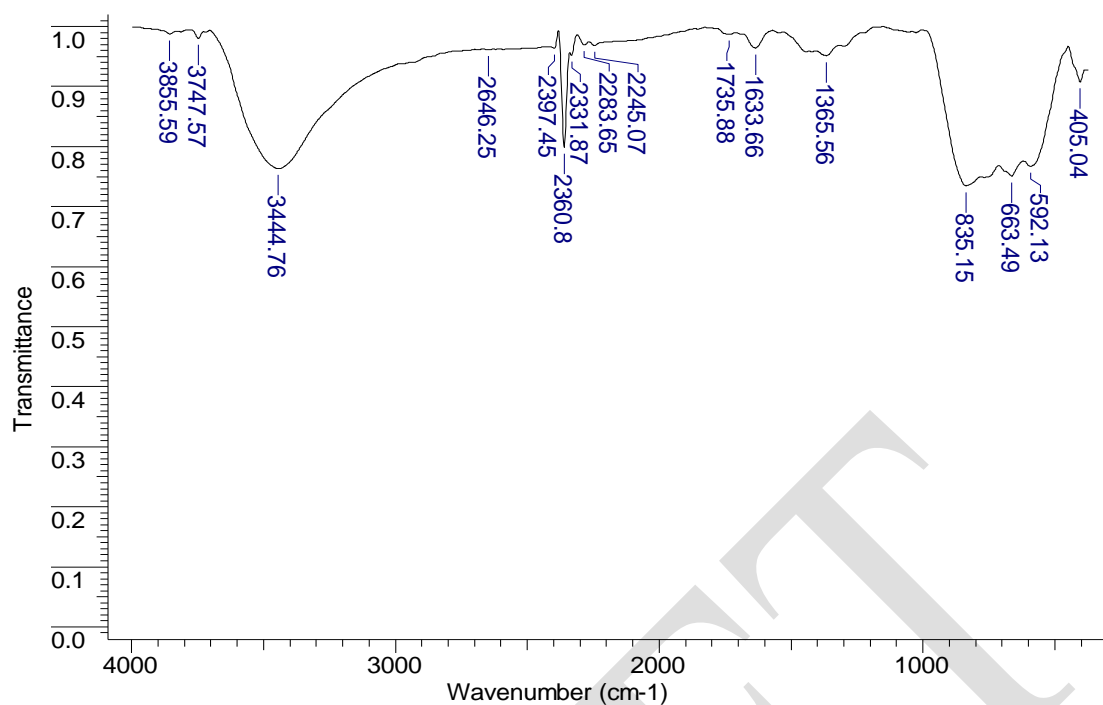


Figure 1. FTIR spectra of Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

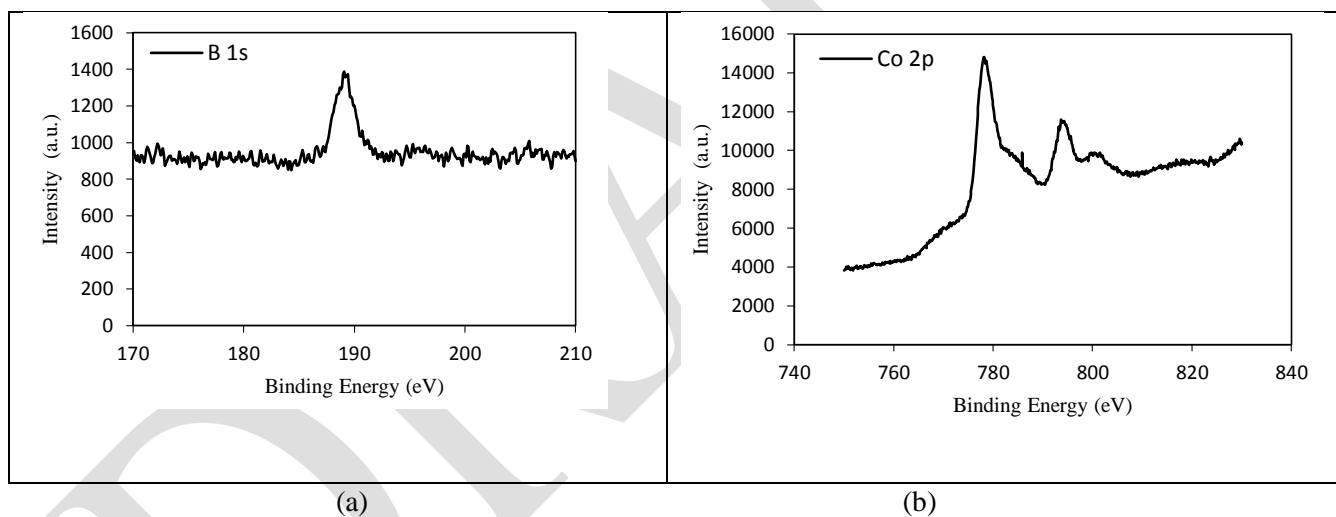
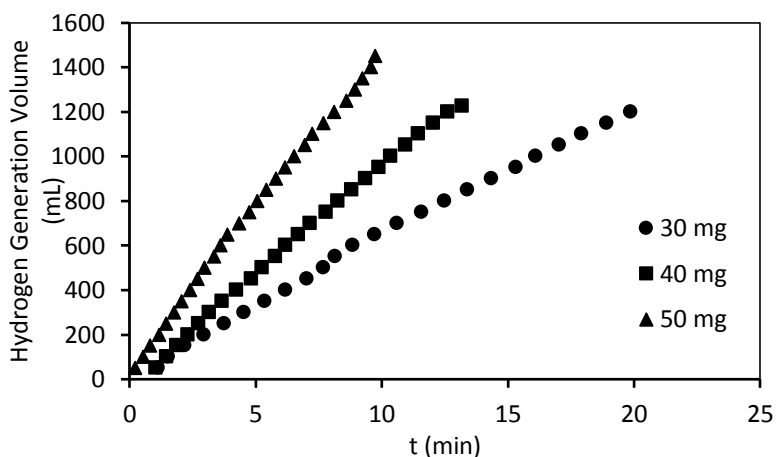


Figure 2. XPS spectra of Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a) B 1s b) Co 2p XPS

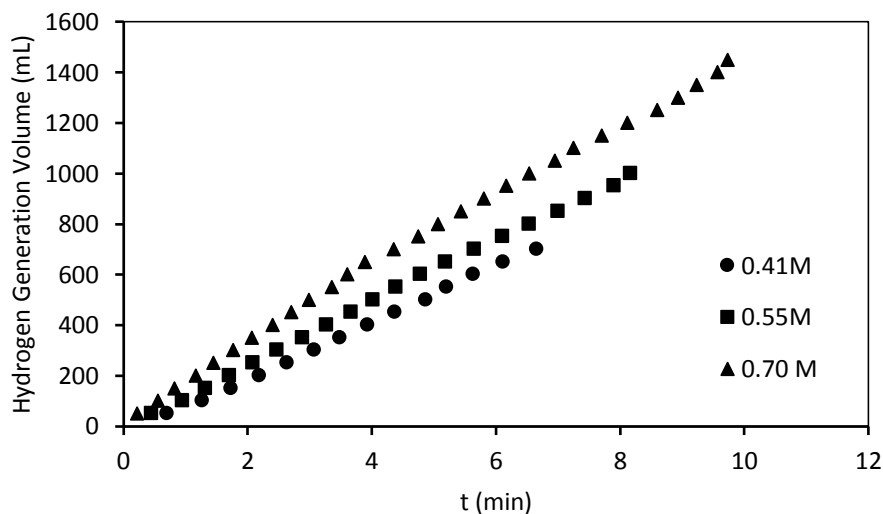
The effect of catalyst amount on hydrogen generation was investigated by carrying out a series of experiments the range of 30-50 mg, at a NaBH<sub>4</sub> concentration of 0.7 M, a NaOH concentration of 0.66 M and a reaction temperature of 50 °C, and the result is shown in Figure 3.





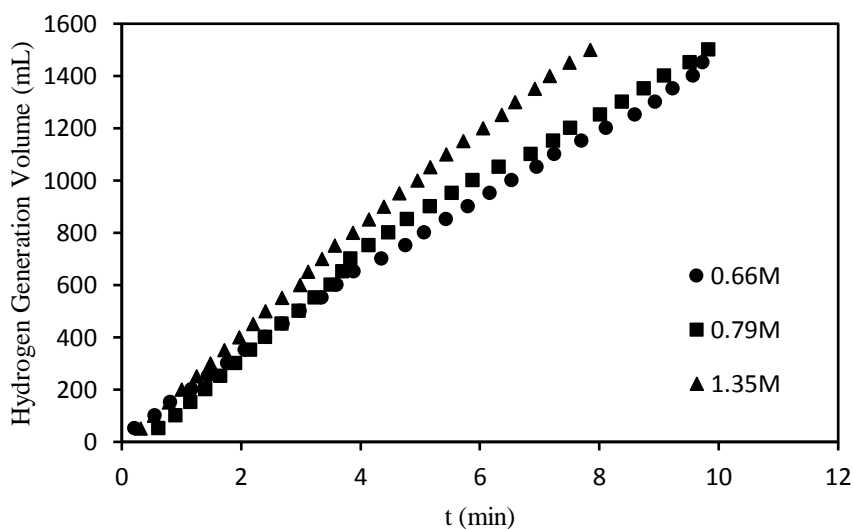
**Figure 3.** Effect of catalyst amount on the hydrogen generation by hydrolysis of  $\text{NaBH}_4$

The effect of  $\text{NaBH}_4$  concentration on the hydrogen generation was studied using different  $\text{NaBH}_4$  concentrations (0.41 M, 0.55 M, 0.70 M), at a catalyst amount of 50 mg, a NaOH concentration of 0.66 M and a reaction temperature of 50 °C. Figure 4 shows the effect of  $\text{NaBH}_4$  concentration on the hydrogen generation.



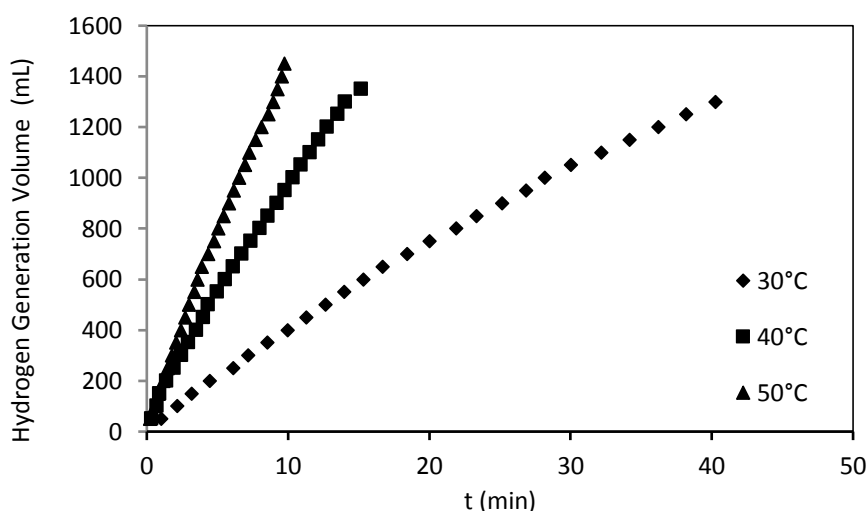
**Figure 4.** Effect of  $\text{NaBH}_4$  concentration on the hydrogen generation by hydrolysis of  $\text{NaBH}_4$

Figure 5. shows the effect of NaOH concentration on the hydrogen generation at a catalyst amount of 50 mg, a  $\text{NaBH}_4$  concentration of 0.7 M and a temperature of 50 °C.



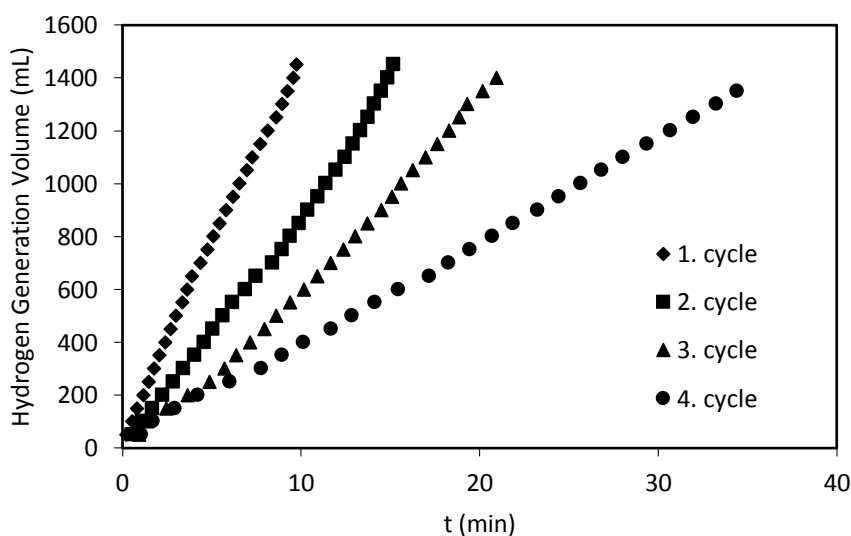
**Figure 5.** Effect of NaOH concentration on the hydrogen generation by hydrolysis of NaBH<sub>4</sub>

The effect of reaction temperature on the hydrogen generation at a catalyst amount of 50 mg, a NaBH<sub>4</sub> concentration of 0.70 M and a NaOH concentration of 0.66 M is presented in Figure 6.



**Figure 6.** Effect of reaction temperature on the hydrogen generation by hydrolysis of NaBH<sub>4</sub>

The re-usability and durability of the catalyst is crucial in the practical hydrogen generation applications. The stability behaviour of the Co-B/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst were tested at a catalyst amount of 50 mg, a NaBH<sub>4</sub> concentration of 0.7 M, a NaOH concentration of 0.66 M and a reaction temperature of 50 °C. The plots of hydrogen generation volume versus time for four cycle are shown in Figure 7.



**Figure 7.** Reusability tests of the Co-B/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst in the hydrolysis of NaBH<sub>4</sub>

## DISCUSSION

It can be found that the metal content of catalyst before hydrolysis and after hydrolysis reaction were close to the designed values (Table 1). It can be observed that the bands at 3855 cm<sup>-1</sup> and 3747 cm<sup>-1</sup> were attributed to the stretching vibration of hydroxyl group. The bands range of 2245-2646 cm<sup>-1</sup> were assigned to the metal oxygen vibration of Co-O. The stretching frequencies 835.15 cm<sup>-1</sup> were associated to the vibration of metal-oxygen-metal Co-O-Co bonds. The frequencies at 663.49 cm<sup>-1</sup> and 592.13 cm<sup>-1</sup> were attributed to the stretching vibrations of B-O in the Co-B/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst (Figure 1). XPS profiles of B and Co elements in the compound are seen in Figures 2a and 2b respectively. Figure 2a shows the binding energy of B 1s at 189.1 eV. The binding energy of B<sup>o</sup> was higher than that of standard value (187.1 eV). This shift revealed that the electrons of B were transferred into the empty d orbitals of Co. Figure 2b shows the binding energies of 778.2

ev and 793.7 eV which can be attributed to Co2p<sup>3/2</sup> and Co2p<sup>1/2</sup> peaks, respectively. These binding energies indicated that Co was present in both the elemental and oxidized states, respectively (Fernandes et al., 2009; Yang et al., 2011; Wu et al., 2011; Manna et al., 2014). The cobalt content of the catalyst was higher than the cobalt oxide content.

It can be shown in Figure 3, the hydrogen generation volume increases with increasing the amount of the catalyst used. In the presence of 30 mg catalyst, hydrogen volume was 1200 mL in 19.88 min. When the catalyst amount increased to 50 mg, the reaction ended in 9.73 min with a hydrogen volume of 1450 mL. The hydrogen generation rate increases depending on the increase in the hydrogen generation volume and the decrease in the reaction time. The hydrogen generation rate was obtained as 13411 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> with 30 mg Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst and 19863 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> with 50 mg Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst. This is because the use of more catalysts leads to contact more active centers between borohydride and catalyst. These results show that hydrogen generation rate can be determined by controlling the amount of catalyst. The results are similar with some studies reported by Wang et al. (2016) using Co-Ni-Mo-P/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst, Tian et al. (2010) using clay-supported Co-B catalyst and Niu et al. (2012) using carbon supported cobalt catalyst.

When NaBH<sub>4</sub> concentration increased from 0.41 M to 0.70 M, the hydrogen generation volume increased from 700 mL to 1450 mL. At the same time, the hydrogen generation rate increased 14035 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> to 19863 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> for 0.41 M and 0.70 M according to varying hydrogen generation volume and reaction time (Figure 4). The rate of hydrogen generation increased with increasing NaOH concentration. However, this increase was lower than that of NaBH<sub>4</sub> concentration (Figure 5). Furthermore, the high NaOH concentration increases the viscosity of the solution, causing the by-product NaBO<sub>2</sub> to precipitate on the catalyst. Therefore, the lower NaOH concentration value was chosen to avoid the surface blocking of catalyst for the NaBH<sub>4</sub> hydrolysis reaction.

The hydrogen generation rate increased exponentially with the increase in the reaction temperature from 30°C to 50°C. The hydrogen generation rate varied between 4304 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> and 19863 mL g<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>. Hydrogen generation volume increased linearly with reaction time. So, the reaction rate constants were calculated according to zeroth-order. The activation energy were found to be 57.09 kJ mol<sup>-1</sup> using Arrhenius equation. This value is similar to the studies using carbon supported Co-B catalyst (57.80 kJ mol<sup>-1</sup>) (Zhao et al., 2007), Co-B /Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst (56.80 kJ mol<sup>-1</sup>) (Lu et al., 2012) and using Ni-Co-P/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (52.12 kJ mol<sup>-1</sup>) (Li et al., 2014).

It was observed that the hydrogen generation volume was close to each other in four cycles. But, hydrogen generation rate decreased from 19863 mLg<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> to 12747 mLg<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> in the first two cycles. After the third cycle, the hydrogen generation rate reduced to 8957 mLg<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> and the rate of hydrogen in the fourth cycle was 5232 mLg<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> (Figure 7). The catalyst activity is reduced by the number of cycles. Due to the blocking of the catalyst surface with NaBO<sub>2</sub> residue and some other physical changes on the catalyst surface, the catalytic activity decreases. However, the reduction in the catalyst activity can be compensated by pretreatment before multiple use.

## CONCLUSION

γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> supported Co-B catalyst was prepared by wet impregnation and chemical reduction method. The catalytic activity of Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst in hydrolysis of NaBH<sub>4</sub> reaction were studied. The experimental results showed that the hydrogen generation properties of the catalyst in alkaline solution were largely dependent on the reaction temperature, the amount of catalyst and the concentration of NaBH<sub>4</sub>, respectively. The maximum hydrogen generation rate was obtained 25477 mLg<sub>Co</sub><sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> at 50 °C. The activation energy of hydrolysis reaction was determined as 57.09 kJ mol<sup>-1</sup> according to zeroth-order kinetics.

It was seen that catalyst worked with little degradation under alkaline conditions until the end of hydrolysis reaction. Also, XRF results showed that chemical composition of Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst was maintained after hydrolysis reaction. As a results, it can be concluded that Co-B/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst has high activity and long term stability in alkaline NaBH<sub>4</sub> hydrolysis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by ESOGU Scientific Research Projects Commission (Project number 2016-891).

## REFERENCES

- Amendola SC, Sharp-Goldman SL, Janjua MS, Spencer NC, Kelly MT, Petillo KJ, Binder M 2000. A safe, portable, hydrogen gas generator using aqueous borohydride solution and Ru catalyst. *International Journal of Hydrogen Energy*, 25: 969-975.
- Aneke M, Wang M 2016. Energy storage technologies and real life applications – A state of the art review. *Applied Energy*, 179: 350-377.
- Aydin M, Hasimoglu A, Ozdemir AK 2016. Kinetic properties of Cobalt-Titanium-Boride hydrolysis reaction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41: 239-248.
- Fernandes R, Patel N, Miotello A, Filippi M 2009. Studies on catalytic behavior of Co-Ni-B in hydrogen production by hydrolysis of NaBH<sub>4</sub>. *Journal of molecular Catalysis A: Chemical*, 298: 1-6.
- Jeong SU, Kim RK, Cho EA, Kim HJ, Nam SW, Oh IH, Hong SA, Kim SH 2005. A study on hydrogen generation from NaBH<sub>4</sub> solution using the high-performance Co-B catalyst. *Journal of Power Sources*, 144: 129-134.
- Li Z, Li H, Liu T, Zhang T, Wang G, Xie G 2014. Hydrogen generation from catalytic hydrolysis of sodium borohydride solution using supported amorphous alloy catalysts (Ni-Co-P/  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). *International Journal of Hydrogen Energy*, 39: 14935-14941.
- Lu YC, Chen MS, Chen YW 2012. Hydrogen generation by sodium borohydride hydrolysis on nanosized CoB catalysts supported on TiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub>. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 4254-4258.
- Manna J, Roy B, Vashistha M, Sharma P 2014. Effect of Co<sup>+2</sup>/BH<sub>4</sub><sup>-</sup> ratio in the synthesis of Co-B catalysts on sodium borohydride hydrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39: 406-413.
- Niu WL, Ren DB, Han YY, Wu YJ, Gou XL 2012. Optimizing preparation of carbon supported cobalt catalyst for hydrogen generation from NaBH<sub>4</sub> hydrolysis. *Journal of Alloys and Compound*, 543: 159-166.
- Ozerova AM, Simagina VI, Komova OV, Netskina OV, Odegova GV, Bulavchenko OA, Rudina NA 2012. Cobalt borate catalysts for hydrogen production via hydrolysis of sodium borohydride. *Journal of Alloys and Compounds*, 513: 266-272.
- Özkar S, Zahmakıran M 2005. Hydrogen generation from hydrolysis of sodium borohydride using Ru(0) nanocluster as catalyst. *Journal of Alloys and Compounds*, 404-406: 728-731.
- Tian H, Guo Q, Xu D 2010. Hydrogen generation from catalytic hydrolysis of alkaline sodium borohydride solution using attapulgite clay-supported Co-B catalyst. *Journal of Power Sources*, 195: 2136-2142.
- Wang L, Li Z, Zhang P, Wang G, Xie G 2016. Hydrogen generation from alkaline NaBH<sub>4</sub> solution using Co-Ni-Mo-P/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41:1468-1476.
- Wu C, Bai Y, Liu DX, Wu F, Pang ML, Yi BL 2011. Ni-Co-B catalyst-promoted hydrogen generation by hydrolyzing NaBH<sub>4</sub> solution for in situ hydrogen supply of portable fuel cells. *Catalysis Today*, 170: 133-139.
- Yang CC, Chen MS, Chen YW 2011. Hydrogen generation by hydrolysis of sodium borohydride on CoB/SiO<sub>2</sub> catalyst. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 1418-1423.
- Yuan X, Jia C, Ding XL, Ma ZF 2012. Effects of heat-treatment temperature on properties of Cobalt-Manganese-Boride as efficient catalyst toward hydrolysis of alkaline sodium borohydride solution. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 995-1001.
- Zhao J, Ma H, Chen J 2007. Improved hydrogen generation from alkaline NaBH<sub>4</sub> solution using carbon-supported Co-B as catalysts. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32: 4711-4716.

## Humidifier design to absorb H<sub>2</sub>O content in biogas fuels

Murat Şahin<sup>1\*</sup>, Mustafa Vatansever<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ahi Evran University, Faculty of Engineering, Department of Mechanical Engineering, Kırşehir

<sup>2</sup>Tercih Isı Makinaları Ltd. Co., Ankara

\*Corresponding author e-mail: murat.sahin@ahievran.edu.tr

### Abstract

In this study, a dehumidifier design has been made to remove H<sub>2</sub>O content from biogas fuels. H<sub>2</sub>O content is an important parameter for biogas combustion characteristics. The moisture-holder is designed to minimize the effect of H<sub>2</sub>O content in the biogas due to its effect on combustion chamber temperatures. Another important feature of the moisture holder design for eliminating H<sub>2</sub>O content in the biogas content is its effect on minimizing the amount of greenhouse gas produced by combustion. This study is carried out to make a moisture holder design for biogas systems in order to combustion efficiency and environment.

**Keywords:** Biogas systems, humidity, humidity holder, hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>O content

### INTRODUCTION

In order to meet the increasing energy demand in the world, scientists are conducting research on alternative energy sources. Biogas, one of the alternative energy sources, is considered as an alternative energy source for natural gas for our country.

Many scientists investigate combustion of biogas in any combustion systems. For example, Adouane et al. have conducted an experimental study related to reduction of NO<sub>x</sub> emissions arising from fuel-bound nitrogen[1]. Bhoi and Channiwala have experimentally investigated emission characteristics and axial flame temperature distributions of producer gas including high amount of nitrogen by varying thermal inputs and equivalence ratios[2]. Somehsaraei et al. have examined the fuel flexibility and performance analysis of biogas in micro gas turbines[3]. Hosseini et al. have performed combustion characteristics of biogas under flameless combustion conditions[4]. Murat et al. have been investigated the effect of H<sub>2</sub>O content and H<sub>2</sub>S content on combustion characteristics of biogas [5].

### DRYING Method

In the biogas production process, moisture (H<sub>2</sub>O) formation is observed in the biogas. Moisture (H<sub>2</sub>O) in biogas should be taken before the end use of biogas (such as compressor, turbine, burner, biogas engine, etc.). This dehumidification process is called biogas drying process or moisture retention process. This drying process is usually carried out as two types of condensation and adsorption. If moisture retention is not done, it decreases the combustion efficiency in the end use process. It is showed in the Figure 1.

#### Moisture Condensing Holder

Biogas is produced in the reactor and passed to hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) removal unit. The biogas, which is purified from hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), decreases its pressure and the pressure is increased by blower to be sent to the end-use site. The temperature of the biogas at the outlet of the blower reaches an average of +65°C. When biogas is cooled, it becomes over saturated with water vapor. When biogas is lowered to +2°C, usually with water-glycol cooler (chiller), the volume decreases and the relative humidity is increased and the dew point is reached. As a result, the water in the gas condenses. Condensed water is held in a separator. Separators can be equipped with micropores to achieve higher efficiency results. The temperature of the biogas at +2°C, which is decomposed into water, is directed to the heat exchanger called economizer to increase the temperature to the desired temperature. The economizer provides an additional benefit to the cooling power by reducing the temperature of the high temperature biogas entering the dryer. At the same time, it provides additional energy for increasing the outlet temperature of the dryer.

## Moisture Condensing Holder Drawing

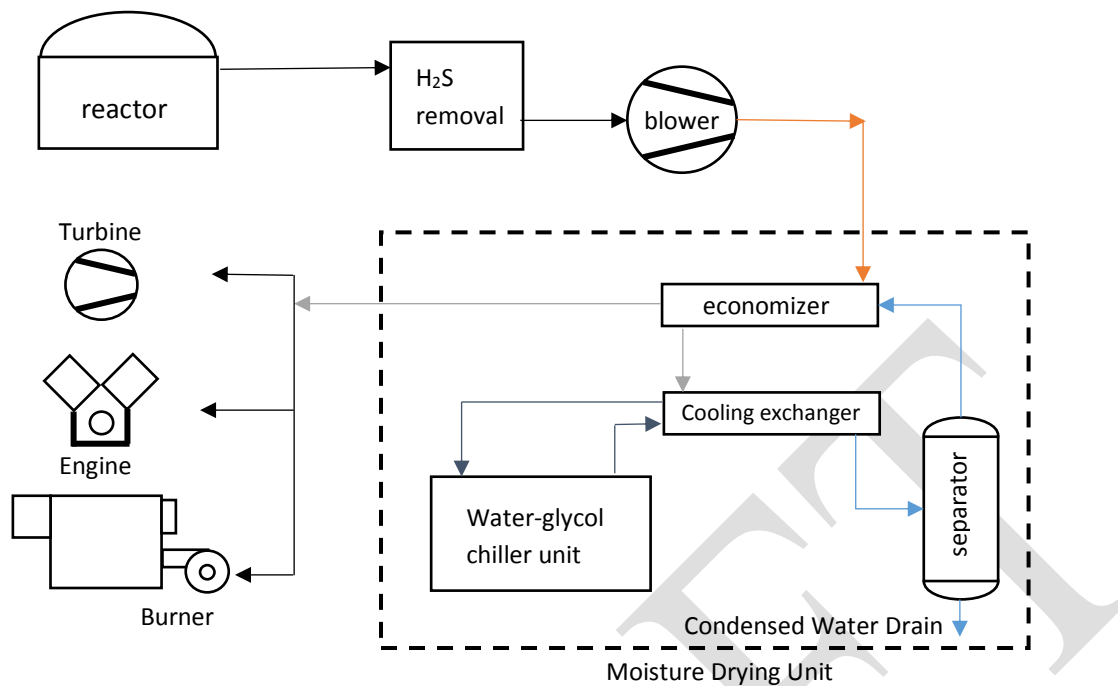
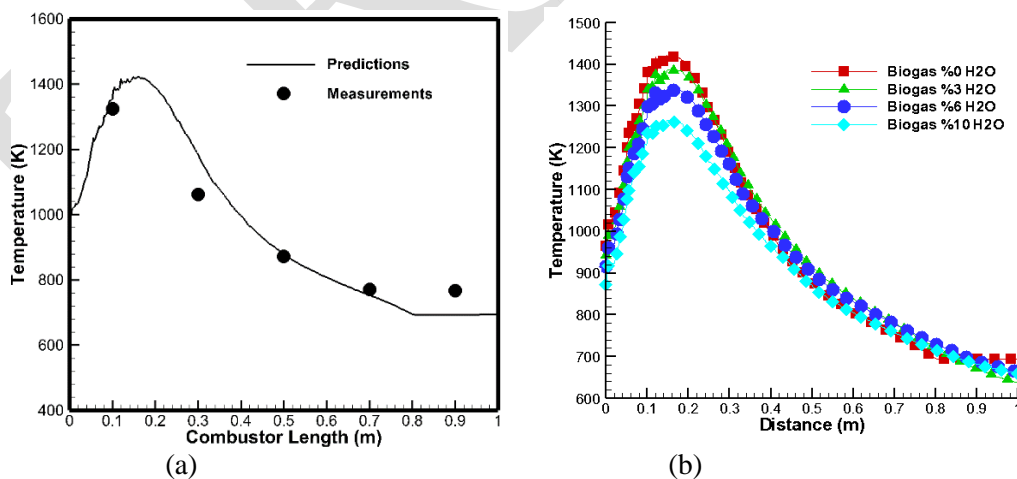


Figure 1. Axial temperature profiles

## RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the effect of H<sub>2</sub>O content on the axial temperature distribution of biogas combustion in a conventional burner is shown in Figure 2. It can be said that the biogas flame temperature decreased as the H<sub>2</sub>O is increased in conventional burner. The effects of the H<sub>2</sub>O content and H<sub>2</sub>S content in the biogas were investigated. It was determined that the destruction of H<sub>2</sub>O and H<sub>2</sub>S contents from the biogas would have positive results for combustion efficiency and environment[5].



The predicted and measured profiles      The predicted profiles for different H<sub>2</sub>O contents

Figure 2. Axial temperature profiles[5].

## CONCLUSIONS

This study has been performed in order to investigate the effects of the varying H<sub>2</sub>O contents in the biogas fuels. As a result of absorption of H<sub>2</sub>O in biogas systems, combustion chamber temperatures increased. As the H<sub>2</sub>O content in the biogas fuels decreases in the burner, the flame temperature of the biogas has been increased.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank to TÜBİTAK for the support of this study.

## REFERENCES

- [1] Adouane B, de Jong W, van Buijtenen JP, Vitteveen G, Fuel-NO<sub>x</sub> emissions reduction during the combustion of LCV gas in an air staged Winnox-TUD combustor, *Appl Therm Engineering*, 2010; 100:1034-1038.
- [2] P. R. Bhoi and S. A. Channiwala, Emission characteristics and axial flame temperature distribution of producer gas fired premixed burner, *Biomass and Bioenergy*, Vol: 33, pp. 469-477, 2009.
- [3] H. N. Somehsaraei, M. M. Majoumerda, P. Breuhausb, M. Assadia, Performance analysis of a biogas-fueled micro gas turbine using a validated thermodynamic model, *Applied Thermal Engineering*, Vol:66, 181-190,2014.
- [4] S. E. Hosseini, G. Bagheri, M. A. Wahid, Numerical investigation of biogas flameless combustion, *Energy Conversion and Management*, Vol: 81, pp. 41-50, 2014. *Thermal Engineering*, Vol: 66, pp. 181-190, 2014.
- [5] M. Sahin and M. Ilbas, Analysis of the effect of H<sub>2</sub>O content on combustion behaviours of a biogas fuel, *International Journal of Hydrogen Energy*, in proof (2019)

## Genetik geçişli göz hastalıkları

Songül Budak Diler

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail:budakdiler@gmail.com

### Özet

Günümüzde, göz hastalıkları ve bu hastalıkların genetik temelleri hakkında bilgi ve anlayıştaki gelişmelerde önemli bir artış olduğu görülmektedir. Kalıtsal göz hastalıkları, çeşitli yapısal/fonksiyonel anomaliye ve gelişimsel değişikliklere neden olabilen büyük ve heterojen bir grubu oluşturmaktadır. Bu hastalıklarda tanı, göz hekimleri ve genetik uzmanları arasındaki ileri düzeyde karşılıklı kurulan iş birliği ile kolaylaşmaktadır. Bu yazıda genetik kökenli olduğu bilinen retinoblastom, mitokondriyal hastalıklar, retina displazileri, retinitis pigmentosa, koroideremi, jirat atrofi, vb gibi bazı göz hastalıkları ele alınmıştır. Ayrıca, genetik hastalıklar gelişmiş ülkelerde bebeklerde ve çocuklarda en sık görülen körlük nedenidir. Bu hastalıklarda aile öyküsünü bilmek, aile içindeki benzer göz hastalıkları veya yatkınlıkları olan üyelere faydası açısından çok önemlidir. Sonuç olarak, bilim adamları gözlerimizin görme ve sağlığını etkileyebilecek birçok gen ve bu genlerin varyantlarını haritaladılar. Göz sağlığımızı etkileyen bu kalıtsal hastalıklarda, genetik testler kullanılarak erken tanı konulması, hastaların tedavi planlarını oluşturma koşullarını değerlendirmesine ve daha sonra görme komplikasyonlarından kaçınmak için bakımın izlenmesine yardımcı olması açısından oldukça önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Genetik göz hastalıkları, genetik danışmanlık, retinoblastom, mitokondriyal hastalıklar

### Hereditary eye diseases

#### Abstract

Today, there is a significant increase in the knowledge and understanding of eye diseases and the genetic basis of these diseases. Hereditary eye diseases constitute a large and heterogeneous group that can cause various structural/functional anomalies and developmental changes. Diagnosis in these diseases is facilitated by an advanced level of cooperation between ophthalmologists and genetic experts. In this paper, some eye diseases such as retinoblastoma, mitochondrial diseases, retinal dysplasia, retinitis pigmentosa, choroideremia, gyrate atrophy, etc., which are known to be of genetic origin, have been investigated. In addition, genetic diseases are the most common cause of blindness in infants and children in developed countries. Knowing the family history becomes crucial for inherited eye diseases as it can benefit members in family who may have similar eye diseases or predispositions.

As a result, scientists have mapped many genes and variants of these genes that could affect the vision and health of our eyes. In these hereditary diseases affecting our eye health, early diagnosis by using genetic tests is very important in order to help patients evaluate the conditions for creating treatment plans and then to monitor care to avoid vision complications.

**Keywords:** Genetic eye diseases, genetic counseling, retinoblastoma, mitochondrial diseases

#### GİRİŞ

İnsan gözü kompleks, iyi gelişmiş ve ışığa duyarlı (fotosensitif) olup, farklı dokuları içeren üç embriyonik tabakadan oluşan, yaklaşık 24 mm çapında, kafatası içinde koruyucu kemik olan orbitalar içine yerleşmiş karmaşık bir yapıdır. Gözü oluşturan tabakalar sırasıyla, 1) dış tabaka (tunica fibrosa): sklera ve kornea, 2) orta tabaka (tunica vasculosa): koroid, corpus ciliare, iris ve 3) iç tabaka (tunica nervosa): retina, olmak üzere üç tabakadan oluşur. Görme, gözde başlayıp beyinde görme korteksine kadar uzanan karmaşık bir olaylar topluluğudur. Göz, küresel şekli koruyan dayanıklı fibröz bir yapı ile görüntüyü odaklayan bir mercek sisteminden ve ayrıca görüntüyü toplayan ve merkezi sinir sistemine ileten fotosensitif hücrelerden oluşun, insan için önemli bir organdır (Altıntaş, 2013).

Tıp bilimindeki hızlı genetik ilerlemeler ile insan ve insan dışı diğer canlı genomlarının başarıyla dizinlenmesi, bu bilim dalını önemli bir genomik tıp disiplini haline dönüştürmüştür (Singh ve Tyagi, 2018). Genetik, kalıtsallık ve kalıtsal özelliklerin değişimini inceleyen bir bilim dalıdır. Genetik geçişli göz hastalıklarını



araştıran, göz doktorlarının oküler genetiğe olan ilgisi oküler genetiğin keşfine büyük katkı sağlamıştır (Mathebula, 2012).

Genetik (herediter) tip göz hastalıklarında genellikle pozitif aile öyküsü ve erken yaşlarda görülen göz problemleri dikkat çekicidir ve bu hastalıklar katarakt, retinitis pigmentosa, glokom, retinoblastoma olarak bilinen göz hastalıklarıdır. Günümüzde göz hastalıklarının çoğu, pek çok genin etkilendiği (multigenik) ve birçok faktörün olaya karıştığı (multifaktöriyel) hastalık grubunu oluşturmaktadır olup, bu hastalıklarda genetik tanı koymak her zaman kolay olmamaktadır (Güran, 2011).

İnsanları etkilediği bilinen yaklaşık 4000 genetik hastalık ve sendromdan en az üçte biri gözü içerir (Mathebula, 2012). Kromozom kaynaklı hastalıklar, sendromik göz malformasyonlarının %60'ından sorumludur. Bu hastalıklarda otozomal resesif kalıtım gösteren sendromlar %15'i, otozomal dominant kalıtım gösteren sendromlar %5,83'ü ve çevresel ajanlara bağlı oluşan sendromlar %10'u oluşturur. Göz malformasyonlarına eşlik eden anomaliler, sıklıkla ekstremiteleri (%59,3), kulakları ve yüzü (%47,1), santral sinir sistemini (%42,5) ve ekstremiteler dışındaki kas-iskelet sistemini (%42,2) ilgilendirir bir durum göstermektedir (Utine ve Utine, 2012a).

Son yirmi yedi yılda genetik göz hastalıkları ve sendromları bilgimizde önemli bir artış oldu (Singh ve Tyagi, 2018). Genetik göz hastalıklarında, tanıya ve tedaviye yönelik uygun klinik ve genetik danışmanlığın verilebilmesi için, genetikçilerin ve oftalmologların bu hastalıkların temel klinik ve genetik özelliklerini iyi bilmeleri önemlidir. Genetik kökenli göz hastalıkları, arka segmenti ve ön segmenti ilgilendiren genetik kökenli göz hastalıkları olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Bu hastalıklardan arka segmenti ilgilendiren genetik kökenli göz hastalıkları sırasıyla retinoblastom, mitokondriyal hastalıklar, retina displazileri, retinitis pigmentosa, koroideremi, jirata atrofi, Alström hastalığı, oküler albinizm, optik sinir hipoplazisi, anoftalmi/mikroftalmi ve Leber'in konjenital amaurozsidir (Utine ve Utine, 2012b). Diğer grubu oluşturan ve ön segmenti ilgilendiren genetik kökenli göz hastalıkları ise sırasıyla aniridi, ön segment disgenezisi, glokom, kornea distrofileri, katarakt, ektopia lentis, miyopi ve diğer kırma kusurlarıdır (Utine ve Utine, 2012a).

İnsanlarda, tüm genetik bilgi veya genom 23 çift kromozom yani, 46 kromozom arasında dağılmıştır. Bu 23 çift kromozomun biri cinsiyet kromozomu olup, diğer 22 çift kromozom hem erkekte hem de kadında bulunan ve otozom olarak adlandırılan, biri anneden diğeri de babadan gelen kromozomlardır. İki X kromozomunun varlığı dişi bireyi, XY kromozomu, erkek bireyi oluşturur (Burton ve ark., 2005).

Genetik göz hastalıkları genetik anormallik türüne göre de sınıflandırılmaktadır. Bunlardan Mendel kalıtım gösteren genetik anormallik, sadece bir gen üzerinde ortaya çıkar ve bunlar tek gen kusurlarını oluşturan hastalık tipidir. Bu anormallikler, otozomal dominant, otozomal resesif ve X'e (cinsiyete) bağlı olarak alt gruplara ayrılırlar. Otozomal genler, insanda bir ile 22 arasındaki kromozomlar üzerinde yer alır ve otozomal dominant kalıtımın oluşması için de kusurlu genden sadece bir kopya olması yeterlidir. Bu kalıtımda, etkilenen bireylerin yavruları %50 etkilenme şansına sahip olup, etkilenmemiş diğer bireylerin yavrularında bu durum görülmez. Ancak otozomal dominant özelliklerin çoğu yapısal kusurları içermekte olup, erkek ve dişilerin eşit derecede etkilenmesi muhtemeldir. "Resesif" terimi gizli anlamına gelmekte ve bir birey, herhangi bir klinik belirtiyi göstermeden kusurlu bir genin tek bir kopyasını taşıması demektir. Otozomal resesif özellikler, diyabet ve hipertansiyon gibi metabolik bozukluklara neden olma eğilimindedir. Bu resesif özelliklerde teorik risk, iki taşıyıcı ebeveyni olan yavrular için %25'dir. X'e bağlı kalıtımın özelliği ise, bu kalıtımın sebep olduğu hastalıktan erkeklerin etkilenmesi ve dişilerin genellikle etkilenmeyen taşıyıcılar olmalarıdır. Anne taşıyıcı ise, erkek çocukların hasta olma riski %50'dir. Diğer genetik anormallik türü, Mendel kalıtımından farklı olup, çok faktörlü kalıtım yani poligenik özellik gösterir ve bu kalıtımda genellikle önemli bir çevresel faktör vardır (Mathebula, 2012).

Son zamanlarda, doğuştan katarakt, glokom, retina dejenerasyonu ve optik atrofi gibi kalıtsal göz hastalıkları dünya çapında pek çok bebeği etkilemekte ve bu hastalıklara uygulanan gen terapisi görme bozulmasında iyileşmeye yol açmış ve böylece bu kalıtsal göz kusurları için bir umut olmuştur. Genetik bulgular da gösteren diğer patolojiler arasında; Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), Marfan sendromu (MFS), miyopi, polipoidal koroidal vaskülopatiler (PCV), retinitis pigmentosa (RP), Stargardt's hastalığı (SD) ve uveal melanom (UM) gibi hastalıkların genleri / varyantları Tablo 1'de kısaca açıklanmıştır (Singh ve Tyagi, 2018).

**Tablo 1.** Yaygın gözü hastalıkları/bozuklukları ile bağlantılı genler/gen varyantları

Hastalık	Gen / varyant	Hastalığın veya bozukluğun başlangıç yaşı
AMD	NOS2A, CFH, CF, C2, C3, CFB, HTRA1/LOC, MMP-9, TIMP-3, SLC16A8, vb.	Yaşlı
Katarakt	GEMIN4, CYP51A1, RIC1, TAPT1, TAF1A, WDR87, APE1, MIP, Cx50/GJA3 & 8, CRYAA, CRYBB2, PRX, POLR3B, XRCC1, ZNF350, EPHA2, vb.	Yaşlı
Glokom	CALM2, MPP-7, Optineurin, LOX1, CYP1B1, CAV1/2, MYOC, PITX2, FOXC1, PAX6, CYP1B1, LTBP2, vb.	Bir bebeği etkileyebilecek doğumsal form dışında 40 yaşın üzerinde
Kalitsal optik nöropatiler	Complex I or ND genes, OPA1, RPE65, vb.	Genç erkekler
Marfan sendromu (MFS)	FBN1, TGFB2, MTHFR, MTR, MTRR, vb.	Bozuklukla doğar, ancak hayatı boyunca tanı konamayabilir
Miyop	HGF, C-MET, UMODL1, MMP-1/2, PAX6, CBS, MTHFR, IGF-1, UHRF1BP1L, PTPRR, PPFIA2, P4HA2, vb.	Tipik olarak yaklaşık 20 yaşına kadar ilerler
Polipoidal koroidal Vaskülopatiler (PCV)	C2, C3, CFH, SERPING1, PEDF, ARMS2-HTRA1, FGD6, ABCG1, LOC387715, CETP, vb.	50 ile 65 yaş arası
Retinitis pigmentosa (RP)	RPGR, PRPF3, HK1, AGL5, vb.	10 ile 30 arasında
Stargardt's hastalığı (SD)	ABC1, ABCA4, CRB1, vb.	Erken çocukluk - orta yaş arasında belirtiler görülebilir.
Uveal Melanom (UM)	PTEN, BAP1, GNAQ, GNA11, DDEF1, SF3B1, EIF1AX, CDKN2A, p14ARF, HERC2/OCA2, vb.	50-80

## Genetik geçişli bazı oküler hastalıklar

### Retinoblastom

Kromozomun 13q14 bölgesinde yer alan bir tümör baskılayıcı gen olan RB1'deki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan retina kökenli embriyonik bir hastalıktır. Görülme oranı 15.000-34.000'de bir ve görülme yaşı % 90 5 yaş öncesidir. Retinoblastom, değişken penetranslı otozomal dominant bir özellik gösterir ve bu Retinoblastom hastalığında her iki RB1 geninin de etkilenmiş olması gerekir. Kalıtsal retinoblastom hastalarının sadece %10'unda hastalığın aile hikayesi bulunurken, geri kalan %90'ında sporadik olarak germ hücrelerinde yeni mutasyon oluşmakta ve Bilateral hastalık ile pozitif aile hikayesi olan hastalarda germ hücre mutasyonunun var olduğu kabul edilerek, bu hastalarda kalıtım riski %50, penetrans %85 olduğu için sonraki nesillerde hastalığın görülme riski %40'dır (Utine ve Utine, 2012b).

### Mitokondriyal Hastalıklar

Yüksek heterojenite gösterdiği için hem klinik, hem de genetik tanısı zor olan mitokondriyal hastalıklardan, göz kapaklarından ekstraoküler kaslara, retina ve oksipital kortekse kadar tüm görme eksenini etkilenebilir. Kronik progresif eksternal oftalmopleji (CPEO), Kearns-Sayre sendromu (KSS), Leber'in herediter optik nöropatisi (LHON), Leigh sendromu ve nörojenik güçsüzlük, ataksi ve retinitis pigmentosa sendromu (NARP) mitokondriyal hastalıklar arasında sayılabilir (Utine ve Utine, 2012b).

İlk olarak Theodor Leber (1871) tarafından tanımlanmış, mitokondriyal bir hastalık olan, Leberin herediter optik nöropatisi (LHON), retinal ganglion hücreleri (RGH) ve aksonal uzantılarında dejenerasyona neden olduğu için santral görme kaybı ile karakterize genetik geçişli bir hastalıktır. Mitokondriyal DNA mutasyonu sonucu ortaya çıkan bu hastalıkta, sıklıkla m.11778 G-A, m.3460 G-A, ve m.14484 T-C nokta mutasyonları görülür (Peköz ve ark., 2012).

### Retinitis pigmentosa (RP)

RP klinik ve genetik olarak heterojen bir retinal dejeneratif kalıtsal hastalık olup, %10-15 X'e bağlı, %30-40 otozomal dominant ve %50-60 otozomal resesif kalıtım paternleri gösterebilir (Mathebula, 2012; Utine ve Utine, 2012b). RP, gece körlüğü, görme alanının daralması, pigment değişiklikleri veya retinadaki değişikliklerle karakterizedir ve sonuçta görme kaybına neden olur. RP erişkinlerde 1/4000 gibi yüksek sıklıkta

gözü kalıtsal bir körlük nedenidir. Ayrıca digenik ve mitokondriyal kalıtım nadir vakalarda görülür (Utine ve Utine, 2012b).

### **Koroideremi**

Koroideremi, koroid, retina pigment epitel ve retina fotoreseptör hücrelerinin X'e bağlı, resesif geçişli, progresif, yaygın ve gece körlüğüyle çocukluk çağında bulgu veren ilerleyici bir hastalıktır. X'e bağlı resesif olarak kalıtıldığı için erkeklerin primer olarak etkilendiği bir retina reseptör distrofidir. Rab eskort protein-1'i (REP1) kodlayan, Xq21.2 lokusundaki CHM geninin silinmesi veya mutasyonundan kaynaklanır (Mathebula, 2012; Utine ve Utine, 2012b). Neredeyse koroideremi ile ilgili rapor edilen tüm mutasyonlar etkilenen erkeklerde normal protein ürününün bulunmamasına neden olur. Taşıyıcı dişiler, rastgele X-inaktivasyonuna atfedilen yamalı koriorietinal dejenerasyon belirtileri gösterir (Mathebula, 2012).

### **Miyopi**

Ne yazık ki, patogenezi altında yatan mekanizma yeterince anlaşılammış, erken katarakt, retina dekolmanı, glokom ve makula dejenerasyon riskinin artması nedeniyle körlüğe yol açabilen karmaşık bir hastalıktır. Patogenezinde, genetik faktörlerin rol büyük olup, genler ve çevreden etkilenir. Genetik faktörler bazı popülasyonları %60'a kadar etkileyebilmektedir (Singh ve Tyagi, 2018).

### **Glokom**

Heterojen bir bozukluk olan glokom, ilerleyen bir retinal ganglion hücre kaybı, spesifik görme alanı eksikliği ve karakteristik bazı optik sinir atrofisinin olduğu patolojik bir durumdur (Mathebula, 2012). Glokom, optik sinir hasarına neden olduğu için kalıcı görme kaybı görülebilir. Risk faktörleri arasında aile öyküsü, yüksek tansiyon, göz yaralanması ve steroid kullanımı vardır. Afrika kökenli Amerikalılarda ve 60 yaşın üzerindeki insanlarda yaygındır. Eğer tespit edilmezse, körlüğe yol açabilir. Bu yüzden uzmanlar düzenli göz muayeneleri önerir (Singh ve Tyagi, 2018). Glokom için ana risk faktörü anormal derecede yükselmiş göz içi basıncıdır. Primer açık açılı glokom, tanımlanabilir bir ikincil neden yokluğunda glokomatöz optik nöropati varlığı ile karakterize en yaygın glokom türüdür. Primer açık açılı glokomun yaklaşık %5'i genetik bir temele sahiptir ve tek bir gene neden olduğu için buna Mendelian glokom formları denir, yani miyokin (MYOC) veya optineurin (OPTN) 'deki mutasyonların neden olduğu glokomdur. Bu tek genli glokom formları, otozomal dominant kalıtım gösteren bir Mendel özelliğidir (Mathebula, 2012).

### **SONUÇ**

İnsanları etkileyen yaklaşık 4000 hastalık / sendromun şaşırtıcı bir şekilde üçte birinin gözü içermesi, bu hastalıklar konusundaki bilginin iyileştirilmesinin, oftalmologlar ve araştırmacılar için, doğru teşhis, danışmanlık ve tedavi sağlamadaki yeteneklerini zenginleştirmek için eşit derecede faydalı olması önemlidir (Singh ve Tyagi, 2018). Genetik testler, genellikle az gören, ancak oftalmolojik muayenesi diğer yönlerden normal olan, örneğin; kalıtsal retina distrofileri gibi vakalarda, altta yatan göz problemini açığa çıkartabilir. Ayrıca, erken başlangıçlı glokom gibi bir oküler hastalık için yüksek riskli olguları tanımlayabilir ve kötü prognoza neden olacak faktörlerin önlenmesini veya geciktirilmesini sağlayabilir (Şekeroğlu ve ark.,2016).

Kompleks kalıtım gösteren oküler bozuklukların çoğunun körlükten sorumlu olduğu bilinmekte ve bu nedenle, moleküler genetikteki gelişmelerin gelecekte tıbbın çehresini değiştirebileceği ileri sürülmektedir (Mathebula, 2012). Bu yazıda, oküler genetik konusundaki mevcut anlayışın gözden geçirilmesiyle, klinisyenler ve araştırmacılar için hastalara ve ailelerine doğru genetik tanı ve uygun danışmanlık sağlama konusunda faydalı olmak amaçlanmıştır.

### **KAYNAKLAR**

- Altıntaş N 2013. Kalıtsal Retinopatilerde Retina Pigment Epiteli'nin Önemi ve Tünelin Sonundaki Işık: Retinitis Pigmentosa/Leber Congenital Amaurosis'in Genetiği. Van Tıp Dergisi, 20(2): 116-124.  
Burton PR, Tobin MD, Hopper JL 2005. Key concepts in genetic epidemiology. Lancet, 366: 941-951.  
Güran Ş 2011. Moleküler biyoloji ve genetikteki gelişmelerin ışığında göz hastalıklarında ileri tanı ve tedavi. Gülhane Tıp Derg, 53: 74-76.  
Mathebula SD 2012. A review of ocular genetics and inherited eye Diseases. S Afr Optom, 71(4):178-189.  
Peköz T, Boz PB, Koç F 2012. Leber'in Herediter Optik Nöropatisi: Geniş Bir Aile. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 37(2):121-124.

- Singh M, Tyagi SC 2018. Genes and genetics in eye diseases: a genomic medicine approach for investigating hereditary and inflammatory ocular disorders. *Int J Ophthalmol*, 11(1):117-134.
- Şekeroğlu HT, Utine GE, Alikashifoğlu M 2016. Genetik Göz Hastalıklarının Moleküler Tanısında Temel Bir Algoritma: Oftalmolog Bakış Açısı. *Turk J Ophthalmol*,46:299-300.
- Utine CA, Utine GE 2012a. Oftalmolojide Genetik II-Ön Segment Hastalıkları. *Turk J Ophthalmol*, 42:378-385.
- Utine CA, Utine GE 2012b. Oftalmolojide Genetik III-Arka Segment Hastalıkları. *Turk J Ophthalmol*, 42:386-392.

DRAFT

## ***Oreochromis niloticus*'un solungaç dokularında bazı oksidatif stres parametreleri (GSH ve TBARS) üzerine Chlorantraniliprolün akut toksisitesi**

Özge Temiz<sup>1\*</sup>, Dicle Kargın<sup>2</sup>, Hikmet Yeter Coğun<sup>3</sup>, Ferit Kargın<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 01330 Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, 34865 İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Cukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, 01920 Ceyhan, Adana, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: temizozge@gmail.com

### **Özet**

Akuatik sistemlerde pestisitlerin neden olduğu çevresel kirlilik ciddi bir problem oluşturmaktadır. Pestisitlerin geniş bir şekilde kullanımları ve ortamda kalıcı olmaları nedeniyle bu bileşiklerin birçoğu yüzey sularında ve yeraltı sularında bulunmaları akuatik organizmalar için büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada, böcek ilacı olarak kullanılan Chlorantraniliprole (CHL) pestisitinin, *O. niloticus* balıklarının solungaç dokusu GSH ve TBARS düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *O. niloticus* balıklar 96 saat sürelerle 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L Chlorantraniliprole etkisine bırakılmıştır. GSH ve TBARS düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Sonuç olarak solungaç dokusu GSH düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 96 saat süreyle 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L CHL etkisinde belirgin azalma olurken, TBARS düzeylerinde önemli artışlar olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada *O. niloticus* solungaç dokusundaki GSH ve TBARS düzeyleri ile ilgili elde edilen veriler sucül ekosistemlerde pestisit kirliliğinin izlenmesinde katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Chlorantraniliprole, GSH, TBARS, Solungaç, *Oreochromis niloticus*

### **Acute toxicity of Chlorantraniliprole on some oxidative stress parameters (GSH and TBARS) to gill tissues of *Oreochromis niloticus***

#### **Abstract**

Environmental pollution caused by pesticides in aquatic systems is a serious problem. Due to the wide use of pesticides and their persistence in the environment, many of these compounds are present in surface waters and groundwater, which poses a great risk for aquatic organisms. In this study, it was aimed to determine the effects of Chlorantraniliprole (CHL) pesticide, used as insecticide, on the gill tissue GSH and TBARS levels of *O. niloticus* fish. For this purpose, *O. niloticus* fish were exposed to 1.0 mg/L and 2.0 mg/L Chlorantraniliprole for 96 hours. GSH and TBARS levels were determined by spectrophotometric methods. As a result, GSH levels of gill tissue were significantly decreased in the 1.0 mg/L and 2.0 mg/L CHL effect for 96 hours compared to the control group, whereas significant increases in TBARS levels were observed. In this study, the data about the GSH and TBARS levels in *O. niloticus* gill tissue will contribute to the monitoring of pesticide pollution in aquatic ecosystems.

**Keywords:** Chlorantraniliprole, GSH, TBARS, Gill, *Oreochromis niloticus*

### **GİRİŞ**

Çevre zararlılarının en tehlikelerinden olan pestisitler, yoğun ve bilinçsiz kullanımı yağmur suları ile yeraltı sularına ve oradan nehir ve göllere taşınmakta ve sucül canlılara zarar vermektedir (Papa ve ark., 2017; Taher ve ark., 2017). Genellikle su kirliliğine ve o bölgede yaşayan balıkların sağlığını etkilemektedir. Yapılan laboratuvar ve alan çalışmalarında çeşitli pestisit türlerinin canlı üzerinde farklı biyokimyasal yollarla etki ettiği gösterilmiştir (Kasprzyk-Hordern ve ark., 2009; Selby ve ark., 2013). Tarımsal faaliyetlerde kullanılan çeşitli pestisitlere karşı zararlı canlılarda direnç oluşmakta ve bunun sonucunda doğada bulunan toksinlere benzer olan yeni sınıf pestisitler üretilmektedir (Selby ve ark., 2013; Temiz & Kargın, 2019).

*Ryania speciosa* bitki türünün metabolitlerinden doğal olarak üretilen toksin ryanodine derivatları dokularda kalsiyum kanallarının inaktivasyonuna neden olarak etki göstermektedir. Yeni sentetik sınıf olarak üretilen anthranilic diamide sınıfı ryanodine aktivatörü olarak üretilen ve ticari adı chlorantraniliprole olan bu pestisit, geniş bir şekilde lepidoptera zararlılarına karşı üretilen bir pestisittir (Selby ve ark., 2013; Temiz ve ark., 2018). Chlorantraniliprole (CHL), IUPAC adlandırması “3-bromo-4'-chloro-1-(3-chloro-2-pyridyl)-2'-methyl-6'-(methylcarbonyl) pyrazole-5-carboxanilide” şeklindedir (Rathnamma & Nagaraju, 2014).

Balıklar sudaki çevre kirliliğine karşı biyoindikatör olarak görülmektedir. *Oreochromis niloticus* birçok araştırmacı tarafından kirleticilerin etkilerinin belirlenmesinde önemli bir türdür (Almeida ve ark., 2002; Van Der Oost ve ark., 2003; Cogun ve ark., 2017; Temiz ve ark., 2018).

Ortam kirliliğine neden olan pestisitler canlılarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine artışına neden olmakta ve sonucunda oksidatif strese neden olmaktadır. Aşırı ROS üretimi canlıda oksidatif strese karşı koyabilmek için antioksidan sistem mekanizması ile detoksifikasyonu sağlamaktadır. Antioksidan sistem elemanları içerisinde enzimatik olmayan glutatyon (GSH) (L- $\gamma$ -glutamil-L-sisteinil-glisin) hücre içerisinde GSH bağımlı enzimlere bağlanarak toksisite oluşumunu önlemeye çalışan bir tripeptiddir. Toksikiteye karşı oksidatif stres parametresi olan lipid peroksidasyon sekonder ürünü tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) miktarının ölçülmesiyle elde edilmektedir (Sturve ve ark., 2008; Li ve ark., 2010).

Bu çalışmanın amacı CHL'nin 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L derişimlerinde 96 saat süreyle *O. niloticus* balıkların solungaç dokusu TBARS ve GSH düzeyleri belirlemektir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Deneylerde kullanılan *Oreochromis niloticus* balıkları Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuvarında adaptasyonları sağlanmıştır. Adaptasyon boyunca dinlendirilmiş musluk suyu içeren ve merkezi sistemle havalandırılan cam akvaryumlarda (40x120x40cm) beslenmiştir. Ortam sıcaklığı 23±1 °C olması sağlanmış, 12 saat aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Deney süresi sonucunda balıkların 12.44 ± 0.41 cm boy ve 30.21 ± 1.01 gr ağırlıkta ortalama değerlere ulaşmışlardır. Balıklar, günde iki kez olmak üzere balık ağırlığının % 1'i kadar hazır balık yemi (Pınar Balık Yemi, Türkiye) ile beslenmişlerdir. Kullanılan pestisit ticari adı Coragen, Dupont firmasından temin edilmiştir.

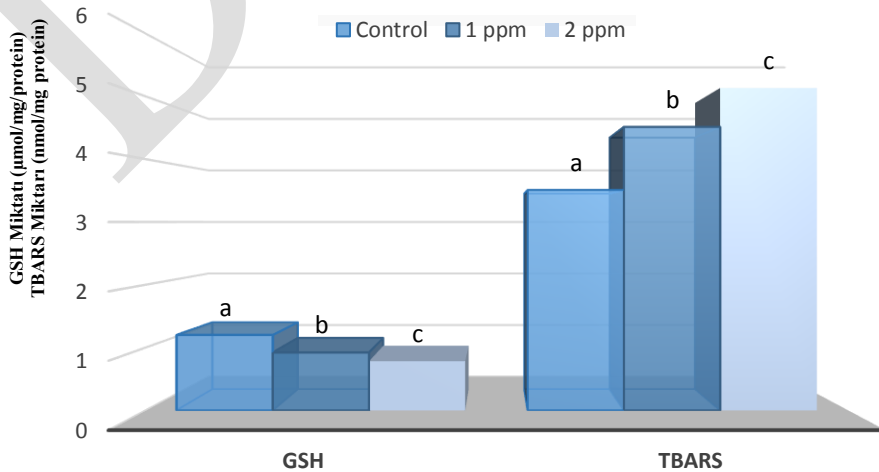
Deneylerde 40x40x40 cm boyutlarında 3 cam akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumların her birine 50L su ve 6 adet balık konmuştur. Akvaryumlardan birincisi CHL'nin 1.0 mg/L ve ikincisi CHL'nin 2.0 mg/L derişimlerinin etkisine 96 saat süreyle bırakılmışlardır. Üçüncü akvaryum ise kontrol olarak kullanılmıştır. Deney süresi sonunda her gruptan 6 balık çıkarılarak dekapitasyon yöntemiyle öldürülen balıklardan solungaç dokuları dissekte edilmiştir. Dokular % 0.59 NaCl oranında fizyolojik tuz çözeltisi ile yıkandıktan sonra biyokimyasal analizler yapılanaya kadar -80 °C'ye kaldırılmıştır. Solungaç dokusu %1.17 KCl içeren pH 7.4, 0.1M sodyum-fosfat tamponunda, 1/10 (w/v) oranında seyreltilerek 4 dk homojenize edilmiştir. Homojenatların +4 °C'de 16000 rpm'de 20 dakika santrifüjünden sonra elde edilen süpernatant ile Protein miktarı (Bradford, 1976), GSH (Beutler, 1975) ve TBARS (Ohkawa ve ark., 1979) miktarları spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizler SPSS 22.0 programında "Oneway ANOVA- Duncan" testi kullanılarak p<0.05 önem derecesinde belirlenmiştir (Kinnear ve Gray, 1995).

## BULGULAR

Çalışmada denenen her iki ortam derişimi ve 96 saatlik etki süresinde ölüm gözlenmemiştir. Araştırmada *O. niloticus* CHL'nin 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L derişimlerinde 96 saatlik sürelerle solungaç dokusunda GSH ve TBARS miktarlarında oluşan değişimler belirlenmiştir.

GSH miktarı, CHL etkisinde 96 saat süre sonunda 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L derişimlerinde kontrole göre sırasıyla %23 ve %34 oranında azalma göstermiştir. Bu azalma istatistiksel olarak önemlidir (Şekil 1; p<0.05). TBARS miktarı, CHL etkisinde 96 saat süre sonunda 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L derişimlerinde kontrole göre sırasıyla %28 ve %46 oranında artış göstermiştir. Bu artışlar istatistiksel olarak önemlidir (Şekil 1; p<0.05).



Şekil 1. *O. niloticus* solungaç dokusunda CHL'nin 1.0 mg/L ve 2.0 mg/L derişimlerinde 96 saatlik sürelerle GSH ve TBARS düzeyleri

## TARTIŞMA

Biyokimyasal indikatörler çevre kirliliği sonucu canlılarda oluşan toksik etkinin değerlendirilmesinde moleküler ve ya hücresel düzeyde oluşabilecek yanıtı göstermektedirler. Glutasyon, bir tek sistein kalıntısı olan bir tripeptid enzimatik olmayan antioksidandır ve antioksidan savunmasının ve detoksifikasyonun önemli bir yolunu oluşturur Bu araştırmada denenen her iki ortam derişiminde de *O. niloticus*'un solungaç GSH düzeyleri artış göstermiştir. CHL'nin *Labeo rohita* solungaç, karaciğer, böbrek ve kas dokularında sublethal konsantrasyonlar etkisinde 15 ve 30 günlük sürelerde, TBARS miktarıyla birlikte GSH bağımlı enzimler olan GST (Glutasyon-S-transferaz), GPx (Glutasyon peroksidaz) ve diğer antioksidant sistem enzimleri SOD (süperoksit dismutaz)ve CAT (katalaz) enzim aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Enzim aktivitelerinde oluşan bu değişiklik, aşırı miktarda üretilen ROS'un nötralize edilememesi ve antioksidant enzimlerinin yetersiz kalması sonucu *L. rohita* dokularında CHL'nin etkisinde oksidatif stres sonucu oluştuğunu göstermektedir (Bantu ve ark., 2013). TBARS miktarındaki artış çevre kirliliğinin izlenebilmesinde ve pestisit kirliliğinin belirlenmesinde kullanılabilir önemli bir parametredir. TBARS miktarında oluşan artış hücresel düzeyde toksik etkinin antioksidant enzimlerince giderilemediğini ve hücre membran yapısında bulunan lipid yapılarının ROS etkilerine karşı savunmasız kalarak lipid peroksidasyonunu indükleyerek, hücre bütünlüğünün kaybolmasına ve apoptozis oluşumuna neden olmaktadır (Verma ve ark., 2007; Tabassum ve ark., 2016; Temiz, 2019). Fungisit propiconazole subakut dozlarına 7 ve 28 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda GSH ve TBARS miktarlarında değişiklikler belirlenmiştir. GSH miktarında 28. günde azalış karaciğer antioksidan sisteminin yetersiz kalması sonucunda olduğu, ayrıca lipid peroksidasyonunun artışı TBARS miktarında oluşan değişimler ile gösterilmiştir (Temiz, 2019). Çalışmamızda, subletal CHL derişimlerinin etkisinde *O. niloticus* solungaç dokusunda 96 saat uygulamada konsantrasyona bağlı oksidatif stres yönünde değişimler meydana gelmiştir. Bu çalışmada GSH miktarının azalması ve TBARS miktarının artışı solungaç dokusunda oksidatif hasarın oluştuğunu ve antioksidan sistemin yetersiz kaldığını göstermektedir. oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir

## KAYNAKLAR

- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*. 27, 673-679.
- Bantu N, Vakita VR, Karra S 2013. Effect of Chlorantraniliprole on Biochemical and Certain Biomarkers in Various Tissues of Freshwater Fish *Labeo rohita* (Hamilton). *Environment and Ecology Research* 1(4): 205-215.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Beutler E 1975. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune and Stratton, New York, London, 67-69.
- Cogun HY, Firidin GG, Aytakin T, Firat O, Firat O, Temiz O, Varkal HS, Kargin F 2017. Acute toxicity of nitrite on some biochemical, hematological and antioxidant parameters in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L, 1758). *Fresen. Environ. Bull.* 26, 1712-1719.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ 2009. Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment- forensic applications of environmental data, Part 2: Pharmaceuticals as chemical markers of faecal water contamination. *Environ.Pollut*,157;1778-1786.
- Kinney PR, Gray CD 1995. SPSS for Windows Made Simple. Lawrence Erlbaum Associates, East Sussex, UK, 275s.
- Li ZH, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Randak T 2010. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 197-203.
- Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Chemistry*, 95, 351-358.
- Papa S, Bartoli G, Alvarez-Romero M, Barbato G, Vitale A, Ferrante C, Fioretto A 2017. Trace metals accumulation and their translocation in *Phragmites australis* (cav.) Collected along the sarno river. *Fresen. Environ. Bull.* 26, 467-474.
- Rathnamma VV, Nagaraju B 2014. Oxidative Stress Induced by Chlorantraniliprole in Various Tissues of Freshwater Fish *Ctenopharyngodon idella*. *Medical Sciences and Public Health*, Vol. 2(1), 21-27.
- Selby TP, Lahm GP, Stevenson TM, Hughes KA, Cordova D, Annan IB, Barry JD, Benner E A, Currie MJ, Pahutski TF 2013. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine

- receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 6341–6345.
- Sturve J, Almroth BC, Forlin L 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 446-452.
- Tabassum H, Dawood AQ, Sharma P, Khan J, Raisuddin S, Parvez S 2016. Multi-organ toxicological impact of fungicide propiconazole on biochemical and histological profile of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Ecological Indicators*, 63, 359-365.
- Taher M, Javani M, Beyaz R, Yildiz M 2017. A new environmental friendly production method in sunflower for high seed and crude oil yields. *Fresen. Environ.Bull.* 26, 4004-4010.
- Temiz O, Kargin F 2019. Effect of emamectin benzoate on AChE activity in brain, liver and kidney tissue in *Oreochromis niloticus*. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(1), 34-38.
- Temiz O 2019. Effects of fungicide propiconazole on oxidative stress parameters and antioxidant system enzymes in liver of *Oreochromis niloticus*. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(1), 43-47.
- Temiz O, Cogun HY, Kargin F 2018. Influence of Chlorantraniliprole toxicity on ionic regulation of gill and muscle Atpase activity of Nile fish (*Oreochromis niloticus*). *Fresenius Environmental Bulletin* 27 (7), 5027-5032 p.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13, 57-149.
- Verma RS, Mhta A, Srivastava N 2007. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pest Biochem Physiol*, 88, 191-196.



## **H2- reseptör antogonisterinden famotidin, nizatidin ve raniditin hidrolitik, oksidatif, termal ve fotolitik stres koşulları altında bozunma davranışının HPLC ile değerlendirilmesi**

Bediha Akmeşe

Hitit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çorum, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: bedihaakmese@hitit.edu.tr

### **Özet**

İlaçlarda zorunlu bozunma çalışmaları, kirlilik profilini ve çeşitli stres koşulları altında ilaç maddesinin davranışını verir. Bozunma ürünleri terapötik etkinliği bozabilir ve hastalarda toksik veya beklenmedik ciddi yan etkilere neden olabilir. Bu çalışmada; gastro-özofageal, reflü, mide ve onikiparmak bağırsağı ülseri tedavilerinde kullanılan H2-reseptör antogonisterinden famotidin, nizatidin ve raniditin çeşitli stres koşulları altında bozunma davranışları incelenmiştir. Bu ilaçlar hidrolitik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullara maruz bırakılarak, gösterdikleri davranışlar kromatografik olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** H2-reseptör antagonist, Famotidin, Nizatidin, Raniditin, HPLC, Bozunma çalışmaları

### **Assessment of the degradation behavior of H2-receptor antagonists; famotidine, nizatidine and ranididine under hydrolytic, oxidative, photolytic and thermal stress conditions by HPLC**

### **Abstract**

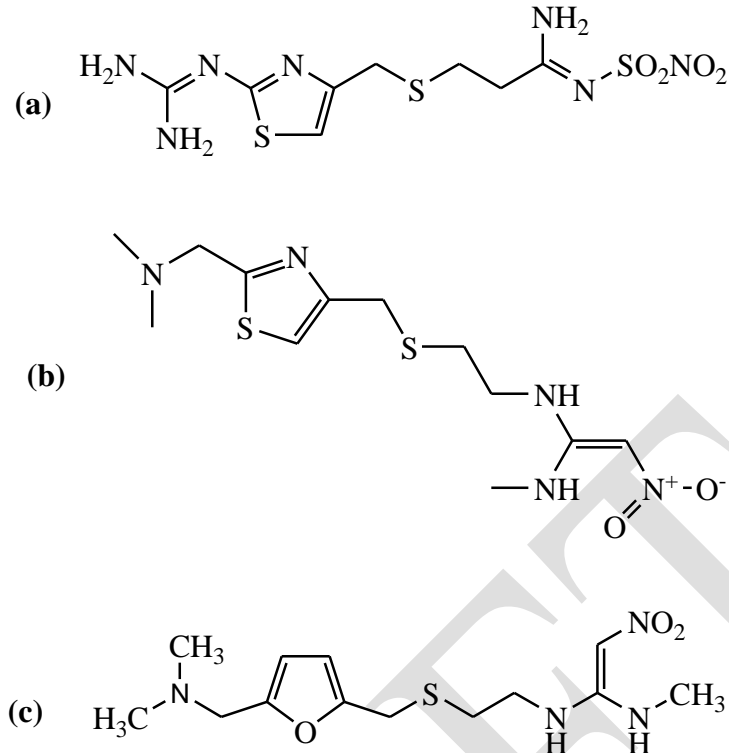
Forced degradation studies in drugs give the impurity profile and the behavior of the drug under various stress conditions. The degradation products may compromise therapeutic efficacy and cause toxic or unexpected severe side effects in patients. In this study; degradation behaviors of famotidine, nizatidine and ranididine from the H2-receptor antagonists used in the treatment of gastro-esophageal, reflux, gastric and duodenum ulcer under various stress conditions were investigated. These drugs were subjected to hydrolytic, oxidative, thermal and photolytic conditions and their behavior was determined by chromatography.

**Keywords:** H2-receptor antagonist, Famotidine, Nizatidine, Ranididine, HPLC, Degradation studies

### **GİRİŞ**

Histamin H<sub>2</sub> -reseptör antagonistleri peptik ülser, peptik özofajit, üst gastrointestinal sistem kanaması ve Zollinger-Ellison Sendromunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Freston, 1982). Simetidin, raniditin, famotidin ve nizatidin gibi ilaçlar bu gruptandır. Histamin, mideyi daha asidik hale getiren hidrojen iyonlarının salınmasını sağlar. H<sub>2</sub>-reseptör antagonistleri mide içindeki asit üretimini, histaminin etkinliğini durdurarak sadece kısmi olarak bloke ederler. Bu nedenle, reflü hastalığında proton pompa inhibitöründen daha az etkilidirler.

Famotidin, peptik ülserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir histamin H<sub>2</sub>-reseptör antagonistidir. Nizatidin, midedeki asit salgısını 12 saate kadar uzayan süreler boyunca inhibe eder. Raniditin mide asit üretimi inhibe eden bir histamin H<sub>2</sub>-reseptör antagonistidir. Genellikle peptik ülser hastalığı (puding) ve gastroözofageal reflü hastalığı tedavisinde kullanılır (Akmeşe ve ark., 2015).



Şekil 1. Çalışılan bileşiklerin kimyasal yapısı (a): famotidin, (b): nizatidin, (c): ranitidin

İlaç maddesinin veya ilaç ürününün stabilitesi; ilacın saflığı, potansiyeli ve güvenliğini etkileyen kritik bir parametredir. Zorunlu bozunma çalışmaları, kirlilik profilini ve çeşitli stres koşulları altında ilaç maddesinin davranışını verir. Mevcut araştırma, Uluslararası Uyum Konferansı (ICH) yönergelerine göre ilaç maddesi üzerinde asit, baz, termal ve UV ışık stabilite dahil tüm bozunma çalışmaları ile ilgilidir (Guvvala ve ark., 2019; ICH, 2000). ICH yönergeleri, sadece ilaç moleküllerinin stabilitesini sağlamak için değil aynı zamanda bozunma ürünlerini tanımlamak için doğal stabilite özelliklerini belirlemek için bozunma çalışmalarının bileşikler üzerinde yapıldığını göstermektedir.

Zaman içinde çeşitli çevresel faktörlerin etkisi altında famotidin, nizatidin ve ranitidinin depolama koşullarında yapılan değişiklikler de büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, bozunma ürünleri terapötik etkinliği bozabilir ve yatan hastalarda toksik veya beklenmedik ciddi yan etkilere neden olabilir.

Bu çalışma, asit ve baz, termal, oksidasyon ve UV ışık koşulları altında sulu çözeltilerde famotidin, nizatidin ve ranitidinin bozunması incelenmiştir. Bu çalışma, bu maddelerin kimyasal stabilitesinin sağlanması ve uygun saklama koşulları için uygun formülasyon ve taramanın geliştirilmesi için değerli olacaktır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, bu bileşiklerin, kararlılık çalışması ve bozunma ürünlerinin tanımlanması hakkında hiçbir rapora rastlanmamıştır.

## MATERYAL VE METOD

### Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta ve çözücüler HPLC saflıktadır. Kullanılan referans maddeler, famotidin ve ranitidin Deva İlaç, nizatidin ise Actavis İlaç Firmasından temin edilmiştir. Asetonitril (HPLC saflıkta) ve metanol (HPLC saflıkta) Merck (Merck, Darmstadt, Germany) marka kullanılmıştır. Sodyum hidroksit Merck (Merck, Darmstadt, Germany), orto-fosforik asit Riedel-De Haen (Riedel-De Haen, Germany), hidroklorik asit (% 37, d: 1,19 g mL<sup>-1</sup>) ve hidrojen peroksit (% 35, d: 1,13 g mL<sup>-1</sup>) Riedel-de Haen (Seelze, Germany) temin edilmiştir.

Çalışma, Shimadzu HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (SCL 10 A VP), pompa (LC10 ADVP), dedektör (SPD 10A VP UV-Visible) ve gaz giderme birimi (D GU 14 A) bulunmaktadır. HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde, kombine cam elektrot (Metleer Toledo MA 235 pH metre, Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrot) kullanılmıştır. Ultra saf su cihazı, Human Corp. Zeneer Power I marka kullanılmıştır.

Çalışmada kolon olarak X Terra RP C-18 (250 mm × 4,60 mm ID, 5 µm) kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C'dir. %10-6-84 asetonitril- metanol- su karışımı kullanılmış ve 20 mM orto-fosforik asit kullanılarak pH 6,5'a 1 mol L<sup>-1</sup> NaOH ile tamponlanarak ayarlanmıştır. Akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup>'dir (Akmeşe ve ark., 2015).

### Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Çalışılan ilaçların stok çözeltileri (200 mg L<sup>-1</sup>) saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 2 mol L<sup>-1</sup> HCl, 2 mol L<sup>-1</sup> NaOH ve % 6'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi saf suda çözülerek hazırlanmıştır. Bütün stok çözeltiler karanlıkta ve +4 °C'de buzdolabında bekletilmiştir.

### Bozunma Çalışmaları

#### Asit ile Bozunma

Asitte bozunma için, her bir ilacın son derişimi 100 mg L<sup>-1</sup> ve asit derişimi 1 mol L<sup>-1</sup> olacak şekilde stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. 75 °C'lik su banyosunda her bir bileşik yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra HPLC'de belirlenen koşullarda elde edilen pikler incelenmiştir.

#### Baz ile Bozunma

Baz ile bozunma için, her bir ilacın son derişimi 100 mg L<sup>-1</sup> ve baz derişimi 1 mol L<sup>-1</sup> olacak şekilde stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. 75 °C'lik su banyosunda her bir bileşik yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra HPLC'de belirlenen koşullarda elde edilen pikler incelenmiştir.

#### Peroksit ile Bozunma

Peroksit ile bozunma için, her bir ilacın son derişimi 100 mg L<sup>-1</sup> ve % 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimi olacak şekilde stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. 75 °C'lik su banyosunda her bir bileşik yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra HPLC'de belirlenen koşullarda elde edilen pikler incelenmiştir.

#### Termal Bozunma

Her bir ilaçtan 2,5 mg tartılmış, 100 °C'ye ayarlanmış etüvde 6 ve 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında derişimleri 100 mg L<sup>-1</sup> olacak şekilde seyreltilmeler yapılmıştır. Daha sonra HPLC'de belirlenen koşullarda elde edilen pikler incelenmiştir.

#### UV Işık ile Bozunma

Her bir ilaçtan 2,5 mg tartılmış, UV ışık altında 6 ve 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında derişimleri 100 mg L<sup>-1</sup> olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra HPLC'de belirlenen koşullarda elde edilen pikler incelenmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan stres testleri; ilaç maddesinin stabilitesini, bozunma yollarını ve olası bozunma ürünlerinin tanımlanmasına yardımcı olan kritik bir parametredir. Famoditin, nizatidin ve raniditin farklı bozunma koşullarındaki bozunma yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 1).

Famoditin için belirtilen stres koşulları altında bazik ve peroksit ortamında tamamen bozunduğu görülmektedir. Asidik ortamda maddenin yarısının bozunduğu gözlenmektedir. Isıya ve UV ışığa karşı dayanıklı olduğu saptanmıştır.

Nizatidin için belirtilen stres koşullarında peroksit ortamında tamamen, bazik ortamda ise büyük bir kısmının bozunduğu görülmüştür. Asidik ortama, ısıya ve UV ışığa dayanıklı olduğu saptanmıştır.

Raniditin için ise belirtilen stres koşullardan peroksit ortamında tamamen bozunduğu, bazik ortamda büyük bir kısmının bozunduğu görülmektedir. Asit ortamına, ısıya ve UV ışığa dayanıklı olduğu görülmektedir.

**Tablo 1.** İlaçların hidrolitik, oksidatif, termal ve fotolitik stres koşulları altında % bozunma sonuçları

Bozunma şartları	% Famoditin Bozunma	% Nizatidin Bozunma	% Raniditin Bozunma
HCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	49,22	0,21	0,05
NaOH (1 mol L <sup>-1</sup> )	98,07	89,79	78,54
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% 3)	100	100	100
Termal (6 saat)	3,37	1,36	0,09
Termal (24 saat)	5,83	5,14	0,46
UV (6 saat)	2,61	0,58	3,67
UV (24 saat)	15,66	2,05	15,15

Famoditin, nizatidin ve raniditin için uygun saklama koşullarının araştırılması için pH, sıcaklık, oksidasyon ve fotolitik etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu çalışmada, famoditin, nizatidin ve raniditin bozunma ürünleri, ICH tarafından önerilen çeşitli stres bozunma koşullarına tabi tutulmasıyla analiz edilmiştir. Bu üç madde için bazik ve peroksit ortamında bozunmanın meydana geldiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma, ICH kılavuz ilkelerinin önerileri doğrultusunda oluşturulan kararsızlıkların belirlenmesi için yol göstericidir. Bozunma sonucu elde edilen bilgiler, bu maddelerin stabilitesi için yardımcı olacak ve klinik uygulamalarının daha ileri çalışmaları için kolaylık sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Akmeşe, B., Altun, Y., Şanlı, S., Şanlı, N. 2015. RP-LC Determination of Dissociation Constants and Quantitative Estimation of Antiulcer drugs, Famotidine, Nizatidine and Ranitidine in their Dosage Forms. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 2015, 43 (3), 159–166.
- Freston JW 1982. Cimetidine. I. Developments, pharmacology, and efficacy. Annals of Internal Medicine, 97 (4), 573-580.
- Guvvala, V., Subramanian, V.C., Anireddy, J.S. 2019. A study on structural characterization of degradation products of cangrelor using LC/QTOF/MS/MS and NMR. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 170, 327-334.
- ICH, 2000. Stability Testing of New Drug Substances and Products (Q1AR) International Conference on Harmonization ICH, Geneva.

## Screening of petroleum degrading *Bacillus* sp. strains and the bacterial degradation of synthetic detergents in wastewater

Tuba Sevgi, Elif Demirkan\*, Meriç Şeyma Tiryaki

Bursa Uludag University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Bursa, Turkey

\*Corresponding author e-mail: edemirkan@uludag.edu.tr

### Abstract

Detergent is a product of cream, powder and liquid which has the cleaning treatment property formed by the combination of petroleum-derived substances. The worldwide manufacture of synthetic detergents has increased from the 1949 level of 30,000 tons to an estimated 1.5 to 2 million tons per year. The increase in consumption of detergents and its derivatives are the origin of a type of pollution which most significant impact is the formation of toxicity in rivers, lakes, and plants. The aim of this study was to screen of petroleum degrading *Bacillus* sp. strains from different non-contaminated soil samples and to investigate the potential for biodegradation of detergents in wastewaters. 10 out of 100 bacteria were found to be potent, and the best degrading strain was identified as *Bacillus cereus* owing to its 100 % similarity in the 16S rRNA gene sequence. This bacteria was inoculated in Bushnell Haas (BH) medium with different concentrations detergents (0,1%, 0,5%, 1%) such as powder, liquid and solid. After 15 days of incubation period, it was determined bacterial growth (OD<sub>600</sub>) and phosphorus analysis was performed spectrophotometrically using phosphorus test kit. Among of detergents, the highest inorganic phosphorus content were determined in 1% concentration of solid soap and powder detergent. Bacterial growth showed that bacteria was used petroleum-derived detergents as carbon source. In the phosphorus analyzes, it was found that the amount of phosphorus increased. This showed that the detergents are biodegradable. Then, the phosphorus-containing solution was applied to the potted ornamental plants and it was observed that it helped the plant to develop. The data obtained from the study show that the *Bacillus cereus* strain transforms the detergent contaminated domestic wastewater into a form of phosphorus which has potential of phosphorus source for plants.

**Keywords:** biodegradation, detergent, *Bacillus cereus*, phosphorus.

### INTRODUCTION

A detergent is a product, with the formulation of surface-active agents and subsidiary constituents (builders, boosters, fillers and auxiliaries). Surfactants are the components mainly responsible for the cleaning action of detergents. In commercial detergents, the surfactant component is between 10 and 20% while the other components include bleach, filler, foam stabilizer, builders, perfume, soil-suspending agents, enzymes, dyes, optical brighteners and other materials designed to enhance the cleaning action of the surfactants. The use of cleaning products in the world dates back to 15th century. The first scientific soap production was made in the 18th century (Roque, 2015). With the beginning of the industrial revolution in the 19th century, soap and detergent production became an industrial sector and continued until today. The worldwide manufacture of synthetic detergents has increased from the 1949 level of 30,000 tons to an estimated 1.5 to 2 million tons per year (De Wolf et al., 1998). The failure of this increase in synthetic detergent manufacture and usage cause a parallel increase in the detectable levels of waste detergent accumulating in various aquatic ecosystems. (Ojo et al, 2013)

Approximately 50% of the phosphorus in domestic wastewater comes from the phosphate which locates in the structure of detergents. Giving the domestic waste water to sea or river without purification leads excessive phosphorus accumulation and therefore eutrophication and extreme algae reproduction (Çakır and Minareci, 2015). Especially in recent years, the algae growth in the Sea of Marmara has been formed as a result of eutrophication that disrupts the ecosystem such as red-tide (İstanbul Büyükşehir Belediyesi, 2009).

There is a need to recycle domestic wastewater which was contaminated with detergents and utilize in different areas without giving to nature. For this purpose, in this study it was aimed to transform the detergent-based complexing tripolyphosphate into the inorganic phosphorus form by bacterial biodegradation which plants can use for their growth and development.

## MATERIALS AND METHODS

### Screening of bacteria

*Bacillus* sp. strains, which were isolated from different non-contaminated soil samples in our previous study, were screened to investigate the potential for biodegradation of detergents in wastewaters. Precultured *Bacillus* sp. strains were streaked on BH agar medium. After 1 day of incubation period, as a carbon source, gasoline 3.5% and diesel 7% was sprayed on agar plates. Plates was allowed to incubate at 37°C for 15 days and as a result of incubation, bacteria that could grow on petri dishes were considered as petroleum and potential detergent degraders (Atlas and Richard 1946). *Bacillus* sp. strains were stored at + 4 ° C for further studies.

### Identification of bacteria

For bacterial identification, genomic DNA was extracted from the best potent strain using the Qiagen Blood & Tissue kit (Qbiogene, Montreal, PQ, Canada) according to the manufacturer's protocol. The 16S rRNA gene amplification was performed using the universal primers, 27F : 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and 1492R : 5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3'. The amplified sequences were determined by an automated ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). The resulting sequences were compared with the GenBank database (NCBI) using BLAST (Altschul et al., 1990) The 16S rRNA gene sequence of strain EBD 9-1 was aligned with those of *Bacillus* species by using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). By using MEGA 6.0 software (Tamura et al., 2007).

### Medium and growth conditions

Bushnell Haas (BH) medium (g/L) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 g, FeCl<sub>3</sub> 0.5 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g (pH 7.0) contaminated with different concentrations powder, liquid and solid detergents (0,1%, 0,5%, 1%) was used for bacterial production (Bushnell and Haas, 1941). Medium was autoclaved at 120 ° C for 20 min. The precultures were cultivated in LB medium (g/L) yeast extract 5; peptone 10; NaCl 20 for 18h. Then, overnight cultures with OD<sub>600</sub>: 0.3 were inoculated at 1% in bacteria production medium (150 ml in 500 ml erlenmeyer flasks). At the end of incubation period of 15 days at 150 rpm and 37± 2°C, 150 rpm bacterial growth was measured spectrophotometrically.

### Determination of bacterial growth

Bacterial growth was monitored by measuring the turbidity (OD<sub>600</sub>) using a spectrophotometer (Beckman Coulter DU 730 UV-VIS). After determination of bacterial growth bacterial cells were harvested by centrifugation at 5,000 r/min for 10 min and then supernatant was used for phosphorus analysis.

### Phosphorus analysis

The BH medium contaminated with detergents before bacterial incubation and at the end of 15 days of incubation period samples were analyzed with orthophosphate kit (Nanocolor ortho-phosphat 91878-Macherey-Nagel) and total phosphorus content was measured.

## RESULTS

### Screening of *Bacillus* sp. having degradation activity

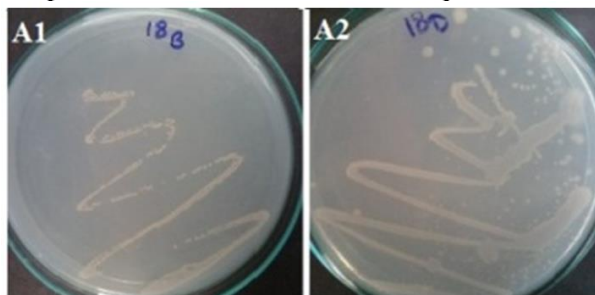
Among 100 *Bacillus* sp. strains isolated from our previous study, 10 *Bacillus* sp strains were determined as petroleum degrader *Bacillus* sp. strains. Most of these strains showed more degradation in diesel than petrol sprayed medium. Out of the preselected 10 isolates, 1 isolate showed the highest growth and determined as the best petroleum degrader.

**Table 1.** Petroleum and diesel degrading *Bacillus* sp. strains

Strain	Petroleum	Diesel
S1	++	+++
S21	++	+++
S30	++	+
S4	+	++
S52	+	+
S18	+++	++++
S75	++	++
S8	+	++
S92	++	+++
S90	-	++

### Identification of the potent *Bacillus* sp.

16S rRNA gene sequence of the potent strain S6 showed 100% sequence identity with *Bacillus cereus*.



**Figure 1.** Diesel and petroleum degrading bacteria S6 on BH agar plates.. A1- 18 (Petroleum) , A2-18 (Diesel).

### Degradation ability of different detergents

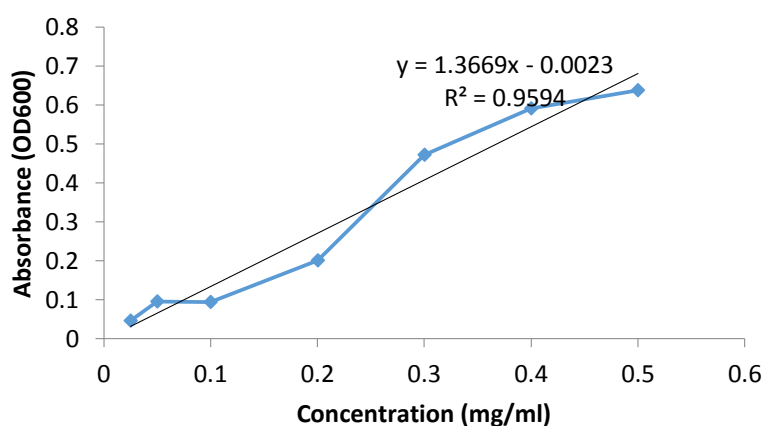
Bacterial growth showed that bacteria was able to utilize petroleum-derived detergents as carbon source. The increasing concentration of detergents induced bacterial growth in the detergents of powder and liquid while the lower concentrations of solid had considerably high growth pattern than the others (Table 2).

**Table 2** *Bacillus cereus* türünün deterjan tükettikten sonraki OD değerleri (600 nm)

Detergent	Concentration	Growth
Powder	1	0,271
	0.5	0.163
	0.1	0.061
Liquid	1	0.161
	0.5	0.120
	0.1	0.076
Solid	1	0.319
	0.5	0.615
	0.1	1.198

### Evaluation of Phosphorous Analysis

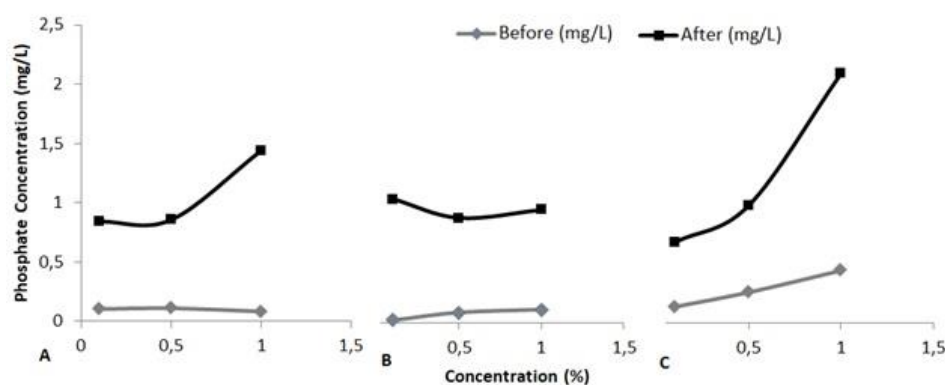
Among of detergents, the highest inorganic phosphorus content were determined in 1% concentration of solid soap and powder detergent. The increase in phosphorus amount indicates that petroleum degrader *Bacillus cereus* is also able to degrade all three kinds of detergents.



**Figure 1.** Standard reference curve for phosphorous analysis

**Table 3.** Ortho-phosphate concentrations before and after the biodegradation by *B. cereus*.

Detergent	Concentration	Before	After
Solid	0,1	0,105	0,843
	0,5	0,111	0,857
	1	0,084	1,441
Liquid	0,1	0,024	1,036
	0,5	0,089	0,878
	1	0,113	0,945
Powder	0,1	0,137	0,682
	0,5	0,259	0,991
	1	0,442	2,102



**Figure 2.** Ortho-phosphate concentrations before and after the biodegradation by *B. cereus* (A. Solid, B. Liquid, C. Powder).

#### Application to Potted Plants

After remediation of PS medium which was contaminated with different form of detergents were applied to potted plants and the highest inorganic phosphorus containing detergent solutions (1% solid soap and powder detergent) helped them to develop. The height and stem diameter of plants were increased after 3 months of the application.

#### DISCUSSION

Phosphorus is one of the most important macro nutrients which increases the yield and quality of plants (Kara and Telli, 2016). The plants take phosphorus as primary orthophosphate ion ( $H_2PO_4^-$ ) from acid-reactive soils and secondary orthophosphate ion ( $HPO_4^{2-}$ ) from alkaline reactive soils (Bilen and Sezen, 1993). Most synthetic detergents contain large quantities of polyphosphate as cheap filler and binder. Synthetic detergents contain about 12-13% phosphorus or more than 50% polyphosphate in their structures (Yildiz Technical University, 2017). Plants can not use phosphorus as Polyphosphate form as a source but can use in inorganic form (Aydin, 2011).

In this study the highest bacterial growth and the highest inorganic phosphorus content were determined with 1% concentration solid soap and powder detergent. The increase in bacterial growth in increasing concentrations of detergents indicate that the bacteria can use and consume petroleum-derived detergents as a carbon source. It is observed that OD values are directly proportional with the growth of bacteria. A similar increase in liquid detergent concentrations and bacterial activity were observed with powder detergent.

Applications of the highest phosphorus containing solutions to the potted plants, the plant growth of all were positively affected. This study supports the idea of the presence of large amounts of detergent induced the *Bacillus cereus* to remediate the contaminated PS mediums and rational phosphorous release to the the cultivation medium. Therefore phosphorous rich medium showed positive effect on plant growth.

The data obtained from this study shows that the *Bacillus cereus* strain transforms the detergent in domestic wastewater into a form of phosphorus that can be used by plants by biodegradation. This confirms our hypothesis in our study. The data indicates that the biodegradation product can be used as a source. In this way, the availability of domestic wastewater as a raw material will support the economy without utilizing natural water resources.

#### CONCLUSION



The biodegradation product obtained as a result of our study was found as a source of phosphorus in plant breeding. The data obtained in our study can be used as a preliminary study for the progressive projects. Future studies should be carried out to produce plant nutrition products enriched with nitrogen and other minerals and supports further plant development.

## REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-10.
- Atlas, MR ve Richard, B. 1946. Microbiology ecology, fundamentals and application, *Microbiol. Interaction Xenobiotic Inorganic Pollut.*, 13(511), 517-529.
- Aydın M 2011. Selçuk Üniversitesi – Bitki Besleme Ders Notları. Konya
- Bilen S, Sezen Y 1993, Toprak Reaksiyonunun Bitki Besin Elementleri Elverişliliği Üzerine Etkisi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 24 (2), 156- 166.
- Çakır M, Minareci O 2015. Işıklı gölü ve ışıklı çayı’ nda (Çivril – Denizli) deterjan, fosfat ve bor kirliliğinin araştırılması. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 30-1 : 23-34
- de Wolf W, Feijtel T 1998. Terrestrial risk assessment for linear alkyl benzene sulfonate (LAS) in sludge-amended soils. *Chemosphere*, 36(6), 1319-1343.
- İstanbul Büyükşehir Belediyesi 2009. Projem İstanbul Araştırma Projesi 2009. İstanbul
- Kara B, Telli M 2016. Karabuğdayın (*Fagopyrum esculentum Moench*) fosfor kullanım etkinliği. *Derim* 2016, 33(2), 327-336.
- Ojo OA., Oso BA 2009. Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 8(6).
- Roque G. 2014. Chevreul, Michel-Eugène. *Encyclopedia of Color Science and Technology*, 1-7.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007 MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-9.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc Acids Res* ; 22:4673–80.
- Yıldız Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü, Çevre Kimyası 2  
Laboratuvarı , Atıksularda Fosfor İçeriği Tayini Erişim Tarihi: 30.30.05.2019  
<http://www.yildiz.edu.tr/~filhan/Fosfor.pdf>

## Subkritik Su Kullanımıyla Üzüm Çekirdeklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Şeydanur ADAR<sup>1\*</sup>, Kübra ŞİŞLİOĞLU<sup>1</sup>, Veyis SELEN<sup>1</sup>, M. Şaban TANYILDIZI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: [seydanur.adar@gmail.com](mailto:seydanur.adar@gmail.com)

### Özet

Dünyadaki en önemli tarımsal faaliyetlerden biri olan şarap üretimi beraberinde, kabuklar ve çekirdekler dâhil olmak üzere oldukça önemli miktarlarda üzüm katı atıkları oluşturmaktadır. Şarap endüstrisi atıklarının yaklaşık %15'ini oluşturan üzüm çekirdekleri ise biyoaktif bileşikler, özellikle fenolikler, açısından oldukça zengindir. Gıda ve ilaç endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda kullanılan antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanserijen aktivite gösteren fenolik bileşiklerin geri kazanımı açısından ekstraksiyon kritik bir basamaktır. Ekstraksiyon için organik çözücülerin kullanıldığı birçok yöntem bulunmasına karşın organik çözücülerin pahalı olması, insan sağlığı ve çevre açısından toksik etkilerinin olması birer dezavantajdır. Bu durumu elimine etmek ve yeşil kimya prensiplerine dayalı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek amacıyla, yapılan bu çalışmada yüksek verimli ve çevre dostu bir yöntem olan subkritik su ekstraksiyonu (SSE) yöntemi kullanılmıştır. SSE yöntemi ile şarap fabrikası atığı olan Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak ekstraksiyon prosesi üzerinde etkin olan parametreler incelenmiştir. Modelleme çalışmalarında CYY'lerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) kullanılmıştır. MKD'de bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (65 – 200 °C), su akış hızı (1 – 4 ml/dk) ve partikül boyutu (-8+16, -16+30 ve -30+50 mesh) belirlenmiş ve toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içerikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstraktlarda spektrofotometrik olarak toplam fenol ve toplam flavonoid madde analizleri yapılmıştır. Varyans analizine (ANOVA) göre yüksek regresyon katsayısı değerleri, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri için sırasıyla  $R^2 = 0.956$  ve  $R^2 = 0.962$  olarak elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Cevap Yüzey Metodu, Fenolik ve Flavonoid Maddeler, Öküzgözü Üzüm Çekirdeği, Subkritik Ekstraksiyon Su, Şarap Endüstrisi Atığı.

### Extraction of phenolic compounds from grape seeds using subcritical water

#### Abstract

A substantial amount of solid waste such as skins and seeds of grapes is generated during the wine production which is one of the most important agricultural activity around the world. Grape seeds which comprise around 15 % of the wine industry waste, are quite rich in bioactive compounds, especially in phenols. Extraction is a critical step for the recovery of phenolic compounds that are active as an antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic which are used particularly both in food and pharmaceutical industry. There are several methods for extraction of phenolic compounds that includes organic solvent usage, however, certain disadvantages of these solvents are toxicity of solvents to the environment and the human body, and not being inexpensive. This research study is conducted on the employment of the Subcritical Water Extraction (SWE) method both to eliminate the disadvantages of other methods and to extraction based on green chemistry principles. The parameters which are effective on the extraction of phenolic compounds from Öküzgözü grape seeds, solid waste of wine industry waste, are investigated by using the Response Surface Method (RSM). Central Composite Design (CCD), a useful method in RSM, is employed in modeling studies. Temperature (65 – 200 °C), water flow rate (1 – 4 ml/min) and particle size (-8+16, -16+30 and -30+50 mesh) were determined as independent variables of CCD and their effects on total phenolic and total flavonoid contents were evaluated accordingly. In the experimental section, the total amount of phenolic and flavonoid compounds of the extracts, obtained from the SWE process, were analyzed with spectrophotometric methods. According to the variance analysis (ANOVA), a high regression coefficient values were obtained as  $R^2 = 0.956$  and  $R^2 = 0.962$  for the total phenolic and the total flavonoid contents, respectively.

**Keywords:** Flavonoid and Phenolic Compounds, Öküzgözü Grape Seed, Response Surface Methodology, Subcritical Water Extraction, Winery Wastes.

## GİRİŞ

Dünya üzerinde üretilen en büyük meyve mahsullerinden birisi olan üzüm (*Vitis vinifera*), 2016 verilerine göre yaklaşık 74.5 milyon tonluk üretim hacmine sahiptir (Akın, 2018). Üzümlerin ağırlıkça yaklaşık %25'i kuru maddeden oluşurken bu kuru maddenin ağırlıkça yaklaşık %38'ini ise üzüm çekirdeği oluşturmaktadır (Wen ve ark., 2016). Üzümün şarap endüstrisinde kullanımı oldukça yaygın olmakla beraber üretilen toplam üzüm miktarının yaklaşık %80'i bu endüstride değerlendirilmektedir (Demirtaş ve ark., 2013). Şarap endüstrisinde 10 milyonlarca ton üzüm posası yan ürün olarak açığa çıkmaktadır. Şarap prosesleri sırasında ortaya çıkan yan ürünlerin, üzüm kabukları ve çekirdeklerinin, zengin polifenol kaynakları olduğu bilinmektedir (Sevindik ve Selli, 2016).

Türkiye ise üzüm üretiminde 6. sırada yer almaktadır. 2018 yılı verilerine göre yaklaşık 4 milyon ton üzüm elde edilmiştir (Anonim, 2019). Türkiye'de şarap üretiminde kullanılan yirmi ikisi yerli üretim olmak üzere yaklaşık 133 farklı üzüm çeşidi bulunmaktadır (Yemiş ve ark., 2008). Bunlardan birisi olan Öküzgözü üzümü, Denizli ve Elazığ yöresinde geniş çapta ekilmekte ve kırmızı şarap üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Kelebek ve ark., 2010).

Şaraplık üzümlerde doğal olarak bulunan ve/veya şarap yapımı sürecinde meydana gelen sekonder metabolitler olan birçok fenolik bileşik mevcuttur (Kelebek ve ark., 2010). Çekirdeklerde bulunan antioksidan fenolik bileşikler, üzümdeki toplam fenolik maddenin % 60-70'ini oluşturmaktadır. Üzüm çekirdeklerindeki fonksiyonel fenolik bileşikler monomerik flavan-3-ol, kateşin, epikateşin gibi flavonoidler, prosiyanidinler ve resveratrollerdir. Önemli bir fenolik olan resveratrol (3,5,40-trihidroksistilben), çoklu terapötik etkileri ve farmakolojik aktiviteleri olan polifenolik bir bileşiktir. (Tian ve ark., 2017 ; Yemiş ve ark., 2008). Bu bileşiklerin antioksidan, antimutejenik ve antikarsinojenik özelliklerinden dolayı insan sağlığını destekleyici bileşikler olduğu belirtilmektedir (Yünlü ve Kır, 2016).

Gıda ve ilaç endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda kullanılan fenolik bileşiklerin etkili bir şekilde, şarap endüstrisi katı atıklarından geri kazanılması için geliştirilmiş çok sayıda yöntem mevcuttur (Makris, 2018). Birçok ekstraksiyon yönteminde etil alkol, metil alkol, aseton, etil asetat gibi çözücüler ve bunların karışımları sıklıkla kullanılmaktadır fakat organik çözücülerin pahalı olması, insan sağlığı ve çevre açısından toksik etkilerinin olması birer dezavantajdır (Odabaş, 2013). Bu durumu elimine etmek için geliştirilen alternatif ekstraksiyon yöntemlerinden birisi de subkritik su ekstraksiyonu (SSE)'dir. SSE son zamanlarda çözücü olarak su kullanımıyla geliştirilen 'yeşil' bir ekstraksiyon yöntemidir (Yan ve ark., 2017). Ekstraksiyon, suyun 100-374 °C sıcaklıkta (374 °C ve 22 MPa basınç suyun kritik noktasıdır) ve sıvı bölgede kalacağı bir basınçta gerçekleştirilmektedir. Artan sıcaklıkla birlikte suyun dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) ve polaritesi azalmakta ve etanole benzer bir polarite göstermektedir. Suyun atmosferik basınçta ve oda sıcaklığında dielektrik sabiti 79 iken, 250 °C sıcaklık ve 5 bar basınçta dielektrik sabiti 27'ye inmektedir. Bu sayede polar karakterdeki bileşenleri çözebilme kapasitesine erişmektedir (Nakilcioğlu ve Ötleş, 2014; Yan ve ark., 2017). SSE yöntemi uygulaması kolay ve yüksek verimli, daha az zaman gerektiren, proses maliyetinin daha düşük olduğu ve atık ya da yan ürün oluşturmayan çevre dostu bir yöntem olduğundan kullanımı yaygınlaşan avantajlı bir ekstraksiyon yöntemidir (Liang, 2013 ; Kubatova, 2001).

Bu çalışmada yerel bir şarap fabrikası atığı olan Elazığ yöresine özgü Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden subkritik su ekstraksiyonu ile fenolik bileşiklerin eldesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon üzerinde etkili parametreleri incelemek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır. CYY'lerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) kullanılarak sıcaklık, su akış hızı ve partikül boyutu gibi parametrelerin incelenmesi ile modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

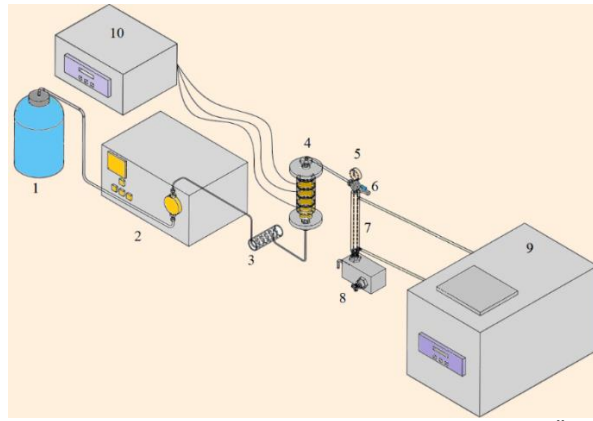
## MATERYAL VE METOD

### Materyal

Çalışmada kullanılan üzüm çekirdekleri, Elazığ yöresinde yetişen Öküzgözü üzüm çekirdekleri olup yerel bir şarap fabrikasından tane patlatma aşaması sonrasında temin edilmiştir. Alınan cibre içerisinde bulunan kabuk, sap gibi olası yabancı maddeler temizlenerek üzüm çekirdekleri atmosferik koşullarda kurutulmaya bırakılmıştır. Blender yardımıyla öğütülen üzüm çekirdekleri -8+16, -16+30 ve -30+50 mesh'lik fraksiyonlara elek yardımıyla ayrılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere ağız kapalı kaplarda -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Ekstraksiyon

Öğütülen üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonu Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde özel olarak tasarlanmış olan ekstraksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Su rezervuarı, HPLC pompası, ön ısıtıcı sistemi, ekstraksiyon hücresi, soğutma sistemi ve geri basınç valfinden oluşan sistem Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Subkritik su ekstraksiyonu sistemi (1. Su rezervuarı, 2. HPLC pompası, 3. Ön ısıtıcı, 4. Ekstraksiyon hücresi, 5. Basınç ölçer, 6. Emniyet valfi, 7. Geri soğutucu, 8. Geri basınç valfi, 9. Sirkülasyonlu su banyosu, 10. PID kontrolör).

Öğütülmüş örnek, her deneyde 15 gr olmak üzere ekstraksiyon hücresine yüklenmiştir. Çözücü olarak kullanılan ultra saf su, 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiş ve içerisindeki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmıştır. HPLC pompası ile ön ısıtıcıda 65-100 °C'ye ısıtılan su belirlenen akış hızlarında sisteme beslenmiştir. 25 ml'lik yıkama yapıldıktan sonra sistem sıcaklığı istenilen değere getirilerek geri basınç valfinden basınç 30-40 bar olarak ayarlanmıştır. Ekstraksiyon hücresi hacmi (50 ml)'nin üç katı olacak şekilde her bir deneyde 150 ml ekstrakt alınmıştır. Alınan ekstraktlar, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde analizleri için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### Deneysel Tasarım

Ekstraksiyon üzerinde etkili olan parametrelerin analizi ve optimizasyonu için Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır. Cevap Yüzey Yöntemlerinden (CYY) birisi olan ve en çok tercih edilen istatistiksel optimizasyon yöntemi Merkezi Kompozit Dizayn (MKD)'dir. Ardışık deneysel çalışmalar için çok uygun olan bu tasarım yönteminde  $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$  olarak adlandırılmak suretiyle bir faktörün 5 farklı seviyesi incelenmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmada MKD kullanılmıştır. MKD'de bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (yaklaşık 65-200 °C), su akış hızı (1-4 ml/dk) ve partikül boyutu (-8+16, -16+30 ve -30+50 mesh) belirlenmiş ve bu değişkenlerin etkileri MKD yöntemiyle tasarlanan deneylerle incelenmiştir. Ekstraksiyonda incelenen parametrelerin araştırıldığı aralıklar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden toplam fenolik ve toplam flavonoid madde için bağımsız değişkenler, deneysel değerleri ve MKD için seviyeleri.

Değişken	Faktör Tipi	Kod	Kodlu değerler ve değer aralıkları				
			$-\alpha$	- 1	0	+ 1	$+\alpha$
Sıcaklık ,°C	Nümerik	A	65.33	85.00	132.5	180.0	199.7
Su Akış Hızı, ml/dk	Nümerik	B	1	1.44	2.5	3.56	4
Partikül Boyutu, mesh	Kategorik	C		-8+16	-16+30	-30+50	

Belirlenen deneysel tasarıma göre yapılan deneylerde cevap değişkenleri olarak toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı değerleri takip edilmiştir. Elde edilen veriler Design Expert 10 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve ANOVA analizi yapılmıştır.

#### Analiz Yöntemleri

Ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstraktlarda spektrofotometrik (Shimadzu UV 1800) analizler olan toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı tayinleri yapılmıştır. Analizlerde üç paralel ile çalışılarak sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

#### Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ekstraksiyon sonrası toplam fenolik madde tayini, bazı modifikasyonlarla Folin-Ciocalteu metodu (Singleton ve Rossi, 1965) ile belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktlar saf su ile 100 kat seyreltilmiştir. 0,1 ml seyreltik ekstrakt üzerine 0,4 ml saf su ve 1:10 oranında seyreltilmiş 1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir.

Vortekslenerek 4 dk bekletilen karışıma 1 ml %7'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karışımlar 90 dk boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bekletilerek absorbans değerleri 725 nm'de tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar gallik asit eşdeğeri cinsinden (mg<sub>GAE</sub> / g<sub>örnek</sub>) ifade edilmiştir. Absorbans değerleri ile gallik asit konsantrasyonu arasındaki denklem standart çalışma doğrusu hazırlanarak elde edilmiştir.

#### **Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini**

Aliakbarian ve ark. (2012) tarafından uygulanan toplam flavonoid metoduna göre analiz gerçekleştirilmiştir. Saf su ile 100 kat seyreltilen 0,25 ml ekstrakt üzerine 1 ml saf su eklenerek karışım üzerine 0,075 ml %5'lik NaNO<sub>2</sub> çözeltisinden ilave edilmiştir. Vortekslenen karışıma 5 dk sonra 0,075 ml %10'luk AlCl<sub>3</sub> çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 0,5 ml 1 M NaOH çözeltisi eklenerek hacim, toplam hacim 2,5 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Kör olarak ise ekstrakt içermeyen reaktif karışımı kullanılarak 510 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar kuersetin eşdeğeri (mg<sub>QE</sub> / g<sub>örnek</sub>) cinsinden ifade edilmiştir. Absorbans değerleri ile kuersetin konsantrasyonu arasındaki denklem standart çalışma doğrusu hazırlanarak elde edilmiştir.

### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

Yapılan çalışmada, subkritik su ekstraksiyonu yöntemiyle üzüm çekirdeklerinden biyoaktif bileşiklerin yüksek verimle eldesi amaçlanmıştır. Çözücü olarak degaze ultra saf su kullanılmıştır. Partikül boyutu kategorik faktör olarak belirlenmiştir ve CYY yöntemlerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile modelleme çalışması yapılmıştır. MKD'de 2 bağımsız değişken (sıcaklık ve su akış hızı) kullanılarak 2<sup>2</sup> düzeyinde 2 parametrelili; 5 merkez nokta, 4 uç nokta ve 4 faktöriyel tasarım noktasına sahip olmak üzere toplam 13 deney tasarlanmıştır ve fenolik bileşikler ve antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkiler 3 farklı partikül boyutunda çalışmalar yapılarak 39 deney ile gerçekleştirilmiştir. MKD'de tasarlanan deneysel plan ve gözlenen toplam fenol ve toplam flavonoid düzeyleri Tablo 3'de verilmiştir.

Cevap değişkenleri için (toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı) elde edilen veriler Design Expert 10 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve ANOVA analizi sonucunda, parametrelerin lineer, kuadratik ve ikili etkileşimleri için etki değerleri belirlenmiştir

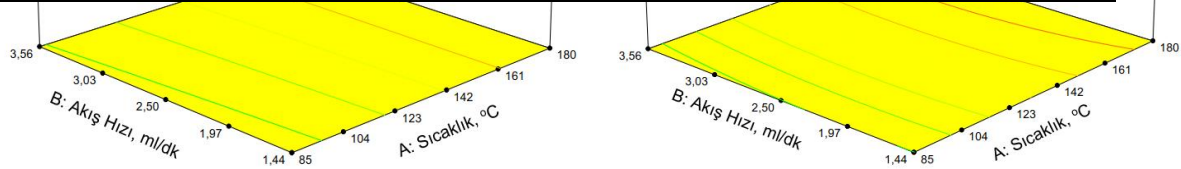
Ekstraktlardaki toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarları spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda yapılan varyans (ANOVA) analizi ile toplam fenolik ve toplam flavonoid madde için yüksek regresyon katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>= 0.956 ve R<sup>2</sup>= 0.962 olarak belirlenmiştir. Toplam fenol madde cevap değişkeni için MKD tarafından önerilen model 2FI modeline uyarken toplam flavonoid için ise kuadratik model önerilmiştir. Her iki cevap değişkeni için en yüksek değerler Tablo 2'den de görüleceği gibi -30+50 mesh boyutundaki fraksiyonda elde edilmiştir.

Toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının incelendiği ekstraksiyon değerlerindeki bağımsız değişkenlerin sonuç üzerine ikili etkileşimleri Şekil 2'de verilmiştir. Toplam fenol miktarı, sıcaklık artışı ile artarken akış hızının artması ile önemli bir değişim gözlenmemiştir. Maksimum değere 1,44 ml/dk akış hızı ve 180 °C sıcaklıkta ulaşılmıştır.

Toplam flavonoid madde miktarı, sıcaklığın artmasıyla artmış ve maksimum değere ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Sıcaklığın artışıyla elde edilen flavonoid madde miktarında artış meydana gelmektedir. 2,98 ml/dk akış hızı ve 180 °C sıcaklıkta maksimum değere ulaşıldığı görülmektedir.

**Tablo 2.** İki nümerik ve bir kategorik değişken için tasarlanan deneysel plan ve gözlenen toplam fenol ve toplam flavonoid düzeyleri.

Deney No	(A)	(B)	(C)	Toplam Fenol mg GAE/g örnek		Toplam Flavonoid mg QE/g örnek	
				Deneysel	Model	Deneysel	Model
1	85.00	1.44	-8+16	41.62	40.27	57.74	59.37
2	180.0	1.44	-8+16	54.80	67.01	97.26	123.8
3	85.0	3.56	-8+16	42.33	38.17	28.29	32.87
4	180.0	3.56	-8+16	65.77	60.49	141.8	112.6
5	65.33	2.50	-8+16	33.81	34.14	28.29	22.76
6	199.7	2.50	-8+16	77.29	68.83	124.0	124.7
7	132.5	1.00	-8+16	61.98	54.53	110.1	103.9
8	132.5	4.00	-8+16	41.53	48.44	46.11	77.27
9	132.5	2.50	-8+16	51.80	51.48	99.26	98.10
10	132.5	2.50	-8+16	48.25	51.48	101.9	98.10
11	132.5	2.50	-8+16	50.85	51.48	104.6	98.10
12	132.5	2.50	-8+16	49.25	51.48	103.1	98.10
13	132.5	2.50	-8+16	50.00	51.48	105.4	98.10
14	85.00	1.44	-16+30	35.94	41.53	84.48	99.20
15	180.0	1.44	-16+30	59.14	65.47	118.0	126.1
16	85.0	3.56	-16+30	33.81	33.50	70.91	62.85
17	180.0	3.56	-16+30	62.37	53.02	126.3	105.1
18	65.33	2.50	-16+30	34.99	33.02	65.10	65.43
19	199.7	2.50	-16+30	59.85	63.75	99.98	114.3
20	132.5	1.00	-16+30	62.61	55.62	144.9	127.0
21	132.5	4.00	-16+30	32.86	41.14	67.43	86.43
22	132.5	2.50	-16+30	52.19	48.38	119.7	114.2
23	132.5	2.50	-16+30	48.49	48.38	114.7	114.2
24	132.5	2.50	-16+30	48.72	48.38	118.2	114.2
25	132.5	2.50	-16+30	49.62	48.38	115.2	114.2
26	132.5	2.50	-16+30	48.36	48.38	112.7	114.2
27	85.00	1.44	-30+50	64.19	75.48	129.4	159.7
28	180.0	1.44	-30+50	123.2	119.42	284.8	265.3
29	85.0	3.56	-30+50	87.15	79.13	165.9	151.2
30	180.0	3.56	-30+50	117.3	118.65	271.3	272.1
31	65.33	2.50	-30+50	70.42	68.66	139.1	123.6
32	199.7	2.50	-30+50	125.4	127.67	275.1	283.8
33	132.5	1.00	-30+50	111.4	97.15	241.4	221.1
34	132.5	4.00	-30+50	103.4	99.18	222.8	219.9
35	132.5	2.50	-30+50	95.36	98.17	220.5	228.0
36	132.5	2.50	-30+50	92.23	98.17	218.6	228.0
37	132.5	2.50	-30+50	96.22	98.17	225.1	228.0
38	132.5	2.50	-30+50	94.36	98.17	223.4	228.0
39	132.5	2.50	-30+50	95.55	98.17	219.5	228.0



**Şekil 2.** Merkezi kompozit dizayna göre oluşturulan toplam fenolik (a) ve toplam flavonoid (b) maddeler üzerine akış hızı ve sıcaklık arasındaki ikili etkileşimleri gösteren 3 boyutlu yüzey grafikleri.

## SONUÇ

Bu çalışmada üzüm çekirdeklerinde öğütme işlemi uygulandıktan sonra elekten geçirilerek elde edilen farklı partikül boyutlarının incelenmesi sonucu partikül boyutunun, fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Merkezi Kompozit Dizayn ile tasarlanarak SSE'de gerçekleştirilen deneyler ışığında fenolik ve flavonoid maddelerin ekstraksiyonu optimize edilmiştir. Bağımsız

değişken olarak incelenen sıcaklık artışının ekstraksiyon veriminde önemli olduğu gözlenmiştir. Akış hızının ise sıcaklığa oranla etkisinin daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Subkritik su ile yapılan ekstraksiyon sonucunda herhangi bir organik çözücü atığı veya zararlı yan ürün oluşumunun olması beklenilmemektedir. Subkritik su ekstraksiyonu yönteminin çevre dostu olmasının yanı sıra fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda da başarılı olduğu kanısına varılmıştır. Biyoaktif bileşiklerin elde edilmesine rağmen karakterizasyonu yapılmamıştır. Bu bağlamda bu çalışmanın devamında ise Öküzgözü üzüm çekirdeğindeki biyoaktif bileşiklerin karakterizasyonu çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MF.17.37 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akın A 2018. Alphonse Lavallée üzüm çeşidinde bazı yaz budamaları ve hümkik madde uygulamalarının verim ve kalite üzerine etkileri. Bahçe 47, 1 97-104.
- Aliakbarian B, Fathi A, Perego P, Dehghani, F 2012. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. The Journal of Supercritical Fluids, 65, 18-24.
- Anonim ,2019. Bitkisel üretim istatistikleri: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) [Erişim 13.06.19]
- Demirtas I, Pelvan E, Özdemir IS, Alasalvar C, Ertas E 2013. Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. Eur J Lipid Sci Tech, 115 641-64
- Kelebek H, Canbas A, Jourdes M, Teissedre PL 2010. Characterization of colored and colorless phenolic compounds in Öküzgözü wines from Denizli and Elazig regions using HPLC-DAD-MS. Industrial crops and products, 31(3), 499-508.
- Kubatova A, Miller DJ, Hawthorne SB 2001. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. Journal of Chromatography A, 923(1-2), 187-194.
- Liang X, Fan Q 2013. Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry. Journal of Materials Science and Chemical Engineering, 1(05), 1.
- Makris DP 2018. Green extraction processes for the efficient recovery of bioactive polyphenols from wine industry solid wastes-Recent progress. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 13, 50-55.
- Nakilcioğlu E, Ötleş S 2014. Basınçlı çözgen ekstraksiyonu ve gıda sanayiindeki uygulamaları. Academic Food Journal/Akademik GIDA, 12(2).
- Odabaş Hİ 2013. Farklı yöntemlerle fındık zarından antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Samsun.
- Sevindik O, Selli S 2016. Üzüm Çekirdeklerinin Temel Biyoaktif Bileşenleri. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 31(2), 9-16.
- Singleton VL, Rossi JA 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144-158.
- Tian Y, Wang Y, Ma Y, Zhu P, He J, Lei J 2017. Optimization of subcritical water extraction of resveratrol from grape seeds by response surface methodology. Applied Sciences, 7(4), 321.
- Yan L, Cao Y, Zheng G 2017. Optimization of subcritical water extraction of phenolic antioxidants from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel by response surface methodology. Analytical Methods, 9(32), 4647-4656.
- Wen X, Zhu MH, Hu R, Zhao JH, Chen ZY, Li JM, Ni YY 2016. Characterisation of seed oils from different grape cultivars grown in China. J Food Sci Tech Mys, 53 3129-3136.
- Yemis, O, Bakkalbasi E, Artik N 2008. Antioxidative activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts obtained from different varieties grown in Turkey. International journal of food science & technology, 43(1), 154-159.
- Yünlü S, Kır E 2016. Soğan (*Allium cepa*) ve sarımsaktaki (*Allium sativum*) bazı fenolik bileşiklerin HPLC yöntemiyle tayin edilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20(3), 566-574.

## Öküzgözü Üzüm Çekirdeğinden Subkritik Su Ekstraksiyonu Kullanımı ile Antioksidan Kapasitesinin Modellenmesi

Kübra ŞİŞLİOĞLU<sup>1</sup>, Şeydanur ADAR<sup>1\*</sup>, Veyis SELEN<sup>1</sup>, M. Şaban TANYILDIZI<sup>1</sup>

<sup>\*\*1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: [seydanur.adar@gmail.com](mailto:seydanur.adar@gmail.com)

### Özet

Antioksidanlar açısından zengin bir kaynak olan üzüm çekirdekleri, şarap, sirke ve pekmez üretimi gibi proseslerin yan ürünleridir. Oksidasyon ürünlerini inhibe edebilen ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemede etkili savunma mekanizması olan antioksidanlar, canlı sistemlerinde büyük önem taşımaktadır. Gıdalarla vücuda alınan antioksidanlar kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürelerini geciktirmede oldukça etkilidirler. Gıda, kozmetik ve ilaç gibi endüstrilerde kullanılan antioksidanların birçok meyve ve sebzedden olduğu gibi üzüm çekirdeklerinden de kazanımı söz konusudur. Antioksidanların etkili bir şekilde geri kazanılabilmesi için pek çok yöntem mevcuttur ancak bu yöntemler düşük ekstrakt verimleri, pahalı ve toksik organik çözücüler içermesi gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle yapılan çalışmada daha kısa sürede daha yüksek verimin elde edilebileceği çevre dostu bir yöntem olan subkritik su ekstraksiyonu (SSE) yöntemi kullanılmıştır. SSE yöntemi ile şarap fabrikası atığı olan Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden antioksidanların ekstraksiyonu için Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak ekstraksiyon üzerinde etkin olan parametreler incelenmiştir. Modelleme çalışmalarında CYY yöntemlerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) kullanılmıştır. MKD'de bağımsız değişkenler olarak sıcaklık, su akış hızı ve partikül boyutu belirlenmiş ve antioksidan aktiviteleri (kapasiteleri) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstraktlarda spektrofotometrik olarak DPPH (2,2-Difenil-1-pikrihidrazil) ve ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) analizleri gerçekleştirilmiştir. Varyans analizine (ANOVA) göre, DPPH ve ABTS antiradikal süpürme aktivitesi için regresyon katsayısı değerleri sırasıyla  $R^2 = 0.945$  ve  $R^2 = 0.944$  olarak elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Cevap Yüzey Yöntemi, Subkritik Su Ekstraksiyonu Şarap Endüstrisi Atıkları, Üzüm Çekirdeği.

### Modelling of antioxidant capacity from Öküzgözü grape seed using subcritical water extraction

#### Abstract

Grape seeds, rich in antioxidants, are by-products of processes such as wine, vinegar, and grape molasses industries. Antioxidants are highly important compounds for living systems because they can inhibit oxidation products and repair the damages caused by them. They are highly effective on prevention of various diseases such as cancer and cardiovascular diseases and slowing down the aging process. Antioxidants, used in foods, cosmetics and pharmaceuticals are extracted from many fruits and vegetables as well as grape seeds too. There are various methods to recover antioxidants effectively, however, these methods have disadvantages such as low extractive yields, higher cost and toxicity of used organic solvents. Therefore, the Subcritical Water Extraction (SWE) method which is environmentally friendly and highly efficient in a short time, is employed in this research study. The parameters effective on the extraction of antioxidants from Öküzgözü grape seeds, solid waste of winemaking, are investigated by using the Response Surface Method (RSM). Central Composite Design (CCD), a useful method in RSM, is employed in modeling studies. Temperature, water flow rate and particle size were determined as independent variables in CCD and their effects on antioxidant activities were investigated. In this study, as antiradical scavenging activity testes; DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) methods were applied to extracts obtained from SWE system on the determined parameters. The DPPH and ABTS antiradical testes of the extracts were analyzed by spectrophotometric methods. According to the variance analysis (ANOVA), regression coefficient values were obtained as  $R^2=0.945$  and  $R^2=0.944$  for the DPPH and ABTS antiradical scavenging activity, respectively.

**Keywords:** Antioxidant, Grape Seed, Response Surface Methodology, Subcritical Water Extraction, Winery Wastes



## GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera*), 2016 yılı verilerine göre dünya üzerindeki üretim hacmi 75.8 milyon ton olan bir meyve mahsulü olmasının yanında 35.3 milyon tonu şarap üretimine mahsustur (Pereira, 2019). Şarap üretimi dünyadaki en önemli endüstriyel faaliyetlerden biri olarak kabul edilmektedir (Barba ve ark., 2016). Üzümün şarap endüstrisinde kullanımı oldukça yaygın olmakla beraber üretilen toplam üzüm miktarının yaklaşık %80'i bu endüstride değerlendirilmektedir (Demirtaş ve ark., 2013). Türkiye'de ise 2018 yılı verilerine göre yaklaşık 4 milyon ton üzüm elde edilmiştir (Anonim, 2019). Ülkemizde şarap üretimi için tercih edilen Öküzgözü üzümü kaliteli şarap veren kırmızı şaraplık çeşitleri arasında yer alan ve Elazığ, Malatya ve Gaziantep yörelerinde yetiştirilen bir üzüm çeşididir (Cabaroğlu ve ark., 2006). Üzümün işlenmesi sonrasında her hasat döneminde onlarca ton posa açığa çıkmaktadır (Sevindik ve Selli, 2016). 1 L şarap elde etmek için yaklaşık 1.4 kg üzüm gerekirken 1.4 kg üzümünden 0.042 kg çekirdek elde edilmektedir (Tian ve ark, 2017). Dünya üzerindeki toplam üretim hacmi gözönüne alındığında üzüm çekirdeği atık miktarı oldukça yüksektir.

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize edebilen ve vücudun bunlardan etkilenmemesini sağlayan ya da vücudun kendini yenilemesine olanak tanıyan maddelerdir. Vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi gıdalarla da alınabilmektedirler (Yünlü ve Kır, 2016). Endüstriyel atık sularda, bulunan fenolikler ve antioksidanlar deşarj bölgelerinin florası ve faunası üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır. Şarap endüstrisi atıkları ve yan ürünler, özellikle de üzüm çekirdeği, doymuş (tokoferoller) veya doymamış (tokotrienoller) fenolik bir kromanol halkasına bağlı izoprenoid yan zincirini içeren yağda çözünen bir bileşik ailesini oluşturan vitamin E gibi diğer antioksidanlar açısından zengin bir kaynaktır. Bu da biyokimyasal ve kimyasal oksijen taleplerinin önemli ölçüde artışına neden olmaktadır (Spigno ve De Faveri, 2007 ; Barba ve ark., 2016). Bunun yanı sıra antioksidanlar insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle oldukça önemli bileşiklerdir (İbanez ve ark., 2003). Antioksidanlar, doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gıda ürünlerinde oksidasyonu önlemek amacıyla BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı toksikolojik etkileri ve kanserojen olma potansiyelleri nedeniyle gıdalarda kullanımı kısıtlamıştır. Bu da araştırmacıların özellikle bitki kökenli doğal antioksidanları kullanmaya yönelmesini sağlamıştır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015; Spigno ve De Faveri, 2007).

Biyoaktif bileşenlerin doğal kaynaklardan ekstraksiyonu için subkritik su ekstraksiyonu (SSE) kullanımı önerilmektedir (Castro-Puyana ve ark., 2013). SSE, çözgen olarak suyun kullanıldığı basınçlı çözgen ekstraksiyonu sistemlerinden biridir. Subkritik su, basınçlı koşullarda 100 ila 374 ° C arasındaki sıcaklıklardaki sıvı halde tutulan sıcak suyu ifade etmektedir (Nakilcioğlu ve Ötleş, 2014; Tian ve ark, 2017). Subkritik su ekstraksiyonu (SSE), ekstraksiyon süresini ve işletme maliyetlerini düşürmesi, daha yüksek kalitede ekstraktlar elde edilmesi, çevre dostu olması ve kullanımı kolay olmasından dolayı avantajlı bir ekstraksiyon yöntemidir.

Bu çalışmada yerel bir şarap fabrikası atığı olan Elazığ yöresine özgü Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden subkritik su ekstraksiyonu ile antioksidanların eldesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon üzerinde etkili parametreleri incelemek amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır. CYY'lerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) kullanılarak sıcaklık, su akış hızı ve partikül boyutu gibi parametrelerin incelenmesi ile modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### Materyal

Çalışmada kullanılan üzüm çekirdekleri, Elazığ yöresinde yetişen Öküzgözü üzüm çekirdekleri olup yerel bir şarap fabrikasından tane patlatma aşaması sonrasında temin edilmiştir. Alınan cibre içerisinde bulunan kabuk, sap gibi olası yabancı maddeler temizlenerek üzüm çekirdekleri atmosferik koşullarda kurutulmaya bırakılmıştır. Blender yardımıyla öğütülen üzüm çekirdekleri -8+16, -16+30 ve -30+50 mesh'lik fraksiyonlara elek yardımıyla ayrılmıştır. Deneylerde kullanılmak üzere ağız kapalı kaplarda -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Ekstraksiyon

Öğütülen üzüm çekirdeklerinin ekstraksiyonu Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde özel olarak tasarlanmış olan ekstraksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Sistem; su rezervuarı, HPLC pompası, ön ısıtıcı sistemi, ekstraksiyon hücresi, soğutma sistemi ve geri basınç valfinden oluşmaktadır.

Öğütülmüş örnek, her deneyde 15 gr olmak üzere ekstraksiyon hücresine yüklenmiştir. Çözücü olarak kullanılan ultra saf su, 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletilmiş ve içerisindeki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmıştır. HPLC pompası ile ön ısıtıcıda 65-100 °C'ye ısıtılan su belirlenen akış hızlarında sisteme beslenmiştir. 25 ml'lik yıkama yapıldıktan sonra sistem sıcaklığı istenilen değere getirilerek geri basınç valfinden basınç 30-40 bar olarak ayarlanmıştır. Ekstraksiyon hücresi hacmi (50 ml)'nin üç katı olacak şekilde her bir deneyde 150 ml ekstrakt alınmıştır. Alınan ekstraktlar, DPPH ve ABTS analizleri için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

## Deneysel Tasarım

Ekstraksiyon üzerinde etkili olan parametrelerin analizi ve optimizasyonu için Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılmıştır. Cevap Yüzey Yöntemlerinden (CYY) birisi olan ve en çok tercih edilen istatistiksel optimizasyon yöntemi Merkezi Kompozit Dizayn (MKD)'dir. Ardışık deneysel çalışmalar için çok uygun olan bu tasarım yönteminde  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$  olarak adlandırılmak suretiyle bir faktörün 5 farklı seviyesi incelenmektedir. Bu doğrultuda yapılan çalışmada MKD kullanılmıştır. MKD'de bağımsız değişkenler olarak sıcaklık (yaklaşık 65-200 °C), su akış hızı (1-4 ml/dk) ve partikül boyutu (-8+16, -16+30 ve -30+50 mesh) belirlenmiş ve bu değişkenlerin etkileri MKD yöntemiyle tasarlanan deneylerle incelenmiştir. Ekstraksiyonda incelenen parametrelerin araştırıldığı aralıklar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Öküzgözü üzüm çekirdeklerinden DPPH ve ABTS değerleri için bağımsız değişkenler, deneysel değerleri ve MKD için seviyeleri.

Değişken	Faktör Tipi	Kod	Kodlu değerler ve değer aralıkları				
			$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
Sıcaklık, °C	Nümerik	A	65.33	85.00	132.5	180.0	199.7
Su Akış Hızı, ml/dk	Nümerik	B	1	1.44	2.5	3.56	4
Partikül Boyutu, mesh	Kategorik	C		-8+16	-16+30	-30+50	

Belirlenen deneysel tasarıma göre yapılan deneylerde cevap değişkenleri olarak DPPH ve ABTS antioksidan kapasite değerleri takip edilmiştir. Elde edilen veriler Design Expert 10 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve ANOVA analizi yapılmıştır.

### Analiz Yöntemleri

Üzüm çekirdeğinden elde edilen ekstraktlarda spektrofotometrik (Shimadzu UV 1800) analizler olan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ve ABTS (2,2 1-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) antioksidan kapasite tayini analizleri üç paralel ile çalışılarak yapılmış, sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

### DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Subkritik su ekstraksiyonu yöntemi ile CYY deney dizaynının önerdiği noktalarda yürütülen ekstraksiyon örneklerinin radikal süpürme kapasiteleri Brand-William, Cuvelier, ve Berset (2005) tarafından önerilen DPPH yöntemi ile ölçülmüştür. Seyreltilmiş ekstraktan 0,1 ml alınarak üzerine %70'lik metanolde hazırlanmış DPPH (1mg/ml) radikalinden 1,9 ml ilave edilmiştir. Vortekslenen karışımlar, 60 dk boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Kör olarak ekstrakt yerine 0,1 ml saf su ve 1,9 ml %70'lik metanol karışımı kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 517 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bilinen trolox konsantrasyonlarında çalışma doğrusu elde edilerek, sonuçlar mg troloks eşdeğeri /g örnek olarak ifade edilmiştir.

### ABTS Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

ABTS yöntemi radikal süpürme kapasitesinin deneyi için Re ve ark. tarafından önerilen metoda göre (1999) ABTS katyonunun hazırlığında, 2,45 mM  $K_2S_2O_8$  (Potasyum Persülfat) çözeltisi içerisinde 7 mM ABTS stok bileşeni çözülmüş ve 16 saat karanlıkta bekletilmiştir. Hazırlanan katyon reaktif çözeltisi etanol ile absorbans değeri  $0,700 \pm 0,020$  aralığında seyreltilerek ayarlanmıştır. Uygun oranda seyreltilmiş olan 0,1 ml ekstrakt üzerine ABTS çözeltisinden 1,9 ml eklenmiştir. 6 dk inkübasyon sonrası 734 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar, mg troloks eşdeğeri /g örnek cinsinden ifade edilmiştir.

### BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmada, subkritik su ekstraksiyonu yöntemiyle üzüm çekirdeklerinden biyoaktif bileşiklerin yüksek verimle eldesi amaçlanmıştır. Çözücü olarak degaze ultra saf su kullanılmıştır. Partikül boyutu kategorik faktör olarak belirlenmiştir ve CYY yöntemlerinden biri olan Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ile modelleme çalışması yapılmıştır. MKD'de 2 bağımsız değişken (sıcaklık ve su akış hızı) kullanılarak  $2^2$  düzeyinde 2 parametrelili; 5 merkez nokta, 4 uç nokta ve 4 faktöriyel tasarım noktasına sahip olmak üzere toplam 13 deney tasarlanmıştır ve antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkiler 3 farklı partikül boyutunda çalışmalar yapılarak 39 deney ile gerçekleştirilmiştir. MKD'de tasarlanan deneysel plan ve gözlenen DPPH ve ABTS antioksidan kapasiteleri Tablo 2'de verilmiştir.

Cevap değişkenleri için (DPPH ve ABTS antioksidan kapasiteleri) elde edilen veriler Design Expert 10 yazılımı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve ANOVA analizi sonucunda, parametrelerin lineer, kuadratik ve ikili etkileşimleri için etki değerleri belirlenmiştir.

Ekstraktlardaki DPPH ve ABTS antioksidan kapasiteleri spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda yapılan varyans (ANOVA) analizi ile DPPH ve ABTS antioksidan kapasiteleri için

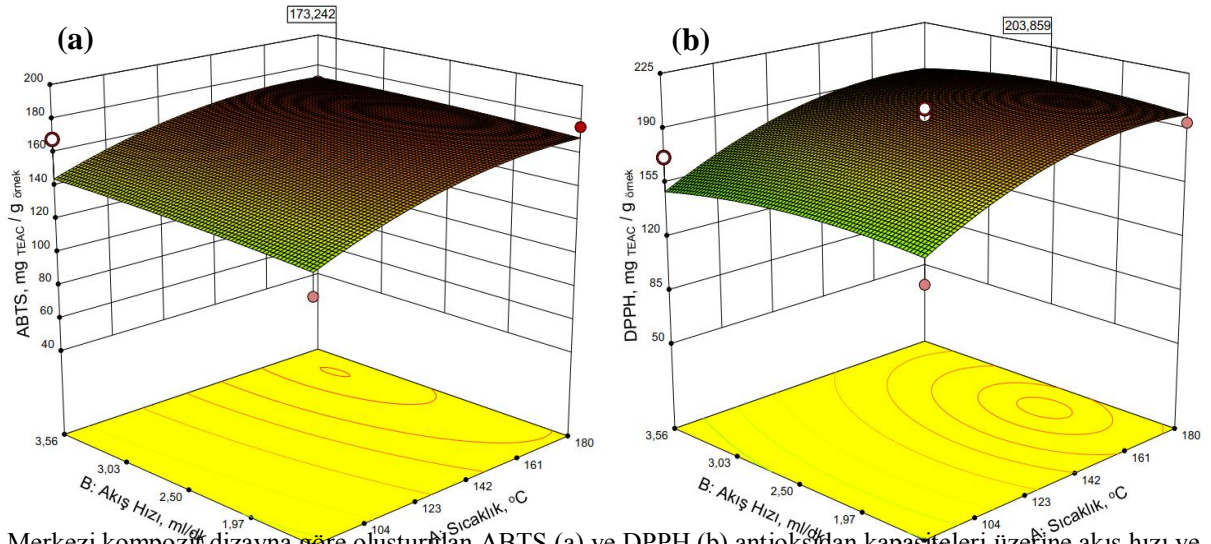
yüksek regresyon katsayıları sırasıyla  $R^2=0.945$  ve  $R^2=0.944$  olarak belirlenmiştir. DPPH ve ABTS cevap değişkenleri için MKD tarafından kuadratik model önerilmiştir. Her iki cevap değişkeni için en yüksek değerler Tablo 1'den de görüleceği gibi -30+50 mesh boyutundaki fraksiyonda elde edilmiştir.

DPPH ve ABTS düzeylerinin incelendiği ekstraksiyon değerlerindeki bağımsız değişkenlerin sonuç üzerine ikili etkileşimleri Şekil 1'de verilmiştir. DPPH sıcaklık artışı ile artarken akış hızının artması ile önemli bir değişim gözlenmemiştir. Optimum değere 2,21 ml/dk akış hızı ve 166 °C sıcaklıkta ulaşılmıştır. ABTS, sıcaklığın artmasıyla artmış ve maksimum değere ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Sıcaklığın

**Tablo 2.** İki nümerik ve bir kategorik değişken için tasarlanan deneysel plan ve gözlenen DPPH ve ABTS antioksidan kapasiteleri.

Deney No	(A)	(B)	(C)	DPPH		ABTS	
				mg TEAC/ g örnek		mg TEAC/ g örnek	
				Deneysel	Model	Deneysel	Model
1	85.00	1.44	-8+16	<b>94.16</b>	88.79	<b>67.73</b>	68.87
2	180.0	1.44	-8+16	<b>108.0</b>	115.9	<b>89.93</b>	104.6
3	85.0	3.56	-8+16	<b>59.46</b>	71.48	<b>50.19</b>	60.49
4	180.0	3.56	-8+16	<b>128.7</b>	101.0	<b>105.3</b>	91.44
5	65.33	2.50	-8+16	<b>86.68</b>	66.10	<b>52.59</b>	50.06
6	199.7	2.50	-8+16	<b>107.9</b>	106.1	<b>92.20</b>	97.19
7	132.5	1.00	-8+16	<b>107.7</b>	113.8	<b>91.86</b>	96.68
8	132.5	4.00	-8+16	<b>72.02</b>	91.05	<b>62.95</b>	81.46
9	132.5	2.50	-8+16	<b>112.3</b>	115.0	<b>99.26</b>	91.83
10	132.5	2.50	-8+16	<b>115.1</b>	115.0	<b>101.5</b>	91.83
11	132.5	2.50	-8+16	<b>108.3</b>	115.0	<b>95.23</b>	91.83
12	132.5	2.50	-8+16	<b>117.7</b>	115.0	<b>102.4</b>	91.83
13	132.5	2.50	-8+16	<b>111.3</b>	115.0	<b>98.78</b>	91.83
14	85.00	1.44	-16+30	<b>68.93</b>	74.95	<b>68.72</b>	75.23
15	180.0	1.44	-16+30	<b>102.6</b>	100.6	<b>90.90</b>	97.01
16	85.0	3.56	-16+30	<b>58.16</b>	54.36	<b>66.20</b>	60.07
17	180.0	3.56	-16+30	<b>78.29</b>	82.30	<b>92.66</b>	77.09
18	65.33	2.50	-16+30	<b>59.51</b>	50.92	<b>62.50</b>	55.91
19	199.7	2.50	-16+30	<b>97.37</b>	88.87	<b>82.98</b>	83.35
20	132.5	1.00	-16+30	<b>96.84</b>	99.96	<b>107.2</b>	97.48
21	132.5	4.00	-16+30	<b>66.80</b>	72.54	<b>58.12</b>	72.67
22	132.5	2.50	-16+30	<b>100.1</b>	98.84	<b>87.45</b>	87.83
23	132.5	2.50	-16+30	<b>98.56</b>	98.84	<b>89.03</b>	87.83
24	132.5	2.50	-16+30	<b>100.2</b>	98.84	<b>85.11</b>	87.83
25	132.5	2.50	-16+30	<b>96.17</b>	98.84	<b>84.73</b>	87.83
26	132.5	2.50	-16+30	<b>95.23</b>	98.84	<b>82.36</b>	87.83
27	85.00	1.44	-30+50	<b>143.8</b>	159.1	<b>124.0</b>	137.0
28	180.0	1.44	-30+50	<b>194.0</b>	199.2	<b>175.9</b>	169.6
29	85.0	3.56	-30+50	<b>172.0</b>	150.1	<b>168.1</b>	144.7
30	180.0	3.56	-30+50	<b>187.5</b>	192.6	<b>168.5</b>	172.6
31	65.33	2.50	-30+50	<b>110.9</b>	137.9	<b>119.7</b>	126.9
32	199.7	2.50	-30+50	<b>181.2</b>	196.3	<b>168.2</b>	169.6
33	132.5	1.00	-30+50	<b>217.8</b>	188.9	<b>180.7</b>	159.9
34	132.5	4.00	-30+50	<b>180.5</b>	178.0	<b>170.0</b>	167.5
35	132.5	2.50	-30+50	<b>204.6</b>	196.0	<b>160.7</b>	166.4
36	132.5	2.50	-30+50	<b>193.0</b>	196.0	<b>157.2</b>	166.4
37	132.5	2.50	-30+50	<b>198.3</b>	196.0	<b>162.6</b>	166.4
38	132.5	2.50	-30+50	<b>195.7</b>	196.0	<b>165.4</b>	166.4
39	132.5	2.50	-30+50	<b>202.9</b>	196.0	<b>158.7</b>	166.4

artışıyla elde edilen flavonoid madde miktarında artış meydana gelmektedir. 3,18 ml/dk akış hızı ve 170 °C sıcaklıkta optimum değere ulaşıldığı görülmektedir.



**Şekil 1.** Merkezi kompozit dizayna göre oluşturulan ABTS (a) ve DPPH (b) antioksidan kapasiteleri üzerine akış hızı ve sıcaklık arasındaki ikili etkileşimleri gösteren 3 boyutlu yüzey grafikleri.

## SONUÇ

Bu çalışmada öğütme işlemi uygulanarak elemeye farklı partikül boyutlarının elde edildiği üzüm çekirdeği örneklerinde toplam antioksidan kapasite tayinleri yapılarak subkritik su ekstraksiyonu işleminde etken parametreler incelenmiş, partikül boyutunun yanı sıra sıcaklık ve akış hızının ekstraktların antioksidan kapasiteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Optimizasyon çalışması için incelenen parametrelerden partikül boyutunun, elde edilen ekstraktların antioksidan kapasiteleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Merkezi Kompozit Dizayn ile tasarlanarak SSE’de gerçekleştirilen deneyler iki farklı antioksidan kapasite tayin metoduyla incelenmiş, sonuçların iki metod için birbiri ile uyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Her iki analiz sonucu için bağımsız değişkenlerin incelenen aralıkları içerisinde optimum noktalar elde edilmiştir. Maximum antioksidan kapasite her iki deney için benzer sıcaklık değerlerinde elde edilirken, ABTS ile ölçülen antioksidan aktivite DPPH a göre daha yüksek akış hızında maximum noktaya ulaştığı saptanmıştır. Antioksidan etki üzerine etki gösteren biyoaktif bileşenlerin tanımlanmaları sonraki çalışmalar için planlanmakta olup, elde edilen sonuçların şarap endüstrisi atıklarının çevre dostu bir yöntem olan SSE ile geri kazanımının Elazığ yöresi ve civarındaki şarap fabrikaları için önemli olabileceği düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından MF.17.37 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Anonim ,2019. Bitkisel üretim istatistikleri: [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) [Erişim 13.06.19].
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 96-109.
- Brand-William, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (2005). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Cabaroğlu, T, Erten H, Ünal MÜ, Bozdoğan A 2006. Cibre fermantasyonu süresinin Öküzgözü ve Boğazkere üzümlerinden karıştırılarak elde edilen şarapların fenol bileşikleri ve kalitesi üzerine etkisi. *Gıda/The Journal Of Food*, 31(2).
- Castro-Puyana M, Herrero M, Mendiola J.A, Ibáñez E 2013. Subcritical water extraction of bioactive components from algae. In. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 534-560). Woodhead Publishing.

- Demirtas I, Pelvan E, Özdemir IS, Alasalvar C, Ertas E 2013. Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *Eur J Lipid Sci Tech*, 115 641-64.
- Kasnak C, Palamutoğlu R 2015. Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(5), 226-234.
- Ibanez E, Kubátová A, Señoráns FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(2), 375-382.
- Pereira DTV, Tarone AG, Cazarin CBB, Barbero GF, Martínez J 2019. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of food engineering*, 240, 105-113.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Sevindik O, Selli S 2016. Üzüm Çekirdeklerinin Temel Biyoaktif Bileşenleri. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31(2), 9-16.
- Spigno G, De Faveri DM 2007. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Tian Y, Wang Y, Ma Y, Zhu P, He J, Lei J 2017. Optimization of subcritical water extraction of resveratrol from grape seeds by response surface methodology. *Applied Sciences*, 7(4), 321.
- Yünlü S, Kır E 2016. Soğan (*Allium cepa*) ve sarımsaktaki (*Allium sativum*) bazı fenolik bileşiklerin HPLC yöntemiyle tayin edilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(3), 566-574.

## Single nucleotide polymorphisms: Markers of disease susceptibility and drug response

Ezgi Öztaş\* and Gül Özhan

Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: ezgi.oztas@istanbul.edu.tr

### Abstract

Variations in the DNA sequence provide biological diversity which helps to living organisms adapt to varied circumstances and environments. In addition, genetic predisposition is related to individual differences which lead to differences in phenotype, disease susceptibility and altered response to drugs, chemicals and/or pathogens. Since these inter-individual differences have a substantial relation with the risk of diseases and impact on pharmacokinetics, identification of gene polymorphisms and medical applications of these markers have raised for over decades.

In the present conference paper, the definitions of several terms belong to polymorphisms and medical application of SNPs mainly discussed. Furthermore, the results of numerous studies conducted on the Division of Pharmacogenetics, Faculty of Pharmacy, Istanbul University were summarized. Hereby, various SNPs associated with the risk of colorectal cancer, breast cancer and pancreatitis as well as SNPs associated with the drug response in hypothyroidism patients in Turkish population were revealed.

**Keywords:** Genetic variations; single nucleotide polymorphisms; drug response; disease susceptibility.

### INTRODUCTION

Human Genome Project revealed that the human genome consists of 6 billion nucleotides and it is thought that at least every thousandth nucleotide is polymorphic (Pekmezović T, 2010). Genetic polymorphism is the occurrence of at least two alleles at one locus among the same population; and, each allele has an appreciable frequency of 1% or higher. The most common form of genetic polymorphisms, approximately 80% of all types, is single nucleotide polymorphisms (SNPs). Also, there are other types of polymorphisms such as various tandem repeats (VNRT, i.e, mini- and microsatellites) and deletion/insertion polymorphisms (Novaković et al, 2010). SNPs are now widely studied for their role in the development of polygenic disorders which are formed by the interaction of multiple genes and various environmental factors.

### SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPs)

SNPs are a single base change in DNA sequence at a given position with an allele frequency of at least 1%. In the human genome, location, allele frequency and local haplotype structure of approximately 15 million SNPs have been identified among different populations worldwide (1000 Genomes Project Consortium, 2010). Even, two members of the same population are considered; more than 3 million nucleotide differences could found (Shastri BS, 2002). It is known that some regions of the genome are richer in SNPs and the location of SNPs may affect the phenotype in different level. For example; SNPs within the gene may alter the protein structure whereas SNPs in the regulatory region of the gene may affect the protein quantity (Sukhumsirichart W, 2018). Since the altered proteins could possess different properties; that might be cause change in enzyme activities, even in some cases the entire function of the whole protein could diminished. Hence, genetically varied individuals could have different metabolic pathways which are crucial in disease susceptibility and drug response (Bessenyei et al, 2004).

### THE ROLE OF SNPs AS BIOMARKERS

For decades many publications indicated that certain SNPs are in association with the several diseases since a disease is more frequently occur in individuals with defined SNPs. Although, not only SNPs are responsible in the pathogenesis of different diseases, environmental factors play a role as well; a few pharmacogenetic predictive tests such as breast cancer 1 (BRCA1) mutation test for breast cancer risk and v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) mutation test for metastatic colorectal cancers were introduced (Bessenyei et al, 2004, Baskın and Çalibaşı, 2011).

As the recent knowledge “one size fits all” approach which is used without considering the genetic differences between individuals may cause different problems in the treatment. The dose of the drug used may be insufficient to obtain an effective response and even may cause serious side effects that may lead to death due to changes in the biotransformation pathway of the drug. Detection of genetic variants which cause treatment differences among people will enable personalized drug treatment clinical applications. Nowadays, UDP glucuronyl transferase (UGT1A1) mutation test for irinotecan and thiopyrin S-methyltransferase (TPMT)

mutation test for 6-mercaptopurine are widely used increase the efficiency of cancer therapies (Grabinski JL, 2007, Baskin and Çalibaşı, 2011).

## STUDIES CONDUCTED ON THE DIVISION OF PHARMACOGENETICS

### Association Studies (Breast Cancer, Colorectal Cancer and Pancreatitis Susceptibility)

Effects of various SNPs on colorectal cancer, breast cancer and pancreatitis were studied in Turkish population and results were summarized in the **Table 1**. DNA was extracted by standard phenol-chloroform extraction protocol and genotyping was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method.

**Table 1.** Association studies conducted

Disease	Gene	SNPs	No. of subjects		OR (95% CI)	p value	Reference
			Cases	Controls			
Colorectal Cancer	<i>CYP1A1</i>	CYP1A1*2A (rs4646903)	193	248	<i>C allele</i> 1.57 (0.90–2.73)	0.120	Oztas et al., 2016a
	<i>MutL homolog 1 (MLH1)</i>	rs1800734	158	164	GG vs. any A 1.92 (1.22–3.04)	<b>p&lt;0.01</b>	Oztas et al., 2017
		rs1799977			AA vs. any G 2.82 (1.76–4.52)	<b>p&lt;0.01</b>	
	<i>Cytochrome P450s (CYPs)</i>	CYP1A1*2A (rs4646903)	104	183	<i>C allele</i> 2.53 (0.99–6.45)	<b>0.046</b>	Özhan et al., 2014
		CYP1A1*2C (rs1048943)			<i>G allele</i> 1.278 (0.48–3.38)	0.624	
		CYP1A2*1C (rs2069514)			<i>A allele</i> 1.000 (0.02–5.08)	1.000	
		CYP1A2*1F (rs762551)			<i>A allele</i> 0.955 (0.53–1.73)	0.888	
		CYP2C9*2 (rs1799853)			<i>T allele</i> 1.137 (0.42–3.08)	0.807	
		CYP2C9*3 (rs1057910)			<i>C allele</i> 1.314 (0.47–3.68)	0.603	
		CYP2C19*2 (rs4244285)			<i>A allele</i> 1.465 (0.62–3.48)	0.383	
		CYP2C19*3 (rs4986893)			<i>A allele</i> 0.411 (0.10–1.64)	0.195	
	CYP2C19*17 (rs12248560)	<i>T allele</i> 0.804 (0.38–1.70)	0.566				
	<i>Multidrug resistance 1 (MDR1)</i>	rs1128503	103	150	<i>C allele</i> 1.91 (1.09–3.35)	<b>0.034</b>	Özhan et al., 2013a
		rs2032582			<i>G allele</i> -	1.000	
		rs1045642			<i>C allele</i> 1.44 (0.82–2.53)	0.254	
	<i>Breast cancer resistance protein (BCRP)</i>	421C>A	108	157	<i>A allele</i> 16.12 (2.08–125.1)	<b>0.001</b>	Sari et al., 2015
34G>A		<i>A allele</i> 0.52 (0.18–1.46)			0.204		
<i>Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 (OATP1B1)</i>	rs2306283	100	150	<i>A allele</i> 0.91 (0.52–1.59)	0.774	Özhan et al., 2013b	
	rs4149015			<i>A allele</i> -	1.000		
	rs4149056			<i>T allele</i> 2.66 (1.31–5.41)	<b>0.006</b>		
<b>B r e c</b>		rs2853669	107	110	TT vs. any C	0.435	Oztas

Pancreatitis	<i>Telomerase Reverse Transcriptase (TERT)</i>				1.26 (0.71–2.25)		et al., 2016b
		rs2736100			GG vs. any T 1.15 (0.66–2.00)	0.632	
		rs2736098			GG vs. any A 1.88 (1.04–3.40)	<b>0.034</b>	
	<i>Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF<math>\alpha</math>)</i>	rs1800629	103	92	GG vs. any A 1.63 (1.13–4.01)	0.145	Özhan et al., 2010a
		rs361525			GG vs. any A 0.86 (0.75–1.77)	0.175	
	<i>Cyclooxygenase 2 (COX2)</i>	rs5275	103	92	TT vs. any C 1.88 (1.06–3.34)	0.030	Özhan et al., 2010b
		rs2206593			GG vs. any A 0.89 (0.28–2.85)	>0.05	
		rs4648262			GG vs. any T 1.71 (0.95–3.06)	>0.05	
		rs4648261			GG vs. any A 0.64 (0.36–1.12)	>0.05	
		rs2066826			GG vs. any A 1.07 (0.60–1.89)	>0.05	
		rs5277			GG vs. any C 1.00 (0.56–1.79)	>0.05	
		rs2745557			GG vs. any A 1.12 (0.61–2.04)	>0.05	
	<i>Inducible nitric oxide synthase (iNOS)</i>	rs1800482	93	60	CC vs. any G -	>0.05	Özhan et al., 2012
rs9282799		CC vs. any T -			>0.05		
rs2297518		TT vs. any C 2.88 (1.49–5.57)			<b>0.002</b>		

SNPs: single nucleotide polymorphisms; rs: reference SNP number; OR, Odds ratio; CI, Confidence interval; p<0.05 indicates statistically significance.

### Drug Response Studies (Levothyroxine Bioavailability)

Effects of several SNPs on levothyroxine bioavailability was studied in Turkish population and results were summarized in the **Table 2**. DNA was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit and genotyping was done by the LightCycler FastStart DNA Master HybProbe and Roche LightSNP assay probes on LightCycler 480 PCR platform (Roche, Germany) according to the manufacturer's instructions.

**Table 2.** Drug response studies conducted

Drug	Gene	SNPs	No. of subjects	TSH (mIU/L)	p value	Reference
Levothyroxine	<i>Deiodinase 1 (DIO1)</i>	rs11206244	94	1.60-1.91	>0.05	Arici et al., 2017
		rs2235544		1.18-1.91	>0.05	
	<i>Deiodinase 2 (DIO2)</i>	rs225014		0.17- <b>2.33</b> <i>Wild type (TT)</i>	<b>&lt;0.05</b>	
		rs225015		0.16- <b>2.44</b> <i>Mutant type (GG)</i>	<b>&lt;0.05</b>	
		rs12885300		1.22-1.74	>0.05	
	<i>Thyroid hormone receptor <math>\alpha</math> (THRa)</i>	rs939348		0.23-1.63	>0.05	
	<i>TSH receptor (TSHR)</i>	rs4903957		1.07-2.53	>0.05	
		rs1991517		0.08-1.78	>0.05	



		rs2239610		1.21-3.77	>0.05	
		rs2268458		1.31-3.77	>0.05	
	Udp-G transferase (UGT1A3)	rs1983023		0.31-1.77	>0.05	
		rs3806596		1.06-1.82	>0.05	
	Udp-G transferase (UGT1A1*28)	rs8175347		1.07-1.75	>0.05	
Drug	Gene	SNPs	No. of subjects	OR (95% CI)	LT4 dose B (p value)	Reference
Levothyroxine	Multidrug resistance 1 (MDR1)	C1236T	90	CC vs. CT + TT 0.99 (0.97-1.01)	-0.011 (0.21)	Oztas et al., 2018
		G2677T/A		GG vs. others 1.01 (0.98-1.04)	0.010 (0.49)	
		C3435T		CC vs. CT + TT 0.98 (0.97-1.00)	-0.016 (0.08)	

SNPs: single nucleotide polymorphisms; rs: reference SNP number; TSH, thyroid stimulating hormone; LT-4, levothyroxine; B, Coefficient for the constant; OR, Odds ratio; CI, Confidence interval; p<0.05 indicates statistically significance.

## CONCLUSION

As a future aspect; the improvements in the technology will lead to increase the number of these biomarkers, day by day, in determining hereditary risks for common diseases and predicting drug responses.

## ACKNOWLEDGEMENTS

No competing financial interests exist. The authors thank all participants who volunteered.

## REFERENCES

- 1000 Genomes Project Consortium 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319):1061.
- Arici M, Oztas E, Yanar F, Aksakal N, Ozcinar B, Ozhan G 2017. Association between genetic polymorphism and levothyroxine bioavailability in hypothyroid patients. *Endocrine journal*, EJ17-0162.
- Baskın Y, Çalıbaşı G 2011. Pharmacogenetic applications and pharmacoeconomics in cancer patients. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 68(3): 152-0.
- Bessenyey B, Marka M, Urban L, Zeher M, Semsei I 2004. Single nucleotide polymorphisms: aging and diseases. *Biogerontology*, 5(5): 291-303.
- Grabinski JL 2007. Pharmacogenomics of anticancer agents: implications for clinical pharmacy practice. *Journal of Pharmacy Practice*, 20(3): 246-251.
- Jannuzzi AT, Karaman E, Oztas E, Yanar HT, Özhan G 2015. Telomerase reverse transcriptase (TERT) gene variations and susceptibility of colorectal cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 19(12): 692-697.
- Novaković I, Maksimović N, Cvetković S, Cvetković D 2010. Gene polymorphisms as markers of disease susceptibility. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(3): 135-138.
- Özhan G, Yanar HT, Ertekin C, Alpertunga B 2010a. Polymorphisms in Tumour Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ ) Gene in Patients with Acute Pancreatitis. *Mediators of inflammation*, ID 482950.
- Özhan G, Yanar TH, Ertekin C, Alpertunga B 2010b. The effect of genetic polymorphisms of cyclooxygenase 2 on acute pancreatitis in Turkey. *Pancreas*, 39(3), 371-376.
- Özhan G, Sari FM, Vefai M, Yanar HT, Alpertunga B 2012. Acute pancreatitis is associated with Ser608Leu iNOS polymorphism. *Folia biologica*, 58(6):256-260.
- Özhan G, Kara M, Sari FM, Yanar HT, Ercan G, Alpertunga B 2013a. Associations between the functional polymorphisms in the ABCB1 transporter gene and colorectal cancer risk: a case-control study in Turkish population. *Toxicology mechanisms and methods*, 23(4), 235-239.
- Özhan G, Kara M, Sari FM, Yanar HT, Alpertunga B 2013b. Influence of the functional polymorphisms in the organic anion transporting polypeptide 1B1 in the susceptibility to colorectal cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17(3), 214-218.

- Özhan G, Mutur M, Ercan G, Alpertunga B 2014. Genetic variations in the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and susceptibility to colorectal cancer among Turkish people. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 18(4), 223-228.
- Oztaz E, Özhan G, Daly AK 2016a. The effect of the CYP1A1\* 2A allele on colorectal cancer susceptibility in a British population. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 20(8), 475-477.
- Oztas E, Kara H, Kara ZP, Aydogan MU, Uras C, Ozhan G 2016b. Association between human telomerase reverse transcriptase gene variations and risk of developing breast cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 20(8), 459-464.
- Oztas E, Cilingir U, Akyüz A, Yanar HT, Özhan G 2017. MLH1-93G> A and I219V polymorphisms are susceptible to increased risk of sporadic colorectal cancer in a Turkish population. *Istanbul Journal of Pharmacy*, 47(2), 63-67.
- Oztas E, Garcia-Saavedra AP, Yanar F, Özçınar B, Aksakal N, Purisa S, Özhan G 2018. P-glycoprotein polymorphism and levothyroxine bioavailability in hypothyroid patients. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(2), 274-278.
- Pekmezović T 2010. Gene-environment interaction: A genetic-epidemiological approach. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(3): 131-134.
- Sari FM, Yanar HT, Ozhan G 2015. Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Biomedical reports*, 3(1), 105-109.
- Shastri BS 2002. SNP alleles in human disease and evolution. *Journal of Human Genetics*, 47(11): 561.
- Sukhumsirichart W 2018. Polymorphisms. In: Liu Y(eds), *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-202-9.

## Micro-mesoporous FAU type zeolite for catalytic applications

Vladimer Tsitsishvili\*, Nanuli Dolaberidze, Nato Mirdzveli, Manana Nijaradze, Zurab Amiridze, Vakhtang Gabunia, Giorgi Tsintskaladze

Petre Melikishvili Institute of Physical and Organic Chemistry of Ivane Javakhishvili Tbilisi State University, Tbilisi, Georgia.

\*Corresponding author e-mail: v.tsitsishvili@gmail.com

### Abstract

The effectiveness of zeolite catalysts increases when a secondary porous network exists in the material, thereby allowing shorter diffusion paths and providing access of reagents to active sites on the surface of the catalyst. The purpose of the study was to obtain a micro-mesoporous FAU type zeolite by recrystallization of Georgian natural phillipsite. It is found that phase-pure zeolite with chemical composition  $[\text{Na}_{66(3)}[\text{K}, \frac{1}{2}\text{Ca}, \frac{1}{2}\text{Mg}, \frac{1}{2}\text{Cu}, \frac{1}{2}\text{Zn}]_{12(1)}(\text{H}_2\text{O})_{248(10)}] (\text{Al}_{78(3)}\text{Si}_{114(4)}\text{O}_{384})$  can be prepared in the form of octahedral crystallites with uniform micrometric (2-7  $\mu\text{m}$ ) dimensions by hydrothermal crystallization (95°C) of aged (96 hr) at room temperature aluminosilicate gel (2.9Na<sub>2</sub>O: 0.26Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 1SiO<sub>2</sub>: 150H<sub>2</sub>O) obtained from water suspension of natural phillipsite, treated with hydrochloric acid and mixed with sodium hydroxide. According to the X-ray diffraction pattern showing the strongest peak at  $2\theta = 6.1^\circ$  ( $hkl=111$ ,  $d$ -spacing 14.28Å) and all weaker peaks typical for hydrated NaX zeolite, as well as in accordance with the IR spectrum presenting all characteristic vibration bands, the resulting zeolite has a crystal structure FAU and is classified as the Na-X type. The nitrogen adsorption-desorption plot measured at 77 K corresponds to typical Langmuir isotherm at a relative pressure up to  $p/p_0=0.9$ ; specific surface area calculated by the Brunauer-Emmett-Teller method is 589 m<sup>2</sup>/g. At higher pressures ( $0.925 < p/p_0 < 0.999$ ), type H<sub>1</sub> narrow hysteresis loop is observed, corresponding to the filling of well defined cylindrical pore channels with average diameter of 55 nm calculated by the Barrett-Joyner-Halenda method; the total pore volume is 0.578 cm<sup>3</sup>/g, of which 52% are micropores with a diameter <0.8 nm, and 48% are mesopores. Measured for water vapor sorption capacity exceeds 0.2 cm<sup>3</sup>/g, scientific ion exchange capacity of prepared NaX is 4.876 meq/g. The resulting zeolite in its characteristics is competitive with commercially available materials; additionally, it has a developed system of mesopores providing transport of large molecules.

**Keywords:** Hydrothermal crystallization, Phillipsite, Micro-mesoporous zeolite X.

### INTRODUCTION

Zeolites are porous crystalline aluminosilicates  $\text{M}^{n+}_{x/n}[(\text{SiO}_2)(\text{AlO}_2)_x] \cdot w\text{H}_2\text{O}$  (M=Na, K, Ca, Mg, etc.) built from alternating SiO<sub>4</sub> and AlO<sub>4</sub><sup>-</sup> tetrahedrons producing open framework structures (Baerlocher et al., 2007). Zeolites have unique properties of uniform and precise nano-scale porosity, molecular shape selectivity, ion-exchange capacity, strong Brønsted acidity and high thermal and hydrothermal stability, they find the greatest practical application described in detail in recent review articles by Mintova et al. (2015), Ennaert et al. (2016), Li et al. (2017) and Bacakova et al. (2018).

Among more than two hundred synthetic zeolites, analogs of a rare natural zeolite faujasite (the crystal chemical formula  $[(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Na}_2)_{29}(\text{H}_2\text{O})_{240}] [\text{Al}_{58}\text{Si}_{134}\text{O}_{384}]$ -FAU), called zeolite X (samples with Si/Al<3) and zeolite Y (Si/Al>3), have the greatest application. Zeolites X and Y are used for removal of heavy metals from aqueous waste (Izidoro et al., 2013; Ltaief et al., 2015), for separation of gases in permanent gas-flow (Bastani et al., 2013), in aerobic digestion process (Montalvo et al., 2012), and especially in such catalytic processes as oxidation of olefins (Bagherzadeh and Zare, 2012), mild hydrocracking of naphthenic compounds (Park et al., 2013), hydrocracking of vacuum gas oil (Cui et al., 2013), and others.

It is known, that the catalyst is more effective when the crystals are small or when a secondary porous network exists in the material, thereby allowing shorter diffusion paths and providing access of reagents to active sites on the surface of the catalyst. The increase in the degree of dispersion of catalysts has its limits; in addition, when using nano-particles (Koohsaryan and M. Anbia, 2016), there are difficulties in extracting a catalyst losing heterogeneity with an increase in the efficiency. Several studies (Beers et al., 2003; Maier et al., 2011) have demonstrated the beneficial effect of steaming and acid leaching on the performance of zeolite Beta resulting in the formation of secondary mesoporous structure. In the same way, catalysts were created for the selective transformation of large molecules used in pharmacy and perfumery (Tsitsishvili et al. 2017; Ramishvili et al., 2018). However, such processing is effective for high-silica zeolites like BEA (Si/Al>8), for low-silica zeolites of the FAU type (Si/Al=2.31), intensive leaching of aluminum atoms occurs, the properties

of the final product strongly depend on all processing conditions (temperature, pH, duration) and it is very difficult to achieve reproducible results. Synthesis methods for “hollow” zeolites (Pagis et al., 2016) include controlled dissolution methods leading to nanometer-sized hollow single crystals, as well as templating routes providing large polycrystalline capsules; there is no information on the production of relatively large, micrometric crystalline zeolites with nanometer-sized pores shows that recrystallization using organic templates can be an alternative to controlled dissolution, and it was concluded, that hydrothermal treatment of a macrocrystalline BEA.

The purpose of the study was to obtain a micrometric crystalline micro-mesoporous FAU type zeolite by recrystallization of Georgian natural phillipsite (Si/Al~2) without application of organic templates.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Preparation of synthetic zeolite material was carried out using phillipsite from the Akhaltsikhe field, Southern Georgia, described and characterized (Tsitsishvili et al., 1998) previously: the chemical composition is expressed by formula  $(\text{Na}_{1.36(3)}\text{K}_{0.70(2)}\text{Ca}_{0.70(3)}\text{Mg}_{0.32(1)}[\text{M}]_{0.10(1)})(\text{Al}_{4.2}\text{Si}_{11.5}\text{O}_{32}) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (M = Fe, Cu, Zn, etc.), zeolite phase content up to 70%, major impurities – quartz and clay minerals.

Sodium hydroxide and the other chemicals used in the experiments were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All chemicals were of analytical reagent grade and used without any further purification. Deionized water was used throughout this study.

### Preparation of zeolites

Processing of raw in target material included following steps: grinding and preparation of raw material, preparation of suspension, gel formation and aging, hydrothermal crystallization, and separation of product. In the experiments was used phillipsite-containing rock, crushed in the planetary micro mill Pulverisette 7 premium line (Fritsch Laboratory Instruments, Idar-Oberstein, Germany) to a size less than 0.063 mm (250 BSS mesh). Phillipsite powder was suspended in Teflon flask placed in shaking water bath OLS 26 Aqua Pro (Grant Instruments, Cambridge, UK) controlling temperature at 90-95°C; suspension was processed with a 12% hydrochloric acid solution at the rate of 5 mL per gram of the solid raw material; activated suspension was diluted with water and treated by adding of a 25% sodium hydroxide solution, followed by the formation of a homogeneous gel with chemical composition  $a\text{Na}_2\text{O} \cdot b\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{SiO}_2 \cdot c\text{H}_2\text{O}$  for about one hour. The molar ratios  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{O}/\text{Al}_2\text{O}_3$ , and  $\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{O}$ , optimal for obtaining zeolite with the FAU structure, are given in the Table 1.

**Table 13.** Optimal for the formation of the FAU structure chemical composition of the gel, and optimal for the formation of the mesopore network duration of its aging and crystallization

Molar ratio $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$	3.8
Molar ratio $\text{Na}_2\text{O}/\text{Al}_2\text{O}_3$	12
Molar ratio $\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{O}$	55
Gel aging duration, hr	96
Beginning of zeolitization, hr after start	16
Total crystallization time, hr	Up to 55

The aging of the gel was carried out at room temperature for several days; crystallization was carried out in temperature-controlled water bath; the temperature (up to 95°C) and duration have been adjusted to prepare micrometric single crystals with diameter of 2-8  $\mu\text{m}$ . The crystallization was followed by X-ray diffraction (XRD) patterns, the strongest peak at  $2\theta = 6.1^\circ$  was observed to detect the start of zeolitization and determine the time of formation of a stable structure, shown in the Table 1. Separation of produced crystalline material was carried out by filtration of mother solution, solid material was cleaned by distilled water until pH 8.0-8.5, and dried at 90-100°C.

### Characterization

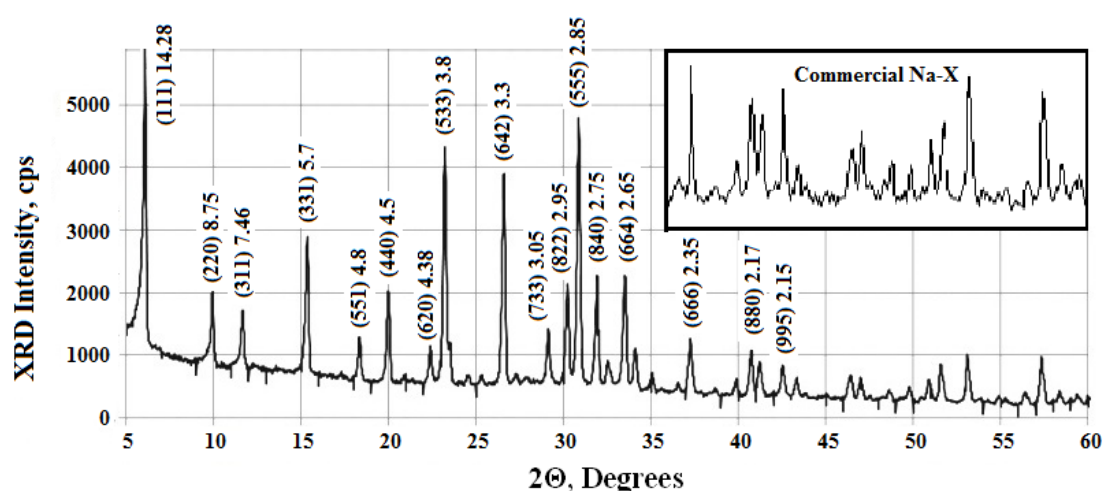
Chemical composition of raw material and prepared samples was determined by elemental analyses carried out using a 381L plasma spectrometer (Spectromom, Hungary) and atomic absorption spectrometer (model 300, Perkin-Elmer, UK), as well as by energy dispersive X-ray (EDS) analysis. The crystalline phase was identified by powder X-ray diffraction (XRD) patterns obtained from a modernized Dron-4 X-ray diffractometer (Russia) employing the Cu- $K_\alpha$  line ( $\lambda = 0.154056 \text{ nm}$ ). The samples were scanned in the  $2\theta$  range of  $5^\circ$  to  $50^\circ$  with a  $0.02^\circ$  step at a scanning speed of  $1^\circ/\text{min}$ . Fourier transform infrared spectra were

collected by a 10.4.2 FTIR spectrometer (Perkin-Elmer, UK) over the range of 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  with a resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$  using the KBr pellet technique for sample preparation. The surface morphology of the samples was observed by scanning electron microscope JSM6510LV (Jeol, Japan) equipped with X-Max 20 analyzer (Oxford Instruments, UK) for EDS. Nitrogen adsorption-desorption isotherms were measured at 77 K using an ASAP 2020 Plus physisorption analyzer (Micromeritics, Norcross, GA, USA), after evacuation of the samples at 350°C during 2 hours; water adsorption capacity was measured under static conditions.

## RESULTS

### XRD analysis and chemical composition

The XRD pattern of phillipsite recrystallization product shows not only the strongest peak at  $2\Theta = 6.1^\circ$ , but also all low intensity peaks given in the “Database of Zeolite Structures” for hydrated NaX zeolite:  $2\Theta = 10, 11.8, 15.4, 18.5, 20, 22.4, 23.3, 26.6, 29.2, 30.3, 31, 32, 33.6, 37.4, 40.8,$  and  $41.3^\circ$  (corresponding Miller indices and d-spacings are shown on Figure 1). Peaks at larger  $2\Theta$  angles cannot be attributed unambiguously, but their positions and intensities coincide with those published for a commercial zeolite and a sample synthesized from pure chemicals (Masoudian et al, 2013).

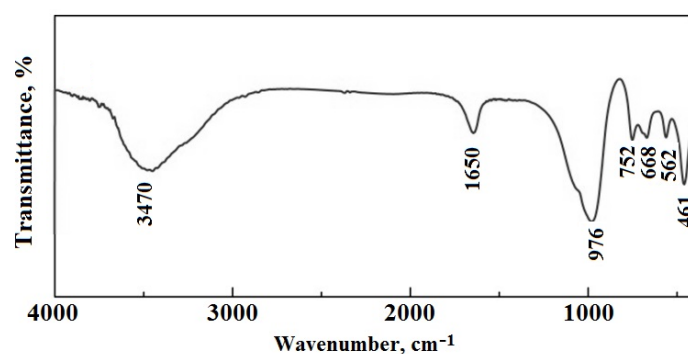


**Figure 18.** Powder XRD pattern of the material obtained from the recrystallization of phillipsite; numbers in parentheses are Miller indices (hkl) followed by d-spacings (Å), in the upper right-hand corner is a part of the XRD pattern of commercial zeolite Na-X

According to the data of the elemental and EDS analysis, counted on 384 oxygen atoms and 192 T-atoms (T = Si, Al) in the unit cell, the empirical formula of the obtained compound can be represented as  $[\text{Na}_{66(3)}[\text{Me}]_{12(1)}(\text{H}_2\text{O})_{248(10)}(\text{Al}_{78(3)}\text{Si}_{114(4)}\text{O}_{384})$  (Me = K,  $\frac{1}{2}\text{Ca}$ ,  $\frac{1}{2}\text{Mg}$ ,  $\frac{1}{2}\text{Cu}$  and  $\frac{1}{2}\text{Zn}$ , the latter is unevenly distributed). Compared to the crystal chemical formula of FAU with  $(\text{Al}_{58}\text{Si}_{134}\text{O}_{384})$  and  $(\text{H}_2\text{O})_{240}$ , the resulting compound has elevated aluminum content and reduced silicon content with about the same number of crystallization water molecules. Module  $\text{Si}/\text{Al} = 1.46 \pm 0.07$ , and the resulting material can be attributed to zeolite NaX.

### FTIR characterization

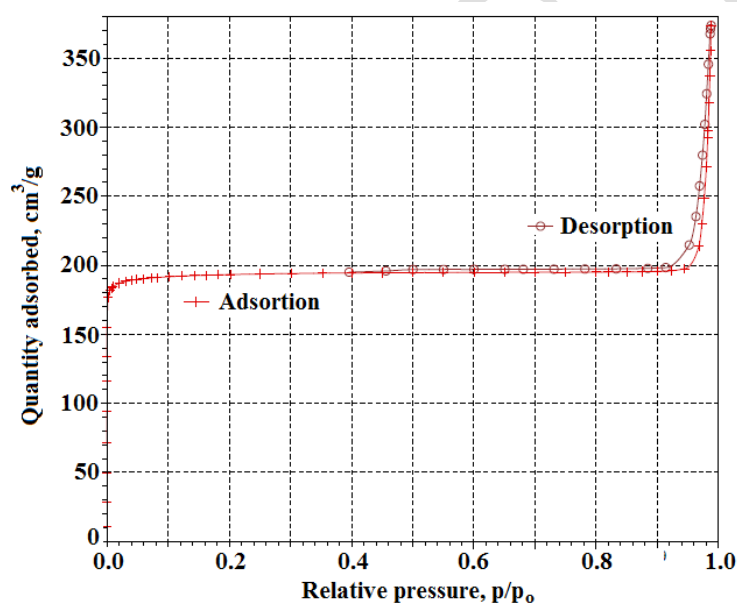
The mid infra red peak pattern in FTIR spectrum (Figure 2) testifies formation of zeolite structure. The most intensive band in the gap of 950–1200  $\text{cm}^{-1}$  that arises from the Si(Al)–O stretching vibrations, 976  $\text{cm}^{-1}$ , is shifted to the lower wavenumbers due to increased Al content (Mozgawa et al., 1999), the same takes place for the valence T–O–T vibrations recorded at 752  $\text{cm}^{-1}$ ; the internal vibration of T-O symmetric stretching at 668  $\text{cm}^{-1}$  and deformation absorption at 461  $\text{cm}^{-1}$  having little influence from the Si/Al ratio, asymmetric vibrations at 562  $\text{cm}^{-1}$ , as well as broad bands at 3470  $\text{cm}^{-1}$  (asymmetric stretching of OH group) and at 1650  $\text{cm}^{-1}$  (H–OH bending vibration bending vibration) are also observed.



**Figure 2.** FTIR spectrum of the material obtained from the recrystallization of phillipsite

### Nitrogen sorption

The N<sub>2</sub> adsorption-desorption plot at 77 K for the prepared zeolite is presented in Figure 3 and up to high relative pressures ( $p/p_0 < 0.92$ ) corresponds to typical Langmuir isotherm with the presence of steep nitrogen uptake at very low relative pressures ( $p/p_0 \sim 0.05$ ), which is attributed to the filling of micropores.



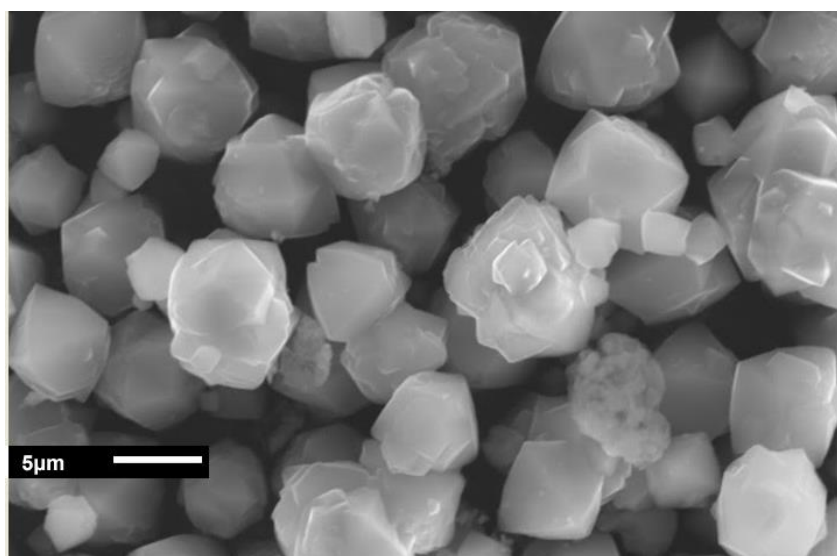
**Figure 3.** \*\*\*N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms of the material obtained from the recrystallization of phillipsite

The specific surface area calculated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method is 589 m<sup>2</sup>/g, the total pore volume is 0.578 cm<sup>3</sup>/g, the volume of micropores with a diameter of less than 8 Å is 0.301 cm<sup>3</sup>/g. Type H<sub>1</sub> (Sing et al., 1985) narrow hysteresis loop, corresponding to the filling of well defined cylindrical pore channels, is observed at high relative pressures (from 0.925 to 0.999); average channel diameter calculated by the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method from adsorption isotherm is 58 nm, from desorption isotherm – 53 nm.

Water adsorption capacity at the “plateau” pressure ( $p/p_0 = 0.40$ ) is 11.4 ± 0.5 mmole/g (0.205 ± 0.009 cm<sup>3</sup>/g), with saturated steam pressure – 22.7 ± 1.2 mmole/g (0.408 ± 0.022 cm<sup>3</sup>/g).

### Crystal morphology

In general, more than 95% of obtained crystallites have octahedral habit and uniform size of 2 – 7 μm (SEM image on Figure 4). In the process of phillipsite recrystallization, a small amount (<2wt.%) of spherical or ellipsoidal nanoscale (average diameter 0.25 μm) crystallites is also formed, while long crystallization results in micrometric crystals combined into honeycomb-like structure through nanocrystal bridges.



**Figure 4.** SEM image (x2,700) of the material obtained from the recrystallization of phillipsite

## DISCUSSION

The assignment of the main peaks of the powder XRD pattern of the material obtained makes it possible to unambiguously assign its crystal structure to the FAU type in Na-form and comparatively high aluminum content, according to the data of chemical analysis. The observed FT-IR bands are in good agreement with those reported previously for zeolite X (Flanigen et al., 1971; Wang et al., 2013; Hu et al., 2017), which further proves the successful synthesis of zeolite Na-X by recrystallization of phillipsite.

Obtaining of zeolite Na-X from a gel with molar ratio  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 3.8$  corresponds to the results of a previous study (Zhang et al., 2013), according to which a single phase Na-X zeolite was obtained from sodium silicate and sodium aluminate with the  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$  molar ratio of 1.5–4.0; recently zeolite X was prepared from coal fly ash at  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 5$  (Hu et al., 2017). The optimal conditions for the recrystallization of the phillipsite in zeolite Na-X are  $2.9\text{Na}_2\text{O}/\text{SiO}_2$  and  $\sim 50\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{O}$ . The same zeolite was synthesized from the coal fly ash at lower sodium content,  $2.2\text{Na}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ , compensated by comparatively low dilution,  $\sim 40\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{O}$  (Hu et al., 2017), synthesis of zeolite X from diatomite was carried out in conditions of slightly higher sodium content ( $3.0\text{Na}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ ) and lower dilution factor,  $40\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{O}$  (Yao et al., 2018). As can be seen, the crystal structure of phillipsite PHI (Baerlocher et al., 2007) has a rather low framework density ( $15.8\text{T}/1000\text{\AA}^3$ ), and high alkalinity is not needed for its transformation.

Aging also plays an important role in the nucleation of amorphous gel. During this stage, the aluminosilicate species included in the gel phase are transformed along with the aging conditions (Ogura et al., 2003). In the study, out of considerations of energy saving, the room temperature was chosen for aging the gel and the optimum crystallization temperature was selected below the boiling point of water, eliminating the need for an autoclave and conducting the process of hydrothermal crystallization in a water bath. Of course, this led to a significant increase in the duration of aging, from about six to ten hours to several days, but this saves more than 100 Joules per gram of the reaction mixture.

The specific surface area of prepared zeolite,  $589\text{ m}^2/\text{g}$ , is comparable to  $573\text{ m}^2/\text{g}$  for zeolite X, obtained from coal fly ash (Hu et al., 2017), and is greater than the specific surface area of  $453\text{ m}^2/\text{g}$  reported for NaX obtained from diatomite (Yao et al., 2018). The volume of micropores,  $0.301\text{ cm}^3/\text{g}$ , is slightly higher than that in zeolites X obtained from coal fly ash ( $0.281\text{ cm}^3/\text{g}$ ) and from diatomite ( $0.284\text{ cm}^3/\text{g}$ ). It was noted (Chen et al., 2016) that such a volume of micropores is much higher than that of Na-X zeolites synthesized with structure-directing reagents which block some of the channels, and this is another argument against the use of organic templates.

The hysteresis loop of the  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherms of the synthesized zeolite is different from the wide loops described for some synthetic zeolites (Ltaief et al., 2015; Yao et al., 2018) and corresponding to the filling of disordered pores (type H<sub>2</sub>) or uniform slit-shaped (type H<sub>3</sub>) intercrystal mesopores of non-rigid aggregates of plate-like particles, ascribed to the packing of zeolite crystals. On contrary, the crystal structure of the synthesized zeolite includes cylindrical channels with an average diameter of about 55 nm and a specific volume of  $0.277\text{ cm}^3/\text{g}$ , constituting 48% of the adsorption capacity of the zeolite.

Data on the adsorption of water vapor at room temperature confirm the presence of a developed system of large pores. The estimated ratio of the adsorption capacity in micropores and in large pores ( $\sim 1:1$ ) is close to

the ratio of the volumes of micropores and channels (52:48) obtained from the analysis of low-temperature adsorption-desorption isotherms of nitrogen. Water adsorption capacity reported (Chen et al., 2012) for commercial sample, 0.3303 cm<sup>3</sup>/g, is higher than the specific sorption in the micropores of the obtained sample (0.205 cm<sup>3</sup>/g), but lower than the total specific sorption (0.408 cm<sup>3</sup>/g). However, a correct comparison is difficult to carry out, since the method and conditions for measuring the adsorption of water in a commercial sample are not indicated.

Shown in Figure and published SEM micrographs suggest that prepared Na-X zeolite has a more uniform crystal size distribution compared with commercial samples from Ceca Specialty Chemicals Inc., France (Ozdemir and Pişkin, 2013), and from Nanjing Inorganic Chemical Plant, China (Chen et al., 2012).

In accordance with the data of chemical analysis, scientific weight capacity (SWC, number of ionogenic groups per gram of the ion exchanger completely converted to the H<sup>+</sup> form) of prepared zeolite is 4.876 meq/g, which is higher than the value for the ideal FAU structure (CWC<sub>FAU</sub>=3.6586 meq/g) due to the higher aluminum content (Si/Al=2.31 in FAU and Si/Al=1.46 in synthesized Na-X). This property of the obtained zeolite opens up the possibility of its use as an ion-exchanger, as well as the introduction into its structure of a significant amount of transition metals to enhance the catalytic activity.

## CONCLUSION

In this study, the recrystallization process of Georgian natural phillipsite was investigated in order to obtain a micro-mesoporous FAU type zeolite. It is found that the phase-pure zeolite with chemical composition [Na<sub>66(3)</sub>[K, ½Ca, ½Mg, ½Cu, ½Zn]<sub>12(1)</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>248(10)</sub>] (Al<sub>78(3)</sub>Si<sub>114(4)</sub>O<sub>384</sub>) can be prepared in the form of octahedral crystallites with uniform micrometric dimensions by water-bath hydrothermal crystallization of aged at room temperature aluminosilicate gel obtained from water suspension of natural phillipsite, treated with hydrochloric acid and mixed with sodium hydroxide. The following optimal conditions for the production of zeolite are established: gel composition 2.9Na<sub>2</sub>O: 0.26Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 1SiO<sub>2</sub>: 150H<sub>2</sub>O, aging time 96 hours, crystallization temperature 95°C, duration from 16 to 55 hours.

Powder XRD pattern and FTIR spectrum testify the FAU type zeolite crystal structure, the nitrogen adsorption-desorption isotherms indicate a high specific surface area of the pores, 589 m<sup>2</sup>/g, including micropores with a diameter of less than 0.8 nm and a specific volume of 0.301 cm<sup>3</sup>/g, as well as cylindrical mesopores with an average diameter of 55 nm and a specific volume of 0.277 cm<sup>3</sup>/g.

The resulting Na-X zeolite in sorption and ion-exchange capacity and other characteristics is competitive with commercially available materials, and can be tested in catalytic processes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from Shota Rustaveli National Science Foundation of Georgia (Project FR-17\_187).

## REFERENCES

- Bacakova L, Vandrovцова M, Kopova I, Jirka I 2018. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomaterials Science*, 6: 974-989.
- Baerlocher Ch, McCucker LB, Olson DH 2007. Atlas of zeolite framework types. Sixth revised edition. Amsterdam: Elsevier, 398 pp.
- Bagherzadeh M, Zare M 2012. Synthesis and characterization of NaY zeolite-encapsulated Mn-hydrazone Schiff base: an efficient and reusable catalyst for oxidation of olefins. *Journal of Coordination Chemistry*, 65(22): 4054-4066.
- Bastani D, Esmaeili N, Asadollahi M 2013. Polymeric mixed matrix membranes containing zeolites as a filler for gas separation applications: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19: 375-393.
- Beers AEW, van Bokhoven JA, de Lathouder KM, Kapteijn F 2003. Optimization of zeolite Beta by steaming and acid leaching for the acylation of anisole with octanoic acid: a structure–activity relation. *Journal of Catalysis*, 218(2): 239-248.
- Chen D, Hu X, Shi L, Cui Q, Wang H, Yao H 2012. Synthesis and characterization of zeolite X from lithium slag. *Applied Clay Science*, 59-60: 148-151.
- Chen Y, Xu T, Xie C, Han H, Zhao F, Zhang J, Song H, Wang B 2016. Pure zeolite Na-P and Na-X prepared from coal fly ash under the effect of steric hindrance. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91: 2018-2025.
- Cui Q, Zhou Y, Wei Q, Yu G, Zhu L 2013. Performance of Zr- and P-modified USY-based catalyst in hydrocracking of vacuum gas oil. *Fuel Processing Technology*, 106: 439-446.



- Ennaert T, Van Aelst J, Dijkmans J, De Clercq R, Schutyser W, Dusselier M, Verboekend D, Sels BF 2016. Potential and challenges of zeolite chemistry in the catalytic conversion of biomass. *Chemical Society Reviews*, 45: 584–611.
- Flanigen EM, Khatami H, Szymanski HA 1971. Infrared structural studies of zeolite frameworks. *Advanced Chemical Series*, 101: 201-229.
- Hu T, Gao W, Liu X, Zhang Y, Meng C 2017. Synthesis of zeolites Na-A and Na-X from tablet compressed and calcinated coal fly ash. *Royal Society Open Science*, 4(10): 170921-170934.
- Izidoro JDC, Fungaro DA, Abbott JE, Wang S 2013. Synthesis of zeolites X and A from fly ashes for cadmium and zinc removal from aqueous solutions in single and binary ion systems. *Fuel*, 103: 827-834.
- Koohsaryan E, Anbia M 2016. Nanosized and hierarchical zeolites: A short review. *Chinese Journal of Catalysis*, 37: 447-467.
- Li Y, Li L, Yu J 2017. Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem*, 3: 928-949.
- Ltaief OO, Siffert S, Fourmentin S, Benzina M 2015. Synthesis of faujasite type zeolite from low grade Tunisian clay for the removal of heavy metals from aqueous waste by batch process: Kinetic and equilibrium study. *Comptes Rendus Chimie*, 18: 1123-1133.
- Masoudian SK, Sadighi S, Abbasi A 2013. Synthesis and characterization of high aluminum zeolite X from technical grade materials. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*, 8(1): 54-60.
- Mintova S, Jaber M, Valtchev V 2015. Nanosized microporous crystals: emerging applications. *Chemical Society Reviews*, 44: 7207-7233.
- Montalvo S, Guerrero L, Borja R, Sánchez E, Milán Z, Cortés I, Rubias MA 2012. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, 58: 125-133.
- Ogura M, Kawazu Y, Takahashi H, Okubo T 2003. Aluminosilicate species in the hydrogel phase formed during the aging process for the crystallization of FAU zeolite. *Chemistry of Materials*, 15: 2661-2667.
- Pagis C, Morgado Prates AR, Farrusseng D, Bats N, Tuel A 2016. Hollow zeolite structures: an overview of synthesis methods. *Chemistry of Materials*, 28(15): 5205-5223.
- Park J, Ahmed Ali S, Alhooshani K, Azizi N, Miyawaki J, Kim T, Lee Y, Kim HS, Yoon SH, Mochida I 2013. Mild hydrocracking of 1-methyl naphthalene (1-MN) over alumina modified zeolite. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19: 627-632.
- Ramishvili TsM, Tsitsishvili VG, Ivanova II, Bukia TJ, Kurtsikidze GO, Kokiashvili NG 2018. Catalytic conversion of geraniol on micro- and micro-mesoporous beta-type zeolite. *International Journal of Recent Scientific Research*, 9(3): 25454-25460.
- Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquérol J, Siemieniowska T 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57: 603-612.
- Tsitsishvili V, Dolaberidze N, Alelishvili M, Tsintskaladze G, Sturua G, Chipashvili D, Nijaradze M, Khazaradze N 1998. Adsorption and thermal properties of zeolitic rocks from newly investigated deposit plots in Georgia. *Georgian Engineering News*, 2(6): 61-65.
- Tsitsishvili V, Ivanova I, Ramishvili Ts, Kokiashvili N, Bukia T, Dobryakova I, Kurtsikidze G 2017. Catalytic conversion of linalool on micro-mesoporous BEA-type zeolite. *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences*, 11(3): 79-87.
- Wang C, Zhou J, Wang Y, Yang M, Li Y, Meng C 2013. Synthesis of zeolite X from low-grade bauxite. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88: 1350-1357.
- Yao G, Lei J, Zhang X, Sun Z, Zheng S 2018. One-step hydrothermal synthesis of zeolite X powder from natural low-grade diatomite. *Materials*, 11: 906-920.
- Zhang X, Tang D, Zhang M, Yang R 2013. Synthesis of NaX zeolite: Influence of crystallization time, temperature and batch molar ratio SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the particulate properties of zeolite crystals. *Powder Technology*, 235: 322-328.

## Heterotrof ve mikсотrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin yağ birikimine etkisi

Togayhan Kutluk, \*Nurcan Kapucu

Kocaeli Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: nurcan.kapucu@kocaeli.edu.tr

### Özet

Mikroalgler diğer mikroorganizmalardan daha yüksek miktarda yağ içermektedir. Bu nedenle biyodizel üretimi için hammadde kaynağı olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar son yıllarda artmıştır. Enerji maliyetlerini düşürmek ve endüstriyel uygulamalar için mikroalglerin daha yüksek oranda yağ biriktirmesine izin veren uygun büyüme ve üretim koşulları altında bir fermentör ile kontrol edilen heterotrofik kültürler geliştirilmektedir. Bu çalışmada heterotrof ve mikсотrof koşullarda yetiştirilen *Chlorella variabilis* türü mikroalgin yağ içeriği ve yağ asidi bileşimi incelenmiştir. Mikroalgler 100 ml erlenlerde kültüre alınmışlardır. Heterotrof koşullar için besi ortamlarına karbon kaynağı olarak 0, 2, 5 gr/L derişimlerde saf gliserol eklenmiştir. Mikсотrof koşullar ise aynı şartlardaki kültür ortamının 4 Klüks ışık şiddeti kullanılarak sürekli aydınlatılmasıyla sağlanmıştır. Heterotrof koşullarda, 28 günlük kültür sonucunda, en yüksek mikroorganizma derişimi ( $X_{max}, 1 \text{ g/L}$ ), büyüme hızı ( $\mu_{max}, 0,0085 \text{ h}^{-1}$ ) ve yağ verimliliği ( $7,14 \times 10^{-3} \text{ g/Lgün}$ ) 5 g/L gliserol bulunan kültürde elde edilmiştir. Ayrıca besin ortamında bulunan karbon kaynağı miktarı arttıkça yağ asitlerinin yüksek molekül ağırlıklı asitlere doğru gelişme gösterdiği ve buna bağlı olarak ortalama molekül ağırlığının da arttığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroalg yağı, *Chlorella*, heterotrof, mikсотrof, microalgae, gliserol

### The effect of heterotroph and mixotroph conditions on the accumulation of *Chlorella variabilis* microalge oil

#### Abstract

Microalgae contain higher amounts of oil than other microorganisms. For this reason, studies to use as a source of raw materials for biodiesel production have increased in recent years. Heterotrophic cultures that are controlled by a fermentor are developed under appropriate growth and production conditions allowing microalgae to accumulate higher amounts of oil for industrial applications and to reduce energy costs. In this study, *Chlorella variabilis* microalg oil content and fatty acid composition changes were investigated in heterotroph and mycotrophic conditions. Microalgae were cultured in 100 ml flasks. 0, 2, 5 g / L of pure glycerol were added to the medium as a carbon source for heterotroph conditions. A mixotroph conditions under the same conditions was achieved by continuous illumination using 4 Klux intensity. As a result of 28 days culture for heterotroph conditions, the highest microorganism concentration ( $X_{max}, 1 \text{ g / L}$ ), growth rate ( $\mu_{max} 0,0085 \text{ h}^{-1}$ ) and oil productivity ( $7,14 \times 10^{-3} \text{ g / L.day}$ ) in 5 g / L glycerol media were obtained. In addition, as the amount of carbon source in the nutrient medium increases, it is determined that fatty acids develop towards high molecular weight acids and accordingly the average molecular weight increases.

**Keywords:** Microalgae oil, *Chlorella*, heterotroph, mixotroph, microalgae, glycerol

### GİRİŞ

Mikroalgler, havuz, göl gibi açık sistemlerde ya da kontrollü kapalı sistemlerde üretilebilirler. Bazı mikroalg türleri, koşulların çok özel olduğu durumlarda (yüksek tuz ya da alkali) açık üretim için uygundur. Bu sistemlerin avantajı düşük yatırım ve üretim maliyetine sahip olmaları ve kolay düzenlenebilmeleridir. Bunun yanı sıra, açık sistemlerde buharlaşmadan dolayı sıvı kaybı olmakta, kontaminasyona maruz kalabilmekte ve olumsuz çevre koşulları nedeniyle biyokütle üretimi sınırlamaktadır. Bu tür sistemlerde kontaminasyona dirençli türlerin kullanılması gerekmektedir (Altın, 2017). Farklı işletme koşullarına sahip farklı sistemlerde mikroalg üretimi yapılabilmektedir. Fotobiyoreaktör seçiminde önemli olan üretilecek mikroorganizma türü ve istenen üründür. Örneğin biyodizel üretiminde hammadde kaynağı olarak kullanılacak mikroalg yağı elde edilmesinde açık havuzlar ve büyük hacimler daha verimli olacaktır. Diğer yandan tıbbi sektörde ve gıda maddesinde kullanılacak mikroalg üretimi için daha stabil koşulları sağlayan özel tip fotobiyoreaktörler seçilmelidir. Bazı mikroalg türlerinin ototrof yerine heterotrof üretimi ile bünyesinde değerli ürünlerin (yağ, karbonhidrat, protein) miktarı artırılabilir. Heterotrofik mikroalgler, karanlık ortamda organik karbonu

kullanarak büyüme gösterirler (Elcik ve Çakmakçı, 2017). Miksotrof mikroalgler hem ototrof hem de heterotrof beslenmenin birleşimi özelliğini taşırlar. Karbon kaynağı olarak ortamda bulunan hem organik karbonu hem de inorganik karbonu kullanırlar (Xu ve Wu, 2006). Miksotrofik biyoreaktör ortamına glikoz, galaktoz, mannoz, fruktoz, sükroz ve laktöz gibi organik karbon substratları eklenmektedir. Enerji organik karbondan elde edilir ve hücre üretiminde kullanılır, aynı zamanda ışık enerjisinden elde edilen kimyasal enerji hücre metabolizması için depolanmaktadır. Ortamın pH'ı üretim veya yetiştirme koşullarına göre değişmektedir. Örneğin ototrofik kültürlerde mikroalgler inorganik karbonu kullanır ve hidroksil üretirler bu nedenle ortam pH'ı yükselir. Heterotrofik kültürlerde ise mikroalgler organik karbonu kullanarak CO<sub>2</sub> üretirler bu nedenle ortamın pH'ı düşmektedir. Mikroalglerin heterotrof ve miksotrof koşullarda yetiştirilmesi ile ilgili olarak Liang ve diğ., (2009) tarafından yapılan çalışmada, *Chlorella vulgaris* için farklı büyüme koşullarında yağ içeriğindeki değişimi araştırmışlardır. Kültürler ototrofik ve heterotrofik olarak büyümeye alınmışlar, ototrofik büyüme ile daha yüksek yağ içeriği (%38), heterotrofik büyümede ise glukoz, asetat ve gliserol kullanımı ile çok daha az yağ üretimi olduğunu belirtmişlerdir. Chen ve Walker'ın 2015 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada, karbon kaynağı olarak gliserolu kullanarak heterotrof koşullarda yetiştirilen *Chlorella protothecoides* türü mikroalg için yüksek hücre derişimi ( $x_{max}= 45,2$  g/L) ve yağ içeriği (54.2%) elde etmişlerdir. Miksotrofik koşullarda yetiştirilen *Chlorella vulgaris* türü ile yapılan bir diğer çalışmada ise, yüksek hücre derişimi (8,35 g/L) elde edilirken aynı zamanda mikroorganizma yağ içeriğinin de arttığını belirlemişlerdir (Roostaei ve diğ., 2018). Bu çalışmada heterotrof ve miksotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin yağ birikimine etkisi araştırılmış, aynı zamanda elde edilen yağın yağ asidi bileşimleri incelenerek biyodizel üretimi için hammadde kaynağı olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Malzemeler ve besin ortamı**

Araştırmalarda kullanılan mikroalg türü *Chlorella variabilis*, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden temin edilmiştir. Sıvı stok kültür üretimleri BG-11 besin ortamında yapılmıştır. BG-11 besin ortamında olması gereken kimyasallar Tablo 1'de verilmiştir. Kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich ve Merck firmasından satın alınmıştır.

### **Heterotrof ve miksotrof kültürlerin üretimi**

Mikroalgler 100 ml hacminde erlenlerde 75 ml sıvı kültüre alınmışlardır. Kültürlerde karıştırma yoktur ve havalandırma yüzeyden olacak şekilde doğaldır. BG 11 kültür ortamına hacimce % 6 oranında aşılama yapılmıştır. Besi ortamlarına sırası ile 2 ve 5 g/L derişimlerde saf gliserol eklenmiştir. Miksotrof koşullarda aydınlatma 4 Klüks olacak şekilde Osram marka led ampüller ile sağlanmıştır. Deney düzenekleri başka kaynaktan ışık almayacak şekilde kapalı odalarda yapılmıştır. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde UV-VIS spektrofotometre ile 600nm'de absorbans ölçülerek büyüme izlenmiş, aynı zamanda kültür ortamı pH (Mettler Toledo pH metre) ve sıcaklık değişimleri ölçülmüştür. Kültürlerde logaritmik evrenin bitimi ve duraklama evresinin izlenmesi, optik yoğunluk değerlerine göre yapılmıştır. Deneyin sona erdirilmesinden hemen sonra santrifüj yardımı ile kültürler 4000 rpm de 5 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen yaş mikroorganizmalar santrifüj tüplerinde 60 °C' de altı saat süre ile Visewen marka etüvde sabit tartıma ulaşınca kadar kurutulmuştur.

### **Mikroalglerin Yağ miktarı tayini**

Yağ analizleri Dyer, 1959 yöntemine göre yapılmıştır. Yağ miktarı analizi ayrıntılı olarak önceki çalışmalarımızda belirtilmiştir (Kutluk, 2019).

**Tablo 1.** BG11 besi ortamı (1000 ml için)

Kimyasal	Miktar (g)
Sodyum nitrat (NaNO <sub>3</sub> )	1,5000
Potasyum di hidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,0400
Magnezyum sülfat hepta hidrat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0,0750
Kalsiyum klorür di hidrat (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,0360
Borik asit (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0,0029
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0,0200
Sitrik asit (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	0,0060
Demir(III) sitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> )	0,0060
Vitamin	0,0200

#### Yağ asidi bileşimi tayini

Yağ asidi bileşimi alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve 30 m x 320 µm x 0.25 µm kapiler kolon (CARBOWAX 20M) ile donatılmış olan GC 7820 Agilent marka gaz kromatografi cihazı kullanılarak tayin edilmiştir (David ve diğ., 2005).

#### Mikroorganizma büyüme hızı ve hücre ikilenme süresinin belirlenmesi

Farklı koşullarda yetiştirilen mikroalglerin spesifik büyüme hızları Denklem (1)'e göre hesaplanmıştır.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Formülde X<sub>2</sub> ve X<sub>1</sub>, logaritmik (üstel) büyüme evresinde t<sub>2</sub> ve t<sub>1</sub> zamanlarındaki biyokütle derişimlerini belirtmektedir.

Mikroalg hücrelerinin ikilenme (doubling time (DT)) süresi Denklem (2)'ye göre hesaplanmıştır.

$$DT = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

#### Setan sayısı hesabı

Mikroalglerden elde edilen yağların yağ asitleri setan sayıları Denklem 3'e göre belirlenmiştir (Klopfenstein, 1982).

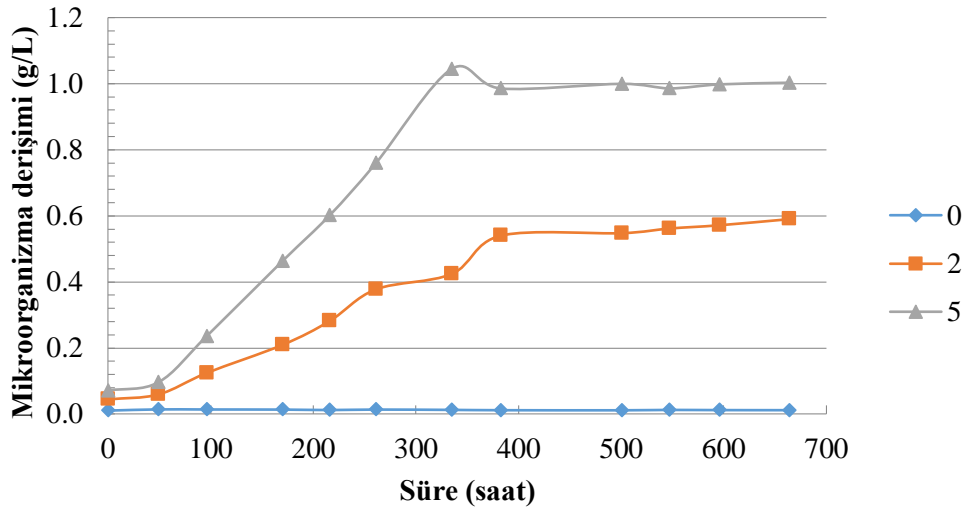
$$\text{Setan sayısı} = 58,1 + 2,8 [(n-8)/2] - 15,9 \times \text{çift bağ sayısı} \quad (3)$$

Formülde n karbon sayısını belirtmektedir.

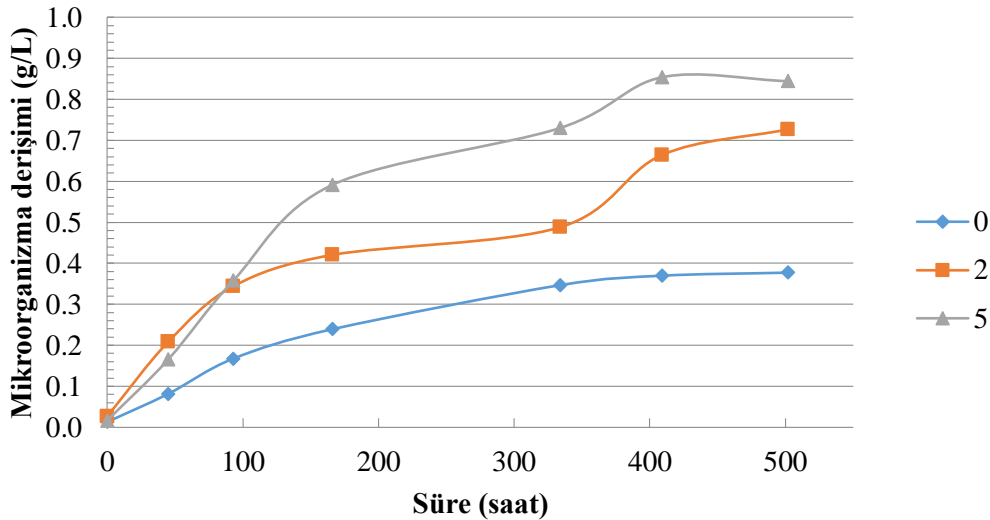
#### BULGULAR ve TARTIŞMA

Heteretrof koşulların etkisinde besi ortamındaki gliserol derişiminin artması *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyümesi üzerine olumlu yönde etki göstermiştir. Gliserol içermeyen kültür ortamında büyüme yok denecek kadar az olmuş, mikroorganizma ortamda ışık ve herhangi bir karbon kaynağı olmadığından dolayı fotosentez yapamayarak büyüme için gerekli olan enerjiyi elde edememiştir. Ortamda 2g/L ve 5 g/L

gliserol olan kültürlerde farklı hızlarda büyüme 335. saate kadar gözlenmiş, daha sonra durağan faza geçmiştir (Şekil 1). Miksotrof koşullarda da besin ortamındaki gliserol derişiminin artması mikroorganizma büyümesini üolumlu yönde etkilediği Şekil 2’den görülmektedir. Karbon kaynağından yoksun kültürde ışık enerjisinden dolayı büyüme heterotrof kültüre göre daha iyi olmuştur. Miksotrof ortamda mikroorganizma karbonu kullanırken hem de fotosentez yaparak büyümüştür. Ortamlardaki büyüme farklı hızlarda 400. saate kadar gözlenmiş, daha sonra durağan faza geçmiştir (Şekil 2). Mikroorganizma büyüme hızları, yağ içerikleri ve verimlilikleri heterotrof ve miksotrof koşullar için sırasıyla Tablo 1 ve 2’de verilmiştir. Her iki kültür ortamı için 5 g/L gliserol kullanımı ile en yüksek değerler elde edilmiş, heterotrof kültürlerde biraz daha yüksek hücre derişimlerine ulaşılırken, miksotrof koşullarda büyüme dört kat daha hızlı olmuş, yağ verimlilikleri ise benzer büyüklükte elde edilmiştir. Heterotrof kültür kullanımında, en yüksek mikroalg derişimi, büyüme hızı ve yağ verimliliği 28 günlük kültür sonunda sırasıyla,  $X_{max}=1$  g/L,  $\mu_{max}=0,0085$  h<sup>-1</sup> ve  $7,14 \times 10^{-3}$  g/Lgün olarak (Tablo 1) elde edilmiş, bu değerler miksotrof koşullarda ise 21 günlük kültür sonunda sırasıyla,  $X_{max}=0.84$  g/L,  $\mu_{max}=0,033$  h<sup>-1</sup> ve  $6,4 \times 10^{-3}$  g/Lgün olarak (Tablo 2) belirlenmiştir. Besi ortamında artan gliserol miktarına bağlı olarak hücrenin ikiye katlama süresi de hızlanmıştır



Şekil 1. Heterotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyümesi üzerine etkisi



Şekil 2. Miksotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyümesi üzerine etkisi

**Tablo 1.** Heterotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyüme hızına ve yağ içeriğine etkisi

Gliserol miktarı (g/L)	$X_{max}$ (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Hücrelerin ikilenme süresi (saat)	Yağ İçeriği (%)	Yağ verimliliği g/Lgün (x10 <sup>-3</sup> )
0	-	-	-	-	-
2	0,590	0,0065	106	19	4,000
5	1,000	0,0085	82	20	7,140

**Tablo 2.** Miksotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyüme hızına ve yağ içeriğine etkisi

Gliserol miktarı (g/L)	$X_{max}$ (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	Hücrelerin ikilenme süresi (saat)	Yağ İçeriği (%)	Yağ verimliliği g/Lgün (x10 <sup>-3</sup> )
0	0,38	0,018	39,3	13	2,3
2	0,73	0,028	25,2	15	5,2
5	0,84	0,033	20,9	16	6,4

Heterotrof koşullarda, 2 g/L gliserol içeren ortamda mikroalgin yağ asidi bileşimi incelendiğinde C14:0 (Miristik) asitce zengin olduğu belirlenmiş, yağın ortalama molekül ağırlığı ise 704,3 g/mol olarak hesaplanmıştır. 5 g/L gliserol içeren ortamda ise diğer ortama göre C14:0 (Miristik) asit miktarında belirli bir azalma ile beraber C24:0 (tetrakosanoik) asidi oluşumunun da benzer miktarda olduğu gözlenmiş ve yağın ortalama molekül ağırlığı 774,63 g/mol olarak belirlenmiştir. 2 ve 5 g/l gliserol içeren ortamlarda Setan sayısı baskın yağ asidi C14:0'a göre 66,5 olarak belirlenmiştir.

Miksotrof koşullar etkisinde ise, 2 g/L gliserol içeren ortamda mikroalgal yağın C15:0 (Pentadeklik) asitce zengin olduğu, Setan sayısı ve molekül ağırlığı ise sırasıyla, 67,9 ve 765,3 g/mol olarak belirlenmiştir. 5 g/L gliserol içeren ortamda diğer ortama göre C15:0 (Pentadeklik) asit miktarında belirli bir azalma ile beraber C14:0 (Miristik) ve C14:1 (miristoleik) asitlerinin de oluştuğu, C14:0 (Miristik) asitce zengin olduğu (%59,96) belirlenmiş, Setan sayısı ve molekül ağırlığı ise sırasıyla 66,5 ve 704.35 g/mol olarak bulunmuştur. Besin ortamında bulunan karbon kaynağı miktarı arttıkça yağ asitlerinin yüksek molekül ağırlıklı asitlere doğru gelişme gösterdiği ve buna bağlı olarak ortalama molekül ağırlığının da arttığı belirlenmiştir. Setan sayısı dizel yakıt için 55- 60 aralığında iken, biyodizel için bu değer 55-75 arasında değişmektedir. Biyodizeldeki yağ asitlerinin karbon sayısı arttıkça, setan sayısı da buna göre arttığı bilinmektedir. Literatürde heterotrof ve miksotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin yağ üretimine ve yağ asidi bileşimine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## SONUÇ

Bu çalışmada, heterotrof ve miksotrof koşulların *Chlorella variabilis* türü mikroalgin büyüme hızına ve yağ içeriğine etkileri araştırılmış, elde edilen mikroalg yağlarının yağ asidi bileşimleri incelenerek biyodizel hammadde kaynağı olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Yüksek mikroorganizma ve yüksek yağ verimliliği açısından heterotrof koşullar önerilmektedir.
- Her iki koşulda da elde edilen mikroalg yağları setan sayılarının yüksek olması nedeniyle biyodizel üretiminde hammadde olarak kullanılabilirliği gelecek çalışmalar için ümit verici olmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi 2017/060 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Altın N., *Chlorella Variabilis* Türü Mikroalgin Büyümesine ve Yağ İçeriğine Etki Eden Parametrelerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2017, 511154.

- Elcik H., Çakmakcı M., Mikroalg Üretimi Ve Mikroalglerden Biyoyakıt Eldesi, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 2017, 32, 795-820.
- Xu H, Miao X, Wu Q, High Quality Biodiesel Production From a Microalga *Chlorella Protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters, Journal Of Biotechnology, 2006, 126, 499–507.
- Roostaei J., Zhang Y., Gopalakrishnan K., Alexander J. O., Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-Efficiency of Biofuel Feedstock Production, Scientific Reports, 2018, 8, 1-10.
- Liang Y., Sarkany N., Cui Y., Biomass And Lipid Productivities Of *Chlorella Vulgaris* Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions, Biotechnology Letters, 2009, 31, 1043-1049.
- David F., Sandra P., Vickers A. K., Column selection for the analysis of fatty acids methyl esters, Application Agilent Technologies, 2005, 1-5.
- Kutluk T., Farklı *Chlorella* Türlerinin Biyodizel ve Atık Su Arıtımında Kullanılmak Üzere Üretimi, Doktora Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2019, No: 10244242.
- Klopfenstein W. E., Estimation of Cetane Index for Esters of Fatty Acids, Journal of American Oil Chemists Society, 1982, 59(12), 531–533.

## Immunohistochemical evaluation of ADAMTS-5 expression in umbilical cord of gestational diabetic and preeclamptic patients

Fırat Şahin<sup>1</sup>, Ebru Gökalp-Özkorkmaz<sup>1\*</sup>, Fırat Aşır<sup>1</sup>, Şenay Deveci<sup>2</sup>, Engin Deveci<sup>1</sup>

<sup>\*1,1</sup> Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology & Embryology, Diyarbakır, Turkey.

<sup>2</sup> Dicle University Atatürk Vocational School of Health, Diyarbakır, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: ebrug76@gmail.com

### Abstract

Gestational Diabetes Mellitus (GDM) is defined as glucose tolerance disorder observed during pregnancy. Preeclampsia is a clinical syndrome characterized by hypertension and proteinuria after 20th week of pregnancy. ADAMTS proteases play a regulatory role in the formation of extracellular matrix and in the implantation and maintenance of pregnancy. Changes in extracellular matrix are considered to be one of the leading causes of GDM. Similarly, changes in the structures of cell matrix are observed in the placentas of preeclamptic patients. The aim of this study was to examine and compare the ADAMTS-5 expression in umbilical cords of patients with GDM and preeclampsia. Placental tissues were collected from women with normal (n = 10), GDM (n=10) and preeclamptic pregnancies (n = 10). Samples were fixed in 10% formaldehyde, following routine paraffin protocol, sections of 4–6 µm were cut with a microtome. Primary antibody ADAMTS-5 was applied for overnight and secondary antibody. Then counterstained with Hematoxylin and examined under light microscope. In control group, ADAMTS-5 expression was positive in amniotic epithelial cells of umbilical cord. Endothelial and muscle cells of arteries, vein and fibroblast cells in mucous connective tissue showed negative ADAMTS-5 expression. In preeclampsia group, ADAMTS-5 expression was positive in amniotic epithelial cell layers, in fibroblast cells of connective tissue of umbilical cord. In GDM group, cells of mucous connective tissue were mostly negative for ADAMTS expression but, fibers conjunction areas and fibroblasts were positive. ADAMTS-5 expression was significantly observed in muscle cells of arteries. As a conclusion, in preeclampsia, ADAMTS-5 expression was positive in umbilical cord connective tissue and amniotic membrane. Concominantly, ADAMTS-5 expression was observed in muscle layer of umbilical cord vessels in the samples with GDM. We suggest that preeclampsia is more effective on extracellular matrix structure in the membrane level however, GDM is more effective on muscle cells.

**Keywords:** Preeclampsia, GDM, umbilical cord, ADAMTS-5, immunohistochemistry.

### INTRODUCTION

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a glucose tolerance disorder observed during pregnancy (Alfadhli, 2015). GDM as a medical complication, affects 2%-5% of pregnant woman and has adverse impacts on health of mother such as maternal death and future diabetic complications and also fetus; intrauterine growth restriction, macrosomia, premature birth and neonatal morbidity (Gilmartin et al, 2008).

Preeclampsia (PE) is one of the most significant and frightening conditions in pregnancy, the pathophysiology of PE is still unclear (Cornelius 2018). Symptoms of the condition are associated with the pregnancy itself and these symptoms resolve when the pregnancy ends. The presence of the placenta is compulsory for the occurrence of this disease. PE is a multisystem disorder that complicates 2%-8% of pregnancies, characterized by hypertension and proteinuria after 20th week of pregnancy (Uzan et al, 2011; Sircar et al., 2015).

ADAMTS family consists of 19 associated proteases that play important roles in formation of extracellular matrix. Their functions include; collagen processing, cleavage of the matrix proteoglycans, inhibition of angiogenesis, blood coagulation homeostasis. Also involved in organogenesis, inflammation and fertility. ADAMTS-5 is also known as aggrecan -2, a major component of extracellular matrix and ADAMTS-5 gene known to be expressed in bladder, cervix, esophagus, plasenta and uterus (Porter et al., 2005). Previous studies showed that ADAMTS family plays a regulatory role in implantation and maintenance of pregnancy (Kelwich et al., 2015). Conditions such as changes in extracellular matrix and abnormal location are considered to be leading causes of GDM (Melekoğlu et al., 2019a). The possible connection of ADAMTS to GDM could arise from the extracellular matrix variations in particular.

In this context, the aim of this present study was to examine ADAMTS-5 expression in umbilical cord of patients with preeclampsia and GDM.



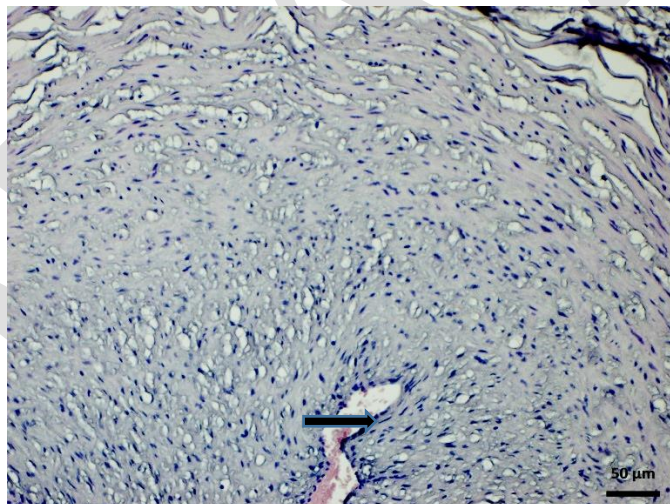
## MATERIALS AND METHODS

The study was allowed by Dicle University Medical Faculty Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee. All patients were informed and accepted approval of experiment. Twenty normal pregnancy, twenty GDM and twenty preeclamptic placentas were obtained from Obstetrics and Gynecology Clinics of Dicle University. Three groups were organized as control, GDM and preeclampsia group. Small portions of umbilical cords were dissected from all placentas for routine histology tissue procedure and soaked in 10% neutral formalin solution. Umbilical cords were followed to routine paraffin wax embedding procedure. Cord blocks were cut with microtome and 4-5  $\mu$ m sections were stained with Hematoxylin Eosin. The remaining sections were treated for immunohistochemistry. The sections were brought to distilled water and then treated with phosphate buffered saline (PBS). For antigen retrieval procedure, sections were heated in microwave at 700 ° C for 8 minutes within Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) buffer solution. Samples were washed with PBS and treated with 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes. After washing in PBS, tissues were incubated with the blocking solution (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA). Primary antibody anti-ADAMTS-5 (lot # ab41037, Abcam, Cambridge, MA 02139-1517, USA) was dropped on slides and incubated at + 4°C overnight. Next day, sections were allowed to warm at room temperature for 1 hour. Washing in PBS, secondary antibody (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) was applied for 14 minutes. After PBS, sections were soaked with streptavidin peroxidase (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) for 15 minutes. Chromogen DAB (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) was treated for 5-10 minutes. Sections were counter stained with Harris Hematoxylin, passed through ascending alcohols, clearing in xylene, mounted with Entellan. Histopathology and immunoexpression analysis were done under imager A2 Zeiss light microscope.

## RESULTS

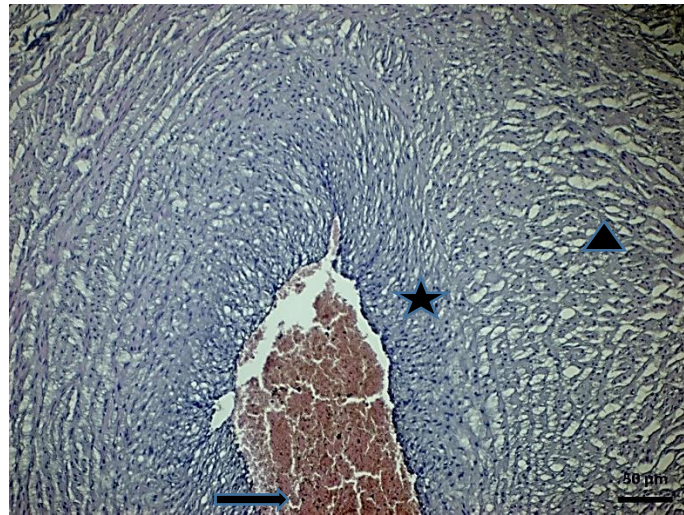
### a. Histopathological Results

Control group sections of umbilical cord revealed normal appearance with a narrow umbilical artery lumen and regular endothelium (Figure 1).



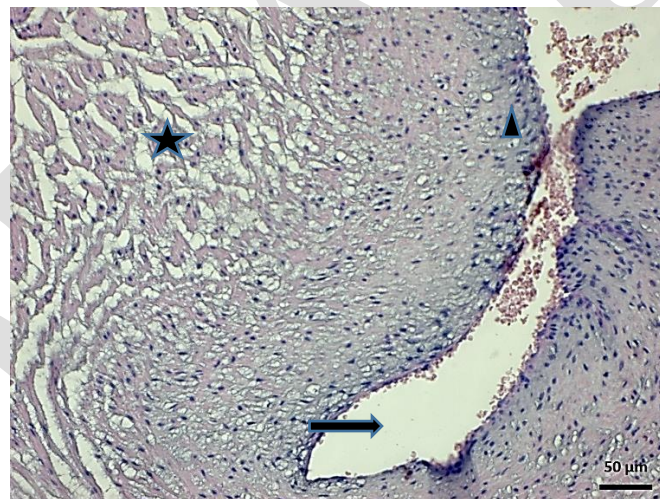
**Figure 1.** Control group, transverse section of umbilical cord, umbilical artery with narrow lumen (arrow), regular endothelium. H-E staining, Bar: 50  $\mu$ m

Histopathological examinations on umbilical cord of preeclampsia group depicted umbilical artery with dilated lumen and congestion, hyperplasia in endothelial cells, wide fenestrations between muscle cells and also degeneration of collagen structure in connective tissue (Figure 2).



**Figure 2.** Preeclampsia group umbilical cord, umbilical artery with dilated lumen (arrow) and congestion, hyperplasia in endothelial cells (asterisk), wide fenestrations between muscle cells (arrow head), degeneration in connective tissue collagen structure H-E staining, Bar: 50 μm

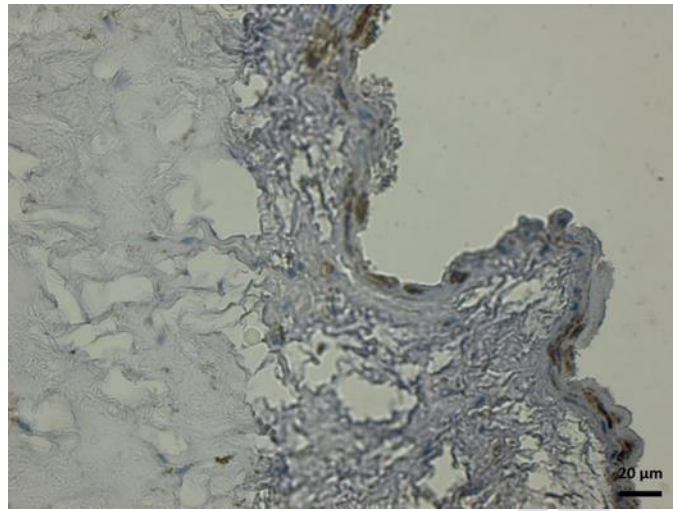
Umbilical cord sections of GDM patient showed dilated umbilical cord artery, pyknosis in endothelial cells, vacuol formation and edema in subendothelial region. An increase in collagen degeneration was apparent (Figure 3).



**Figure 3.** GDM group, dilated umbilical cord artery (arrow), pyknosis in endothelial cells, vacuol formation (arrow head) and edema in subendothelial region, increase in collagen degeneration (asterisk) H-E staining, Bar: 50 μm

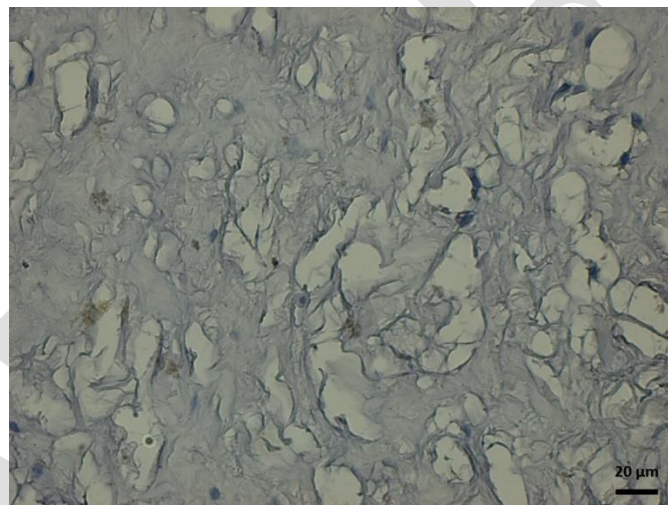
#### **b. Immunohistochemical Results**

In umbilical cord of control group, ADAMTS-5 expression was positive in amniotic epithelial cells of umbilical cord (Figure 4).



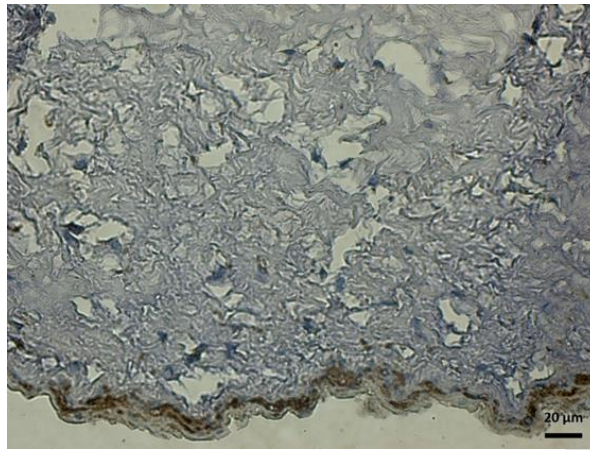
**Figure 4.** Control group, positive ADAMTS-5 expression in amniotic epithelial cells of umbilical cord. ADAMTS-5 immunostaining, Bar: 20 μm

In endothelial and muscle cells of arteries and vein and fibroblast cells in mucous connective tissue of control group showed negative ADAMTS-5 expression (Figure 5).

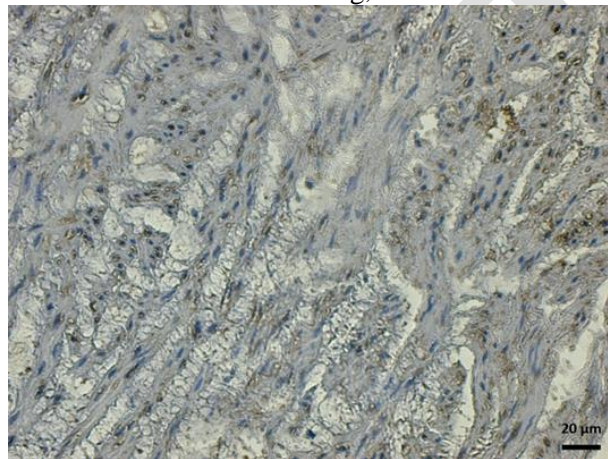


**Figure 5.** Control group, negative ADAMTS-5 expression in endothelial and muscle cells of arteries, vein and fibroblast cells. ADAMTS-5 immunostaining, Bar: 20 μm

In umbilical cord of preeclampsia group; in amniotic epithelial cell layers ADAMTS5 expression was positive. (Figure 6).

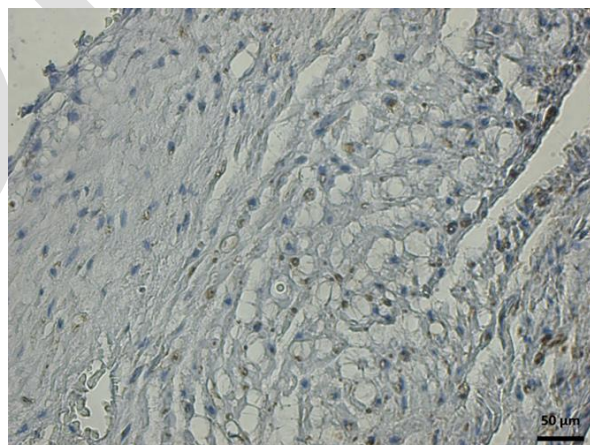


**Figure 6.** Preeclampsia group, positive ADAMTS5 expression in amniotic epithelial cell layers. ADAMTS-5 immunostaining, Bar: 20 um



**Figure 7.** Preeclampsia group, positive ADAMTS-5 expression in connective tissue fibroblast cells of umbilical cord. ADAMTS-5 immunostaining, Bar: 20 um

In umbilical cord of Gestational Diabetes Mellitus group cells of mucous connective tissue were mostly negative for ADAMTS expression but, fibers conjunction areas and fibroblasts were stained positively with ADAMTS-5 (Figure 8).



**Figure 8.** GDM group, significant ADAMTS-5 expression in muscle cells of arteries. ADAMTS-5 immunostaining, Bar: 50 um

## DISCUSSION

Umbilical cord connects developing foetus and placenta. It is formed by the 5<sup>th</sup> week of pregnancy and protects the vessels between the foetus and the placenta (Lateef, 2013). It reaches more growth until 28 weeks of pregnancy at an average length of 55-65 cm. It is composed of three blood vessels of which are in different

structure and function. One of the veins, transport oxygenated and nutrition-rich blood from placenta to foetus, and the other two arteries transport deoxygenated blood and metabolic waste products from foetus to placenta. All these vessels are surrounded by Wharton's jelly (Cruikshank, 2003), which forms the major part of human umbilical cord and provides a thick protective mantle around vessels. Wharton's jelly plays also an important role as storage for some compounds, such as growth factors (Sobolewski et al., 2005). The extracellular matrix (ECM) in the vascular wall contains many macromolecules such as collagen, elastin, proteoglycans, and glycoproteins.

Preeclampsia is a pregnancy condition characterized by high blood pressure (systolic blood pressure  $\geq 140$  mm Hg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mm Hg) and protein in the urine. It is seen after 20 week of pregnancy and affects 5-8% of pregnancy around world. Preeclampsia is a cause of maternal morbidity and mortality, as well as restriction fetal growth and perinatal deaths (Uzan et al, 2011; Quan et al., 2018).

Gestational diabetes mellitus (GDM) a complication of diabetes that develops during pregnancy. After pregnancy generally symptoms disappear but it may still last in some woman after delivery. It is characterized by high blood glucose levels (Alfadhli 2015, Gilmartin et al., 2008). Ultrastructural examinations on placenta with GDM revealed structural changes in the syncytiotrophoblasts, cytotrophoblasts, trophoblastic basement membrane and fetal vessels (Honda et al., 1992).

The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) enzymes are a family of proteinases that involve in many cellular processes such as tissue morphogenesis, inflammation, vascular biology, coagulation, angiogenesis, degradation of the ECM and basal membrane (Tortorella et al, 2009). In pregnancy complications, extracellular matrix undergoes some changes but its pathogenesis is not fully elucidated (Gratacos et al, 2008; Crispi et al, 2014). A study showed decreased plasma levels of ADAMTS12 and ADAMTS13 in preeclampsia (Stepanian et al, 2011). Another study on preeclampsia reported that ADAMTS 1, 4 and 12 levels were lower in maternal and cord blood, but higher in placental tissue. However ADAMTS 13 levels were lower in the maternal and cord blood and were not different in the placenta (Kalem et al, 2017). A study by Melekoğlu et al. (2019a) exhibited increased levels of ADAMTS-4 and 5 in amniotic fluid may be involved in the etiopathogenesis of gestational diabetes mellitus (GDM). We observed in the preeclampsia group, positive ADAMTS-5 expression in the amniotic epithelial cell layers and in connective tissue fibroblast cells of umbilical cord. Melekoglu et al. (2019b) in another study hypothesized that the alteration of ADAMTS-9 expression causes changes in maternal serum levels in GDM pregnancy. Our examinations depicted mucous connective tissue were mostly negative for ADAMTS-5 expression but, fibers conjunction areas and fibroblasts were stained positively with ADAMTS-5.

## CONCLUSION

In conclusion, in preeclampsia, ADAMTS-5 expression was positive in umbilical cord connective tissue and amniotic membrane. ADAMTS-5 expression was also observed in muscle layer of umbilical cord vessels of patients with Gestational Diabetes Mellitus. These findings form a basis that preeclampsia may have an effective on extracellular matrix in the membrane level but, GDM on muscle cells. Finally, we suggest that ADAMTS-5 expression may have an influence on the blood flow in arteries in preeclampsia and GDM.

## REFERENCES

- Alfadhli EM. 2015. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Medical Journal*, 6(4):399-406.
- Cornelius DC. 2018. Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 11:1179545X17752325.
- Crispi F, Llurba E, Dominguez C, Martin-Gallan P, Cabero L, Gratacos E. 2008. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 31:303-9.
- Cruikshank DP. 2003. Breech, other malpresentations, and umbilical cord complications. In: "Danforth's Obstetrics and Gynecology. (Scott JR., eds.)". 9th ed, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 381-395.
- Gilmartin AB, Ural SH, Repke JT. 2008. Gestational diabetes mellitus. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*. 1(3):129-134.
- Honda M, Yoyoda C, Nakabayshi M, Omori Y (1992) Quantitative investigations of placenta terminal villi in maternal diabetes mellitus by scanning and transmission electron microscopy. *Tohoku J Exp Med* 167: 247-257.

- Kalem MN, Kalem Z, Yüce T, Soylemez F. 2017. ADAMTS 1, 4, 12, and 13 levels in maternal blood, cord blood, and placenta in preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 37: 1-9.
- Kelwick et al. 2015. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biology*, 16:113.
- Lateef R. 2013. Histological Study of Umbilical Cord at Different Stages of Gestation. *Egyptian Journal of Experimental Biology*, 9(1): 75 – 78.
- Melekoglu R , Ciftci O , Celik E , Yilmaz E., Bastemur AG. 2019a. Evaluation of second trimester amniotic fluid ADAMTS-4, ADAMTS-5, interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45: 824-829.
- Melekoglu R, Yilmaz E, Ciftci O, Kafadar YT, Celik E. 2019b. Associations between second-trimester amniotic fluid levels of ADAMTS4, ADAMTS5, IL-6, and TNF- $\alpha$  and spontaneous preterm delivery in singleton pregnancies. *Journal of Perinatal Medicine* 47 (3): 304-310.
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochemical Journal*, 386: 15–27.
- Quan LM, Xu QL, Zhang GQ, Wu LL, Xu H. 2018. An analysis of the risk factors of preeclampsia and prediction based on combined biochemical indexes. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 34:109–12.
- Sircar M, Thadhani R, Karumanchi SA. 2015. Pathogenesis of preeclampsia. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24:131–8.
- Sobolewski K, Małkowski A, Bańkowski E, Jaworski S. 2005. Wharton’s jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta*, 26(10): 747–752.
- Stepanian, A., et al., 2011. Von Willebrand Factor and ADAMTS13. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7): 1703-1709.
- Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. 2009. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Current Pharmaceutical Design*, 15:2359-74.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. 2011. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management*, 7:467–474.

## **Preeclampsia leads to increased expressions of CHOP and pSTAT3 proteins in placenta; an immunohistochemical study**

Süreyya Özdemir-Başaran<sup>1</sup>, Ebru Gökalp-Özkorkmaz<sup>1\*</sup>, Fırat Aşır<sup>1</sup>, Şenay Deveci<sup>2</sup>, Engin Deveci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dicle University, Faculty of Medicine, Department of Histology&Embryology, Diyarbakır, Turkey.

<sup>2</sup>Dicle University Atatürk Vocational School of Health, Diyarbakır, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: ebrug76@gmail.com

### **Abstract**

Preeclampsia is a gestational disease that occurs from the second trimester of pregnancy and characterized by high blood pressure and proteinuria. CHOP is a marker of ER stress and is up-regulated in preeclampsia but, STAT3 is downregulated in preeclamptic placental specimens. Placental tissues were collected from women with normal pregnancies (n = 20) and with preeclamptic pregnancies (n = 20). The expression of CHOP and pSTAT3 proteins in the placentas were analyzed by immunohistochemical staining. Samples were placed into 10% neutral formaldehyde solution. Following the routine paraffin protocol, 4–6 µm paraffin sections were cut with a microtome. Primary antibodies (CHOP and pSTAT3) were applied and counterstained with Hematoxylin, examined under light microscope. In the maternal area of pSTAT3 control group, moderate pSTAT3 expression was observed in some decidual cells, while it was negative in the syncytial bridge and nodes and villi connective tissue. In preeclampsia pSTAT3 group, pSTAT3 expression was positive in the root villi and syncytial bridge and nodes. Also, pSTAT3 was expressed in some connective tissue cells of the villi. In control CHOP group; weak CHOP expression was observed in decidual cells, stem cells, syncytial bridges and nodes, chorionic villi connective tissue. In the maternal area of preeclampsia CHOP group, the expression of CHOP was positive in the fibrous structures and cells of connective tissue near the vessels and the Hoffbauer cells in the villi connective tissue. In preeclamptic placentas, pSTAT3 activity was seen mostly in the syncytial bridges and nodes of the root villi, whereas CHOP expression was found to be dense in connective tissue cells around the vessels and Hoffbauer cells in the maternal area. As a result, it was thought that pSTAT-3 and CHOP activity increased in preeclampsia, trigger inflammation in preeclampsia, may be considered in the treatment of preeclampsia.

**Keywords:** Preeclampsia, placenta, CHOP, pSTAT3, immunohistochemistry

### **INTRODUCTION**

Preeclampsia (PE) is a human pregnancy disease in the second or third trimester of gestation, prominent with hypertension and proteinuria (Aouache et al., 2018). It is a multisystem disorder that affects both mother and fetus seen in 2-8% of pregnancies. Preeclampsia is still an important factor of maternal and fetal morbidity and mortality (English et al, 2015). Criteria for preeclampsia is systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg and proteinuria ( $>300$  mg/24 h) (Uzan et al, 2011). For the mother, hepatic alterations, edema, disseminated vascular coagulation, eclampsia, may develop on the other side, for the fetus, growth restriction, low birth weight, prematurity, and fetal death may occur. Pathogenesis of preeclampsia has not been fully understood but there are developments undergoing.

CHOP is a marker of ER stress and is up-regulated in preeclampsia (Fu et al., 2015). Normally CHOP protein is trace amount in cells but it is highly elevated during the cellular/ER stress conditions. This elevation causes increase in protein synthesis, depletion of ATP, oxidative stress and eventually death of cell (Han et al., 2013). Placental syncytiotrophoblasts contain numerous endoplasmic reticulum (ER). If blood flow is decreased to intervillous space, oxidative and ER stress occurs and CHOP is overexpressed (Liu et al, 2016)

STAT3 gene is transcription factor of STAT gene family that takes role in many cellular events such as cell growth and division, cell movement and apoptosis. STAT3 trigger trophoblast invasion and downregulated in preeclamptic placental specimens (Qu et al., 2016). There are several studies that show STAT3 influence placenta development. Its expression is seen in the first trimester extravillous trophoblasts (Weber et al, 2012). In this study we aim to show expression level of CHOP and pSTAT3 proteins and their association with preeclampsia. We found that increased CHOP and pSTAT3 expression was evident in preeclampsia and may contribute to inflammation.

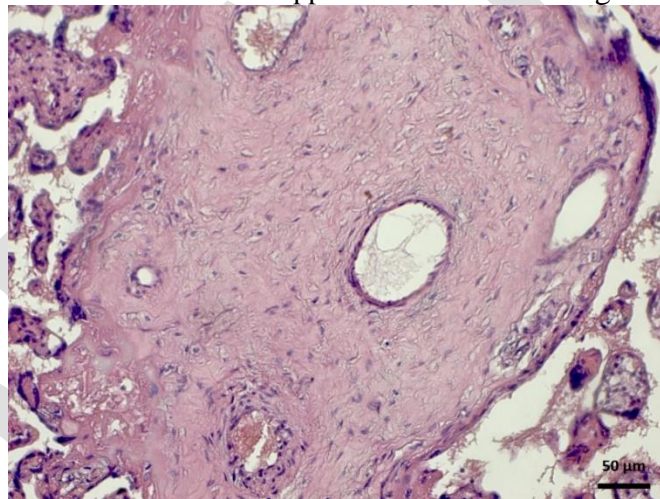
### **MATERIALS AND METHODS**

The study was allowed by Dicle University Medical Faculty Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee. All patients signed informed consent. Twenty normal pregnancy placentas and twenty preeclamptic were obtained from Obstetrics and Gynecology Clinics of Dicle University. Two groups were named as control group and the preeclamptic group. Small portions of placentas were excised for routine histology tissue procedure and stored in 10% neutral formalin solution until use. After fixation, placentas were exposed to routine paraffin embedding protocol. Placental blocks were cut with a microtome and 4-6  $\mu$ m sections were stained with Hematoxylin Eosin. Remaining sections were kept for immunohistochemistry. The sections were brought to distilled water and then treated with phosphate buffered saline (PBS). For antigen retrieval procedure, sections were heated in microwave at 700 ° C for 8 minutes within Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) buffer solution. Samples were washed with PBS and treated with 3% hydrogen peroxide solution for 20 minutes. After washing in PBS, tissues were incubated with the blocking solution (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA). Sections were exposed to primary antibodies anti-CHOP (lot # ab11419, Abcam, Cambridge, MA 02139-1517, USA) and pSTAT3 (lot # ab76315, Abcam, Cambridge, MA 02139-1517, USA) and incubated at + 4°C overnight. Next day, sections were kept under room temperature for 30 minutes. Washing in PBS, secondary antibody (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) was applied for 14 minutes. After PBS, sections were soaked with streptavidin peroxidase (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) for 15 minutes. Chromogen DAB (cat # TL-125-HD, ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA) was treated for 5-10 minutes. Sections were counter stained with Harris Hematoxylin, passed through ascending alcohols, clearing in xylene, mounted with Entellan. Histopathology and immunoexpression analysis were done under imager A2 Zeiss light microscope.

## RESULTS

### a. Histopathological Results

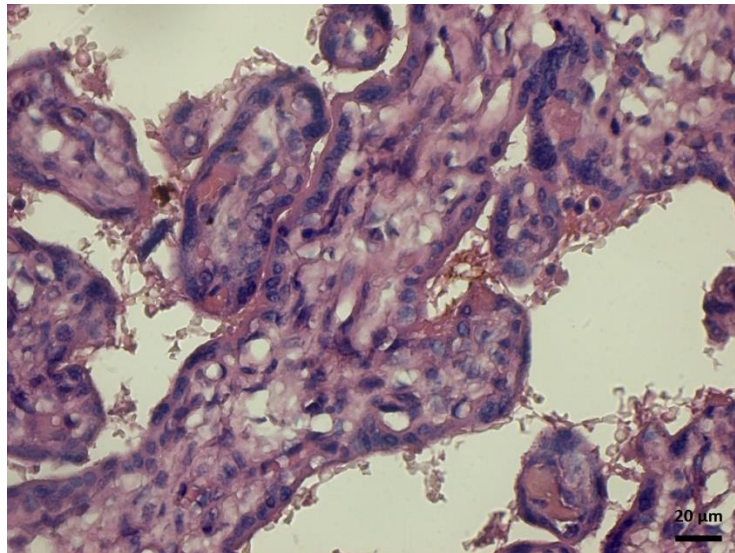
Control group placental sections revealed normal appearance in maternal region root villi (Figure 1).



**Figure 1.** Control group, normal appearance of maternal region root villi, H-E staining, Bar: 50  $\mu$ m

The chorionic villi of the preeclamptic placenta exhibited increased syncytial node and bridges, syncytial edema, and also increased collagen fiber. Additionally, heterochromatin appearance in syncytial bridges, freely scattered erythrocyte clusters in the intervillous area of the chorionic villi were observed (Figure 2).

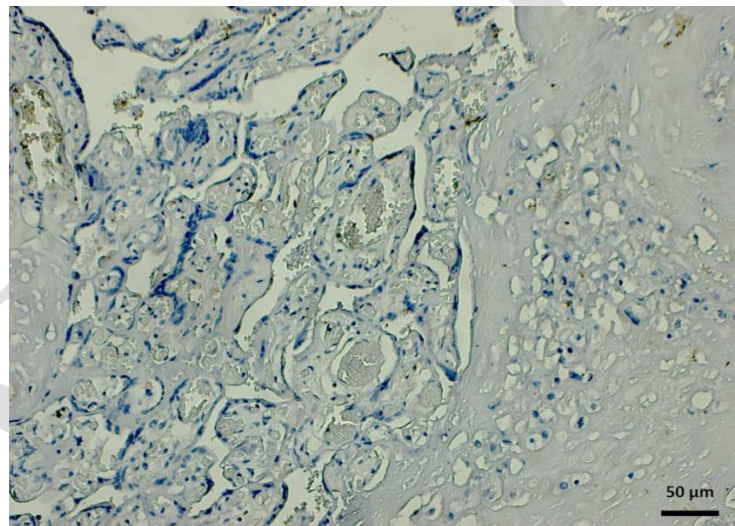




**Figure 2.** Preeclampsia group, increased syncytial node and bridges, freely scattered erythrocyte clusters in the intervillous area of the chorionic villi. H-E staining, Bar: 20 μm

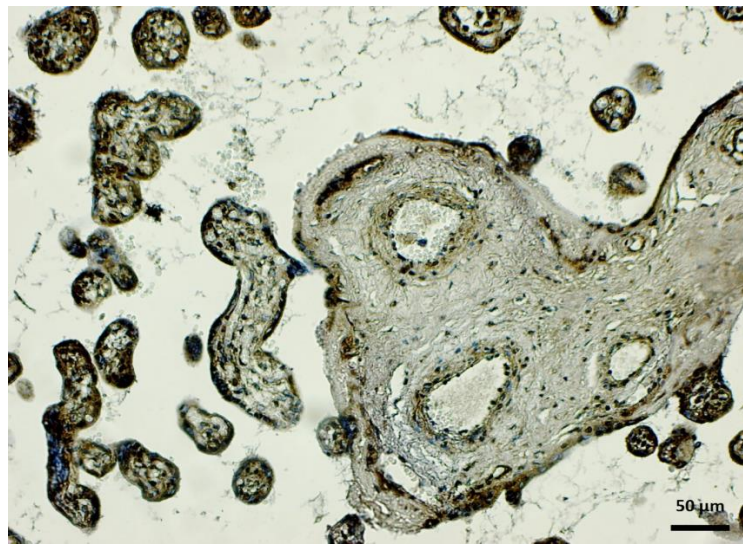
#### **b. Immunohistochemical Results**

In control group with CHOP immunostaining, weak CHOP expression was observed in decidual cells, stem cells, syncytial bridges and nodes, chorionic villi connective tissue (Figure 3).



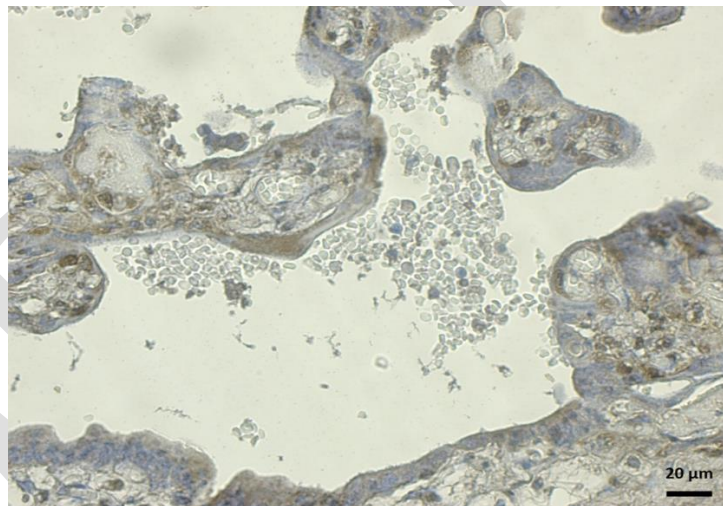
**Figure 3.** Control group, weak CHOP expression in decidual cells, stem cells, syncytial bridges and nodes. CHOP immunostaining, Bar: 50 μm

In the maternal area of preeclampsia group with CHOP staining, the expression of CHOP was positive in the fibrous structures and cells of connective tissue near the vessels and the Hoffbauer cells in the villi connective tissue. Cells in syncytial nodes and bridges were negative for CHOP expression (Figure 4).



**Figure 4.** Preeclampsia group maternal area, positive expression in the fibrous structures and cells of connective tissue near the vessels. CHOP immunostaining, Bar: 50 μm

In preeclampsia group with pSTAT3 immunostaining, pSTAT3 expression was positive in the root villi and the syncytial bridge and nodes between the small villi. Also, pSTAT3 was expressed in some connective tissue cells of the villi (Figure 5).



**Figure 5.** Preeclampsia group, positive pSTAT3 expression in the root villi and the syncytial bridge and nodes. pSTAT3 immunostaining, Bar: 20 μm

## DISCUSSION

An intrauterine balance is crucial for normal placental and fetal development. Once the balance is interrupted several diseases may occur related to pregnancy. Preeclampsia is a pregnancy disorder characterized by vasoconstriction, high blood pressure, activation of thrombocyte and reduction of fetoplacental blood flow. Commonly seen in the third trimester of pregnancy, preeclampsia is a cause of maternal morbidity and mortality, as well as restriction fetal growth and perinatal deaths (Uzan et al, 2011). The mechanism underlying preeclampsia is not fully understood yet. In this respect, we focused on CHOP and pSTAT3 protein expression by immunohistochemistry techniques in preeclamptic placental tissues.

STAT3 is required for embryogenesis and its ablation leads to fetal lethality. However, the role of STAT3 in preeclampsia is not well explained. A study reported decreased expression of pSTAT3 in preeclampsia rat model (Zhang et al, 2015). Another study conducted by same group also showed that decreased expression and activation of STAT3 in severe preeclamptic placentas. In preeclampsia group with pSTAT3 immunostaining, pSTAT3 expression was positive in the root villi and the syncytial bridge and nodes between the small villi. Also, pSTAT3 was expressed in some connective tissue cells of the villi.

One of the placental cell type is syncytiotrophoblasts. They are rich in free ribosomes and endoplasmic reticulum (ER). They also control oxygen delivery. Any oxidative stress in those cells lead to ER stress. CHOP is also known as GAD153. CHOP/GADD153 is a regulator and marker for ER-stress induced apoptosis. There are studies supporting that CHOP expression is high in preeclampsia (Du et al, 2016). A previous study depicted that enhanced CHOP expression was localized in syncytiotrophoblast and the fetal endothelial cells (Burton et al, 2011). In our study we observed that in the maternal area of preeclampsia group with CHOP staining, the expression of CHOP was positive in the fibrous structures and cells of connective tissue near the vessels and the Hoffbauer cells in the villi connective tissue.

## CONCLUSION

In conclusion; in preeclamptic placentas, pSTAT3 activity was seen mostly in the syncytial bridges and nodes of the root villi, whereas CHOP expression was found to be dense in connective tissue cells around the vessels and Hoffbauer cells in the maternal area. As a result of preeclampsia, it was thought that pSTAT-3 and CHOP activity increased and they triggered inflammation in preeclampsia. This dual increment may contribute to the development of preeclampsia.

## REFERENCES

- Aouache R, Biquard L, Vaiman D, ID Miralles F. 2018. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1496; doi:10.3390/ijms19051496.
- Burton GJ, Yung HW. 2011. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 1(1-2):72–78. doi:10.1016/j.preghy.2010.12.002.
- Du L, He F, Kuang L, Tang W, Li Y, Chen D. 2016. eNOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. *Journal of Human Hypertension*, 31(1):49–55.
- English FA, Kenny LC, McCarthy FP. 2015. Risk factors and effective management of preeclampsia. *Integrated Blood Pressure Control*, 8:7–12.
- Fu J, Zhao L, Wang L, Zhu X. 2015. Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe preeclampsia, *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 54:19e23.
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, et al. 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15(5):481-90.
- Liu K-S, Peng Z-H, Cheng W-J, Dai C-F, Tong H. 2016. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of reproduction. *Journal of Reproduction and Contraception*, 27(1):51–59.
- Qu HM, Qu L, Li XV, Pan XZ. 2016. Overexpressed HO-1 is associated with reduced STAT3 activation in preeclampsia placenta and inhibits STAT3 phosphorylation in placental JEG-3 cells under hypoxia. *Archives of Medical Science*, 1-11. doi:10.5114/aoms.2016.63261.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. 2011. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vascular Health and Risk Management*, 7:467–474.
- Weber M, Kuhn C, Schulz S, Schiessl B, Schleussner E, Jeschke U, Markert UR, Fitzgerald JS. 2012. Expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and its activated forms is negatively altered in trophoblast and decidual stroma cells derived from preeclampsia placentae. *Histopathology*, 60:657–662.
- Zhang Z, Yang X, Zhang L, Duan Z, Jia L, Wang P, Shi Y, Li Y, Gao J. 2015. Decreased expression and activation of Stat3 in severe preeclampsia. *Journal of Molecular Histology*, 46(2):205-219.

## Preparation and antioxidant activity of N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives

Nesrin Buğday<sup>1</sup>, F. Zehra Küçükbay<sup>2</sup>, Zehra Tekin<sup>2</sup>, Hasan Küçükbay<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>İnönü University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, 44280 Malatya-Turkey

<sup>2</sup>İnönü University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, 44280 Malatya, Turkey

\*Corresponding author e-mail: hasan.kucukbay@inonu.edu.tr

### Abstract

A series of N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives have been synthesized and evaluated for their antioxidant properties using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method. The antioxidant activities of the compounds were compared to those of BHA, BHT and alpha-tocopherol as reference antioxidant radical scavenger compounds. The structures of the new compounds were identified by proton and carbon NMR spectra. While the synthesized compounds showed medium or good antioxidant activity according to the DPPH assay, they did not show detectable antioxidant activity for compounds **1-10** and very low for compounds **7-10** according to the metal chelating activity assay. Among the compounds, benzyloxycarbonyl protected dipeptide derivatives exhibited relatively high antioxidant activity but the results were still lower than standard antioxidant compounds (BHA, BHT and  $\alpha$ -tocopherol). The highest antioxidant activity was obtained from compound **3** which bearing phenylalanine and S-benzylcysteine amino acid moieties at a concentration of 125  $\mu$ g/mL.

**Keywords:** Dipeptides, benzotriazole, acylation, antioxidant activity.

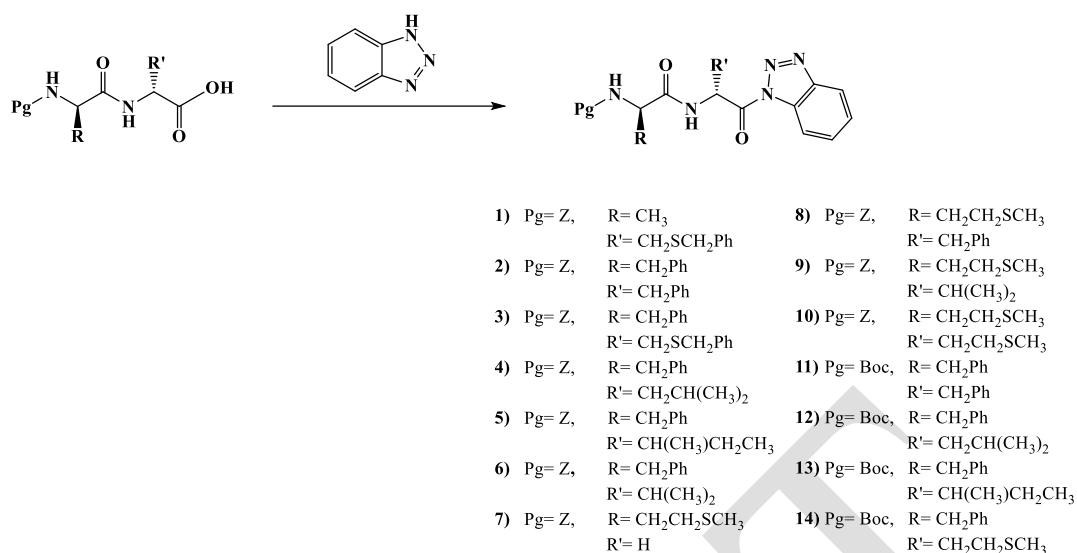
### INTRODUCTION

Peptides play an important role in biological, medicinal and drug research. Therefore, the preparation of peptides has been an attractive research area in organic chemistry for a long time (Coin, Beyermann, and Bienert 2007). The first conjugation of two amino acids was accomplished by acyl chlorides by Emil Fischer in 1903, however at that time there was not appropriate amino-protecting group for synthesizing longer peptides (Fischer and Otto, 1903). Then in the 1960s, Merrifield performed solid phase peptide synthesis (Merrifield 1963). Merrifield's linear solid-phase peptide synthesis (SPPS) is generally used in polypeptide preparation but, linear SPSS of polypeptide can be troublesome and costly (Panda et al. 2014). To overcome this problem, the Katritzky group performed the benzotriazole-mediated peptide synthesis (Katritzky et al. 2009). In Katritzky methodology, where benzotriazole was used as carbonyl group activator to conjugate the carbonyl active moieties to various nucleophiles, was developed and investigated in detail (Ha et al. 2012). The crucial role of peptides in living systems and their potent therapeutic properties has increased the demand for effective synthesis methods.

In connection with this demand, we have planned to synthesize some new N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives and evaluate them in vitro antioxidant properties.

### MATERIALS AND METHODS

The starting materials and reagents used in the reactions were supplied commercially by Aldrich, Across, FluoroChem or Merck Chemical Co. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) spectra were recorded using a Bruker Avanced III 400 MHz Ultrashield high performance digital FT NMR spectrometer. The melting points were recorded using an Electrothermal-9200 melting point apparatus and they were uncorrected. Benzotriazole derivatives of N-Cbz- or Boc-protected amino acids and the desired dipeptides were prepared according to the literature procedure (El Khatib et al. 2011) (Küçükbay et al. 2019). <sup>1</sup>H NMR and m.p. of all starting compounds matched that reported in the literature.



**Scheme 1.** Synthesis pathways of new N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives.

### General procedure for the synthesis of N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives

To the solution of benzotriazole (4 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, thionyl chloride (1.1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. Temperature of the reaction mixture was then lowered to -15 and desired Cbz- or Boc protected dipeptide (1 equiv.) was added and stirred the reaction mixture for 5 h at -15 °C. The white colored solids formed during this time were removed by filtration. The filtrate evaporated, the residue dissolved in ethyl acetate and the solution was washed with a saturated solution of sodium carbonate three times for complete removal of excess benzotriazole. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and evaporated by vacuum to give the corresponding crude product. The crude product was then crystallized from EtOH/Et<sub>2</sub>O solvent system to give N-protected(dipeptidoyl)benzotriazole derivative.

### In vitro antioxidant analysis

Antioxidant activity of the compounds was determined using both the free radical scavenging method described by Blois (1958) and metal chelating activity methods described by Dinis et al (1986) by comparing to those of known antioxidants such as BHA (Butylated hydroxyanisole), BHT (Butylated hydroxytoluene) and  $\alpha$ -tocopherol.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis and Characterization of the N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives

The syntheses of new N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives reported in this study is depicted in Scheme 1. Because N-(protected- $\alpha$ -aminoacyl)benzotriazoles have enabled easy preparation of biologically important peptides in high yield and purity under mild reaction conditions, with full retention of the original chirality (Suzuki et al., 2004), we chose benzotriazole-mediated methodology to synthesize the targeted dipeptide derivatives. The yields and melting points of the compounds are given in Table 1. All the compounds were fully characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. Some characteristic <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR peaks of the compounds are given in Tables 2 and 3, respectively. All spectral data are consistent with proposed structures and previous studies (Buğday et al. 2018)(Küçükbay et al. 2019). The amide and carbamate NH resonances of the N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives were observed at 8.09-8.32 and 8.03-8.24 ppm region, respectively. These NH protons were confirmed by D<sub>2</sub>O exchange. The singlet that peaks around 5.00 ppm for compounds **1-10** was assigned to the CH<sub>2</sub> protons for benzyloxycarbonyl protected group whereas the upfield singlet that signals around 1.30 ppm was assigned to the *tert*-butyl protons of Boc-protected group for compounds, **11-14**. Carbonyl resonances of the amide carbonyls and carbamate carbonyl were observed around 172, 170 and 156 ppm, respectively.

**Table 1.** The yields and melting points of the new compounds.

No	Pg	R	R'	Yield (%)	M.p. (°C)
1	Z	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> SCH <sub>2</sub> Ph	75	136-137
2	Z	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> Ph	77	187-188
3	Z	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> SCH <sub>2</sub> Ph	71	156-157
4	Z	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	68	127-128
5	Z	CH <sub>2</sub> Ph	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	65	168-169
6	Z	CH <sub>2</sub> Ph	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	74	141-142
7	Z	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	H	64	167-168
8	Z	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> Ph	72	168-169
9	Z	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	70	94-95
10	Z	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	69	151-152
11	Boc	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> Ph	71	167-168
12	Boc	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	65	140-141
13	Boc	CH <sub>2</sub> Ph	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	65	126-127
14	Boc	CH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	88	131-132

**Table 2.** Some characteristic <sup>1</sup>H NMR peaks of the new compounds.

<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ					
No	NHCHCONHCHCO	CH <sub>2</sub> OCO	OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	PhCH <sub>2</sub> CH	Ar-H-Bt
1	6.65, 5.98	5.07-4.95	-	-	8.16, 8.08 7.61, 7.47
2	6.50, 6.06	5.00	-	3.34-3.30, 3.06-2.91	8.14, 8.08 7.61, 7.47
3	6.69, 5.97	5.14	-	3.13-3.09, 2.98-2.93	8.17, 8.09 7.63, 7.49
4	6.46, 5.83	5.00	-	3.08-2.96, 2.84-2.71	8.17, 8.08 7.61, 7.47
5	6.62, 5.84	5.14	-	3.16-3.04	8.15, 8.08 7.63, 7.46
6	6.63, 5.73	5.08-5.01	-	3.07-2.93	8.17, 8.07 7.61, 7.47
7	7.21, 5.72	5.11-4.95	-	-	8.09, 8.03 7.56, 7.43
8	6.15, 5.43	5.03	-	-	8.15, 8.08 7.60, 7.47
9	6.20, 5.42	5.03	-	-	8.15, 8.08 7.61, 7.46
10	6.00, 5.60	5.06	-	-	8.17, 8.06 7.60, 7.46
11	6.55, 6.07	-	1.34	3.35-3.30, 3.09-3.04	8.14, 8.08 7.61, 7.47
12	6.63, 5.86	-	1.36	3.06-2.96	8.16, 8.07 7.60, 7.46
13	5.76, 5.14	-	1.36	3.04-2.93	8.17, 8.07 7.60, 7.46
14	6.95, 5.18	-	1.30	3.00-2.96, 2.77-2.71	7.84, 7.83 7.41, 7.39

**Table 3.** Some characteristic <sup>13</sup>C NMR peaks of the new compounds.

<sup>13</sup> C NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ					
No	NHCHCONHCHCO	CH <sub>2</sub> OCO	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COCO	CHCH <sub>2</sub> Ph	CH <sub>2</sub> OCO
1	172.6,170.5	156.1	-	-	67.2
2	170.7, 169.8	156.0	-	38.6, 38.3	67.2
3	171.0, 170.8	156.0	-	38.5	67.2
4	172.5, 170.9	156.1	-	38.4	67.1
5	171.7, 170.4	156.3	-	38.0	67.2
6	171.2, 170.4	156.1	-	38.4	67.2
7	172.1, 167.8	156.4	-	-	67.2
8	171.1, 170.2	156.0	-	-	67.2
9	174.6, 172.2	156.5	-	-	67.3
10	171.5, 170.6	156.2	-	-	67.2
11	171.1, 169.9	-	155.4	38.6, 38.4	-
12	171.4, 171.3	-	155.6	38.1	-
13	171.6, 170.5	-	155.6	38.0	-
14	173.7, 172.4	-	155.7	38.3	-

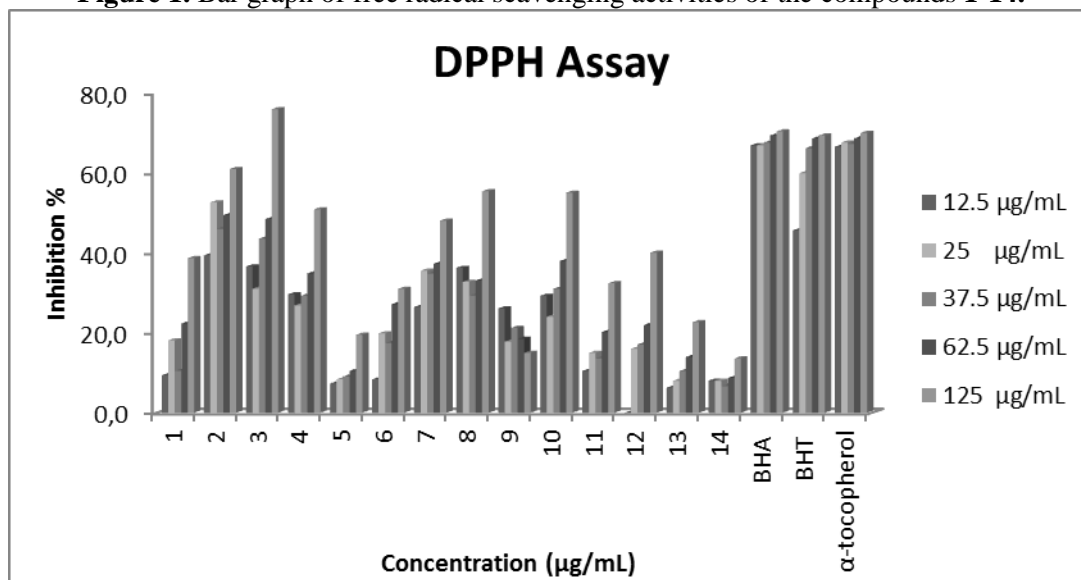
### In vitro antioxidant analysis

The antioxidant activity results of the N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives are given in Table 4 and 5, respectively. While the synthesized compounds showed medium or good antioxidant activity according to the DPPH assay, they did not show detectable antioxidant activity for compounds **1-10** and very low for compounds **7-10** according to the metal chelating activity assay. Among the compounds, benzyloxycarbonyl protected dipeptide derivatives exhibited relatively high antioxidant activity but the results were still lower than standard antioxidant compounds (BHA, BHT and α-tocopherol). The highest antioxidant activity was obtained from compound **3** which bearing phenylalanine and S-benzylcysteine amino acid moieties at a concentration of 125 μg/mL.

**Table 4:** Free radical scavenging activities of the N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives.

Compound No	DPPH Free Radical Scavenging Activity %				
	12,5 μg/mL	25 μg/mL	37,5 μg/mL	62,5 μg/mL	125 μg/mL
1	9,407	18,118	10,452	22,299	38,675
2	39,372	52,613	45,993	49,477	60,975
3	36,585	31,010	43,554	48,432	75,958
4	29,616	26,829	29,268	34,843	50,871
5	7,317	8,362	9,059	10,452	19,512
6	8,362	19,860	17,421	27,177	31,010
7	26,480	35,540	34,843	37,282	48,083
8	36,236	32,752	29,268	33,101	55,400
9	26,132	17,770	21,254	18,466	14,982
10	29,268	24,041	31,010	37,979	55,052
11	10,452	14,982	13,588	20,209	32,404
12	ND	16,027	17,073	21,951	40,069
13	6,271	8,013	10,452	13,937	22,648
14	8,013	8,013	6,620	8,710	13,588
BHA	66,898	66,898	67,595	69,337	70,383
BHT	45,644	59,930	66,202	68,641	69,337
α-tocopherol	66,550	67,595	67,247	68,641	70,034

**Figure 1.** Bar graph of free radical scavenging activities of the compounds 1-14.

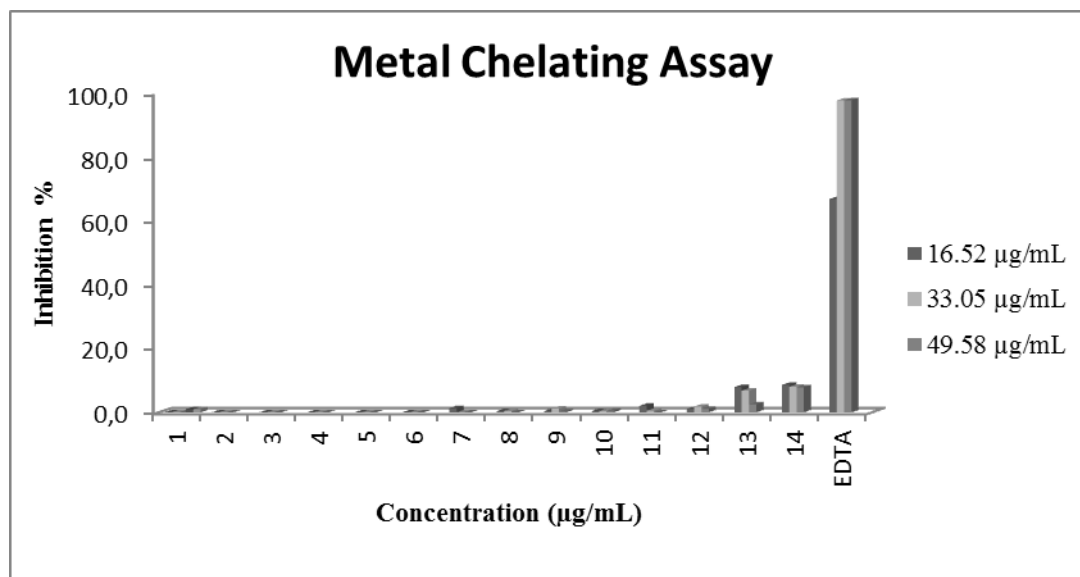


**Table 5.** Metal chelating activities of the N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives.

Compound No	Metal Chelating Activity %		
	16,52 µg/mL	33,05 µg/mL	49,58 µg/mL
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
7	1,355	ND	ND
8	0,395	0,451	ND
9	0,451	1,185	0,282
10	0,451	0,451	0,508
11	2,089	0,508	ND
12	1,141	1,863	1,141
13	7,961	6,832	2,484
14	8,639	8,018	7,848
EDTA	66,854	97,741	97,797



**Figure 2.** Bar graph of metal chelating activities of the compounds 1-14.



## CONCLUSION

In the present study, fourteen new N-protected (dipeptidoyl)benzotriazole derivatives were synthesized and evaluated for their antioxidant properties by using DPPH and metal chelating methods described by Blois and Dinis. Most of the compounds show considerable antioxidant properties according to the DPPH method whereas they did not show detectable antioxidant activity for compounds **1-10** and very low for compounds **7-10** according to the metal chelating activity assay.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank TÜBİTAK ( The Scientific and Technological Research Council of Turkey) Grant No: 117Z293, İnönü University, Turkey (BAPB-Grand No: FDK-2018-1242) for financial support.

## REFERENCES

- Blois MS, 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Buğday N, Küçükbay FZ, Küçükbay H, Bua S, Bartolucci G, Leitans J, Kazaks A, Tars K, Claudiu TS. 2018. Synthesis of Novel Dipeptide Sulfonamide Conjugates with Effective Carbonic Anhydrase I, II, IX, and XII Inhibitory Properties. *Bioorganic Chemistry*, 81: 311–18.
- Coin I, Beyermann M, Bienert M. 2007. Solid-Phase Peptide Synthesis: From Standard Procedures to the Synthesis of Difficult Sequences. *Nature Protocols*, 2 (12): 3247–56.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) assay inhibitors of membrane lipid peroxidation and assay peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315: 161-169.
- Fisches E, Otto E, 1903. Synthesis of some dipeptides. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 36: 2106-2116.
- Ha Khanh, Chahar M, Monbaliu MJC, Todadze E, Hansen FK, Oliferenko A, Ocampo, CE, Leino D, Lillcotch A, Stevens CV, Katritzky AR. 2012. Long-Range Intramolecular s → N Acyl Migration: A Study of the Formation of Native Peptide Analogues via 13-, 15-, and 16-Membered Cyclic Transition States. *Journal of Organic Chemistry* 77 (6): 2637–48.
- Katritzky AR, Singh A, Danniebelle NH, Megumi Y. 2009. N-(Fmoc- $\alpha$ -Aminoacyl)Benzotriazoles: Versatile Synthetic Reagents from Proteinogenic Amino Acids. *Arkivoc*, 8: 47–56.
- El Khatib M, Jauregui L, Srinivasa RT, Khelashvili L, Katritzky AR. 2011. Solution-Phase Synthesis of Chiral O-Acyl Isoleptides. *MedChemComm* 2 (11): 1087.
- Küçükbay H, Buğday N, Küçükbay FZ, Berrino E, Bartolucci G, Del Prete S, Capasso C, Supuran CT. 2019. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Novel 4- ( 2- Aminoethyl ) Benzenesulfonamide-Dipeptide Conjugates. *Bioorganic Chemistry* 83: 414–23.
- Merrifield RB. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85 (14): 2149–54.

Panda SS, Elagawany M, Marwani MH, Çalışkan E, El Khatib M, Oliferenko A, Alamry KA, Katritzky AR. 2014. Chemical Ligation from O-Acyl Isopeptides via 8-and 11-Membered Cyclic Transition States. *Arkivoc* 2014 (4): 91–106.

Suzuki K, Singh K, Katritzky AR. 2014. Highly diastereoselective peptide chain extension of unprotected amino acids with N-(Z- $\alpha$ -aminoacyl)benzotriazoles, *Synthesis*, 16: 2645- 2652.

DRAFT

## Inflammatory mediator and antioxidant role in astroprotective of *Tinospora crispa* against ethanol Induced gastric ulcer

Walaa Najm Abood\*

University of Diyala, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Diyala,  
Iraq.

\*Corresponding author e-mail:

[walaaabood@gmail.com](mailto:walaaabood@gmail.com)

### Abstract

This research performed to determine the potential protective effects of *Tinospora crispa* stems to the rat gastric mucosal injury of induced by ethanol. As well as clarify the role of gastrin, pepsin, prostaglandinE2 (PGE2), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) and cytokines (Tgfb1 and TNF- $\alpha$ ). Seven groups of rats were orally pre-treated with Tween20 as vehicle control group, Tween20 as ulcer group, 20 mg/kg of omeprazole as reference drug group, 100, 200,500 and 1000 mg/kg of extract as the experimental groups. An hour later, induction ulcer by given 95% ethanol orally except vehicle control group. The results have been showed significant ulcer protective effects by reduction the ulcer area and increase the ulcer inhibition grossly and histology. As well as significant elevate the gastric juice PH and increasing the production of mucus. In addition, significant elevated of inflammatory mediators PGE2, increased the activity of SOD and CAT have shown in gastric mucosa and significant elevated of in Tgfb1. On the other hand, observed reduction the serum level of gastrin and pepsin, and decreasing the level of MDA and TNF- $\alpha$ . In conclusion, our results proof that *T. crispa* pretreatment has protective effects in ethanol-induced gastric ulcers in rats. Moreover, these results provide evidence that these protective effects of *T. crispa* by stimulation of some inflammatory mediators as PGE2, gastrin, Tgfb1 and TNF- $\alpha$ . Moreover, important antioxidant enzymes such as SOD and CAT which are scavengers of ROS and therefore prevent gastric injury induced by them.

**Keywords:** *Tinospora crispa*, Gastroprotective, Prostaglandin E2, Tgfb1, TNF- $\alpha$ , Antioxidants enzyme.

### INTRODUCTION

Gastric ulcer has been composed the highest percentage among the diseases in the world due to rising the stress that faces the human, consumable alcohol, taking many drugs that in the long term of use will cause gastric ulcer as non-steroidal anti-inflammatory drugs as (aspirin and indomethacin) and nutritional deficiencies(1).

Many medications used to treat gastric ulcer. H<sub>2</sub>-antagonists, Omeprazole, Ranitidin and Famotidine work the present medications of gastric ulcer as secretion inhibitor of the gastric acid. Though, the one problem in gastric ulcer treated is that, in spite of the rate of healing between(80-

100%) through(4-8) weeks when used the proton pump inhibitors and H<sub>2</sub>-antagonists, but the ulcer returning when stopped therapy in the rate 40-80%(2). Besides, more of these medications have side effects for long use(3). Therefore, we are looking for the new therapeutically anti-ulcer agents.

Gastrin is a polypeptide hormone synthesized in gastrin cells and play an important role in modulates a variety functions in the gastrointestinal tract, include cell proliferation, motility and acid secretion. These actions have been mediated by gastrin/CCKB receptors(4). Prostaglandins and growth factors have important roles to maintain gastrointestinal mucosal integrity, reform of gastrointestinal mucosal injury, and ulcer healing (5). Variety of mediators and cytokines as PGE2, Tgfb1 and TNF- $\alpha$  are coordinate in the inflammatory responses. That liberate from many cells in the lamina propria response to infection, injury and exposure to antigens. The effect of these mediators directly on the mucosal integrity through vascular permeability, modulation epithelial and influence on blood flow(6). Superoxide radical anion and hydroxyl radical now considered are Reactive oxygen species (ROS) the

major causative factors for mucosal lesions. Endogenous antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in tissues, which scavenge these ROS and therefore prevent LPO and tissue damage. In gastric ulceration, ROS may be produced in excess due to delicate balance between ROS and endogenous antioxidants or antioxidant enzymes. (7).

In the recent year, the people trained to use the traditional medicine for treatment of the diseases. *T. crispata* one of traditional drugs that use in the treatment inflammation, cancer, diabetic, anti-Hypercholesterolemia(8). In this work, we used *T. crispata* stems extract as anti-inflammatory and antioxidant drug to investigate the gastro protective and conducted to investigate the mechanisms responsible for the gastroprotective.

## MATERIALS AND METHODS

### Material

*T. crispata* dried stems were collected at Selangor housing area voucher specimen (KLU 45568) at Herbarium of IBS, UPM. Tween 20(Sigma-Aldrich, Germany), omeprazole (TROGE medical GMBH, Hamburg), ethanol (Fisher Scientific, UK), xylazine and ketamine (ilium, Australia), Alcian blue (ACROS, USA), D (+) sucrose (Fisher Scientific, UK), Sodium acetate and Magnesium Chloride (Sigma-Aldrich, Germany), ethyl ether (Anala R, England) and PBS(DulbeccoA, Oxoid, England).

### Plants extraction

Dried stems of *T. crispata* crushed. The powder (100 g) is soaked in 1000 ml of 95% ethanol in conical flask, for three days at room temperature (30±2°C). The suspension is shook from time to time to allow the stems powder completely dissolve in the ethanol and changed the color to dark brown. After three days, the mixture filtered by using a filter paper (Whitman, 185mm) and distilled under reduced pressure in rotary evaporator (Buchi, Switzerland). The outcome of extract is saved at -20°C till be use(9).

### Acute toxicity test

Forty- eight rats (24 males and 24 females), weight between (160-180g) are randomly separated in four groups, each group has six males and six females, each rat is caged alone, fasted prior to dosing (food but not water should be withheld overnight). The *T. crispata* stems extract is dissolved in Tween 20 (5% v/v) and administered at a single doses of 50,500 and 2000mg/kg body weight per rat (5ml/kg). The control group A received the same volume of Tween 20 (5% v/v). ), for both treated and control groups respectively, are administered a single dose orally by using oral gavage tube to each rat. After *T. crispata* stems extract has been administered, food withheld for a further (3 - 4 hours). Toxicity symptoms and mortality are observed, after dosing once during the first 30 minutes, recurrently during the first 24hours, with special awareness given during the first four hours and daily then, for a total of fourteen days, the body weight is gained each 7 days. After 14th days the animals from each group are weighed, anesthetized with 0.01 ml/kg xylazine and 0.09 ml/kg ketamine, blood sample is collected to analyze the biochemical tests, kidney and liver is taken for histopathological assessment.

### Induction of gastric ulcer by ethanol

Healthy female *Sprague Dawley* rats, weight between (200-250g).The animals randomly divided in to seven groups (6rats/ groups) the water is removed one hour before the experiment. First group (vehicle control group), in this group the rats are given vehicle Tween 20(5% v/v) (5ml/kg). Second group (ulcer control group) the rats in this group received Tween 20(5% v/v) (5ml/kg). Third group (reference drug group) in this group the rats are treated with omeprazole 20 mg/kg solution (5ml/kg). Fourth groups the rats are treated with (100mg/kg, 200mg/kg, 500mg/kg, and 1000mg/kg) from *T. crispata* stems extract respectively. After the treatment at one hour, all rats are received 95% ethanol (EtOH) at (5ml/kg) orally to induce gastric ulcer (except the first group). After one hour later all the rats are sacrificed, collect the blood, and removed the stomach and opened over the greater curvature(10).

### Measurement of ulcer index

The ulcers have been located in the gastric mucosa; seem as hemorrhagic extended bands of lesions parallel to the long axis of the stomach. The gastric mucosa ulcer is calculated by measured the sum of the all lesions areas for each stomach is used in the calculation of the ulcer area (UA) is equal to (the sum of small squares  $\times 4 \times 1.8 = UA \text{ mm}^2$ ). The ulcer inhibition percentage (UI %) is calculated as described by (11).

$$(UI \%) = [(UA \text{ control} - UA \text{ treated}) \div UA \text{ control}] \times 100\%.$$

### Measurement of gastric juice PH

After opened the stomach, the gastric juice collected and measured for the acidity by using digital PH meter (12).

### Histological evaluation of gastric lesions

A piece of glandular portion of each stomach is fixed in 10% formalin and then dehydration by alcohol using ascending grades, after that embedded the processes tissue in paraffin to prepare the tissue for sectioning by using microtome to cut the tissue in sections with five micrometer in order to be ready for stained with hematoxylin–eosin solutions (13).

### Determination of gastric wall mucus content

The gastric mucus contents are determined according the assay was described by (14). Adult female *Sprague Dawley* rats, that weight between (200-250g) is fasted for 24 h, the animals randomly divided in to four groups (6rats/ groups) the water is removed one hour before the experiment. First group (vehicle control group) in this group the rats are given vehicle Tween 20(5% v/v) (5ml/kg). Second group (ulcer control group) the rats in this group received Tween 20(5% v/v) (5ml/kg).third group (reference drug group) in this group the rats are treated with omeprazole 20 mg/kg solution (5ml/kg), while at the fourth group the rats are treated with (250mg/kg) from *T. crispa* stems extract. After the treatment at one hour, all rats are received 98% ethanol at (5ml/kg) orally to induce gastric ulcer (except the first group). After one hour later all the rats sacrificed by euthanasia, the stomach is removed. Each glandular part weighed and submerged into 1% Alcian blue solution (0.16 M sucrose/0.05 M sodium acetate, pH 5.8). Then submerge for 2 h, the excess stain is rinsed with (10 mL of sucrose at 0.25 M) two consecutive washes, the first time for 15 min and the second for 45 min. Then the stomachs are transmitted to the tubes containing 10ml of the magnesium chloride at 0.5 M for 30 minutes. When the 30 minutes finished, mixed 4 mL of the mixture with 4 mL of ethyl ether and then shake the mixture for 2 min. The final emulsion is centrifuged for (10 min at 3000 rpm) and discarded the supernatant. Read the absorbance at 598 nm. The Calculated the quantity of Alcian blue extracted per gram of glandular tissue.

### Tissue homogenate Sample Preparations for assessment of PGE2, SOD, CAT and MDA

Assessment of PGE2, SOD (Cayman, Cat#. 706002), CAT (Cayman Cat#. 707002) and MDA (Cayman Cat#. 10009055) in gastric tissue homogenate. the gastric tissue is weighed, then minced, and homogenized on ice in 5 ml of cold PBS buffer by using of Teflon homogenizer ((Polytron, Heidolph RZR 1, Germany). After tissue stomach piece fully homogenize, centrifuge the homogenize mixture at 10.000xg for 15min at 4°C. Then the supernatant is collected in sterile tube and kept at (-80°C) until de used.

### Preparations of blood sample for assessment of serum Gastrin and Pepsin

After killing the rats blood samples are collected in blood tube, allow blood to clot for 30 min at 25°C centrifuge at 2000xg for 15min at 4°C, then serum is collected and preserve at -80°C till be used.

### Measurement of PGE2, Gastrin and Pepsin by ELISA

Measurement of PGE2 by Sandwich ELISA (Cayman PGE2 assay ELISA kit; Cat# 500141), Gastrin by using Abnova Rat Gastrin ELISA kit (Cat# .KA0319 V.01) and Pepsin by using Cusabio Rat pepsin assay ELISA kit (Cat#. CSB-E 08920r). The assays are performed as per the detailed instruction of the manufacturer. The detection limited of these assays is  $\leq 15.6 \text{ pg}$  for PGE2,  $\leq 78.10 \text{ pg}$  for serum Gastrin and  $\leq 0.8 \text{ ng}$  for serum pepsin.

### Measurement of TNF-alpha & TGF-β1 by ELISA

After sacrifice the rats blood samples are collected in blood tube, allow blood to clot for 30 min at 25°C centrifuge at 2000xg for 15min at 4°C using refrigerated centrifuge Rotofix 32 (Hettich Zentrifugen, Germany),

then serum is collected and preserve at -80°C until be used. Measurement of Rat TNF-alpha by ELISA kit (Thermo Scientific, Cat# .ER3TNFA) & Tgfb1 by ELISA kit (Abnova, Cat#. KA0279; version: 04) are performed as per the detailed instruction of the manufacturer. The sensitivity limited of these assays is  $\leq 15$ pg/ml for TNF-alpha and for TGF- $\beta$ 1 is 7.8 pg/ml.

### Statistical analysis

The values communicated as mean  $\pm$ standard division (S.D.). The statistical examination of data is through Post Hoc LSD test (comparing the treated groups with control) using a 5% level of significance.

## RESULTS

### Acute toxicity

During the 14 days of experimental period, in both sexes of rats was no record of death and *T. crispa* stems extract in all doses (50, 500, 2000 mg/kg) nor appeared any change on the skin and hair, in all the rats. In the groups that treated with *T. crispa*, biochemical tests of the kidney and liver was in the normal level except the elevated the level of alkaline phosphatase significant ( $P < 0.05$ ) at the doses (500, 2000) mg/kg in the female and all doses groups in the male when compare with vehicle control group (Table1&2). In the histological examination (Figure1), the results showed that in the rat administration dose 500 and 2000 mg/kg, in spite of the normal hepatic structure but there are few inflammatory cells infiltration associated with mild Congestion in portal area, few blood vessels congested indicate to resolution stage from hepatitis. Based on the circumstances of this severe examination the LD50 value for *T. crispa* is more than 2000 mg/kg body weight.

### Gastric lesions

The effect of *T. crispa* in the gastroprotective and the enhancement of the mechanism defense of gastric ulcer are investigated in the induction of gastric ulcer in the rat by using necrotizing agent as ethanol that results mucosal injury characterized by submucosal oedema, increasing secretory products of the cell, disturbances in microcirculation.

Pretreatment with ethanol extract of *T. crispa* stems at dose of 100, 200, 500, 1000 mg/kg or omeprazole at 20mg/kg inhibited the formation of gastric ulcer lesions in the rats. The intensity of ulcer is detected by ulcer area shows that in the pretreated groups (*T. crispa* or omeprazole) statistically significant ( $P < 0.05$ ) lower than ulcer control group and the ulcer inhibition percentage result is reflected that the pretreatment with all doses of the *T. crispa* stems or omeprazole statistically significant ( $P < 0.05$ ) higher than ulcer control group (Figure3).

### Gastric PH

The gastric PH in experimental groups pretreated with *T. crispa* stems or omeprazole increased significantly compared with the ulcer control group ( $P < 0.05$ , Figure4).

### Histological estimation of gastric ulcer

Grossly appearance of the rat pretreated with *T. crispa* extract at doses (100, 200 mg/kg) consecutively; injuries are seen in the gastric mucosa, but in the rat pretreated with *T. crispa* extract (500,1000mg/kg) consecutively, mild injuries are seen in the gastric mucosa. The extract reduces the formation of gastric lesions induced by ethanol (Figure5).

The microscopy analysis of the severity of the ulcer lesion presents in (Figure6) the results show damage throughout the gastric mucosa layer, oedema and leukocyte infiltration in the submucosa layer in the ulcer control group. While in the histology section of the stomach rat that pretreated with *T. crispa* extract (100, 200mg/kg) consecutively; disruption of the surface epithelium mucosa is seen. There is edema and leucocytes infiltration of the submucosal layer. In the rat pretreated with *T. crispa* extract (500, 1000mg/kg) consecutively; there is mild disruption to the surface epithelium and no edema or leucocytes infiltration of the submucosal layer has better protection from the injury caused by ethanol. This result clearly appears in the reduction of ulcer area, less damage to the gastric mucosa, reduction the oedema in the submucosa layer and infiltration leukocyte. This plant shows to extend the gastroprotective effects in a dose-dependent manner.

## Mucus barrier of the protective stomach

Mucus barrier content presents in the (Figure7). We find the statistically significant ( $P<0.05$ ) high mucus contents in the pretreated groups with the *T. crispa* extract when compare to reference drug group ulcer control group rats.

## Evaluation of Gastrin, Pepsin and PGE2

In the pretreated groups with *T. crispa* and omeprazole the result shows significant decrease ( $P<0.05$ ) in the Gastrin (Figure8) and Pepsin (Figure9) level when compare with ulcer control group. In addition, in the pretreated dose (500 and 1000mg/kg) of *T. crispa* the gastrin level shows significant decrease more than reference drug group. Besides the elevation of PGE2 level in the pretreated groups with *T. crispa* and omeprazole significantly ( $P<0.05$ ) when compare with ulcer control group (Figure10).

## Estimation of SOD, CAT and MDA level

The effect of *T. crispa* on the antioxidant enzymes and the role in the gastroprotective was investigated in the pretreated groups. The results are showed the effect of the plant on the level of SOD and CAT significantly ( $p<0.05$ ) by increasing in the level of SOD and CAT in all pretreated groups when compare with ulcer control group. Moreover, decreasing the level of MDA significantly ( $p<0.05$ ) in all pretreated groups when compare with ulcer control group (Table 2).

## Estimation of Tgfb1 and TNF- $\alpha$

The effect of *T. crispa* on inflammatory cytokine the role in the gastroprotective was investigated in the pretreated groups. The results are showed increasing level of Tgfb1 significant ( $p<0.05$ ) at (500&1000 mg/kg). In contrast, decreasing the level of TNF- $\alpha$  significantly ( $p<0.05$ ) in all pretreated groups when compare with ulcer control group (Figure6, 7).

## DISCUSSION

This study showed that the ethanolic **extract** of *T. crispa* has gastroprotective activity as manifested by its significant inhibition in the formation of ulcers induced by ethanol agent. The injury of ethanol-induced ulcers is dominant in the glandular part of stomach. Administration of absolute ethanol orally in rats is destructive for the stomach, affecting on the gastric mucosa topical by disabling its barrier and exciting in few minutes microvascular changes after its application. A strong and rapid vasoconstriction in combination with vigorous and rapid arteriolar dilation caused induction of damage in mucosal capillaries(15, 16). In the previous study was reported that ethanol stimulates the formation of leukotriene C4(LTC4)(17), mast cell secretory products and reactive oxygen species resulting in the damage of rat gastric mucosa(18). The necrotic lesion of the gastric mucosa caused by ethanol happens through multiple factors. It causes disruption of the mucus-bicarbonate barrier when reach to the mucosa and cause cell rupture in the wall of blood vessels. these effects caused probably by biological actions, as formation of free radicals, lipid peroxidation, intracellular oxidative stress, effect on the permeability and depolarization of the mitochondrial membrane before cell death (19).

Gastric ulcer defines as the damage resultant disturbance in the gastric mucosal defense that means ulcer caused by imbalance between offensive and protective factors of the gastric mucosa. Pepsin and gastric acid composed of the aggressive factors whose proteolytic effect is buffered by mucosal glycoprotein ,mucin secretion, prostaglandins and cell proliferation (20). *T. crispa* stems extract decrease ulcer area and increase ulcer inhibition percentage by increasing the production of mucin from mucous cells to form the first line defense to protect the mucosal epithelial layer from ulcerogenic action of ethanol. Mucus is an important factor to protect the gastric mucosa. Mucus is a transparent gel composed of water and glycoproteins, that coats the gastrointestinal mucosa and preserves the gastric mucosa against excited agents, such as ethanol and HCl(21). Moreover, the anti-secretory activity of the *T. crispa* stems extract may be important to protect the gastric

**Table1:** Effect of *T. crista* (T. c) on the value of liver biochemical parameters to the female rat

Groups	Total protein g/l	Albumin g/l	Globulin g/l	alkaline phosphatase IU/l	aspartate aminotransferase IU/l	alanine aminotransferase IU/l
Vehicle control	69.7 ± 2.07	13.3 ± 1.03	56.3 ± 2.7	64.5 ± 7.89	174.3 ± 28.7	38 ± 5.9
T. c 50mg/kg	69.2 ± 3.9	13 ± 0.9	56.5 ± 3.2	73.5 ± 19.17	179.8 ± 20.6	38.8 ± 4.02
T. c 500mg/kg	69.3 ± 1.4	14.7 ± 0.5	54.7 ± 1.4	96 ± 14.5*	198.5 ± 21.8	39.7 ± 6.08
T. c 2000mg/kg	69.7 ± 3.8	14.7 ± 1.9	55 ± 2.2	92.8 ± 19.1*	181 ± 21.8	39.5 ± 6.05

Results are presented at mean ± SD. \*Significant  $p < 0.05$

**Table2:** Effect of *T. crista* (T. c) on the value of liver biochemical parameters to the male rat

Groups	Total protein g/l	Albumin g/l	Globulin g/l	Alkaline phosphatase IU/l	Aspartate aminotransferase IU/l	Alanine aminotransferase IU/l
Vehicle control	60 ± 1.8	12 ± 0.89	48.5 ± 1.4	145.92 ± 29.9	171.8 ± 32.95	52.5 ± 1.34
T. c 50mg/kg	63 ± 4.97	12.7 ± 1.2	50.7 ± 3.8	215.2 ± 70.08*	177.3 ± 15.1	47.08 ± 8.6
T. c 500mg/kg	63.5 ± 5.3	13.2 ± 1.3	50.7 ± 4.3	257.7 ± 14.4*	197.8 ± 33.6	56 ± 1.5
T. c 2000mg/kg	63 ± 4.9	13.2 ± 1.3	50.2 ± 4.1	261.8 ± 12.96*	193.08 ± 31.7	56.5 ± 1.8

Results are presented at mean ± SD. \*Significant  $p < 0.05$



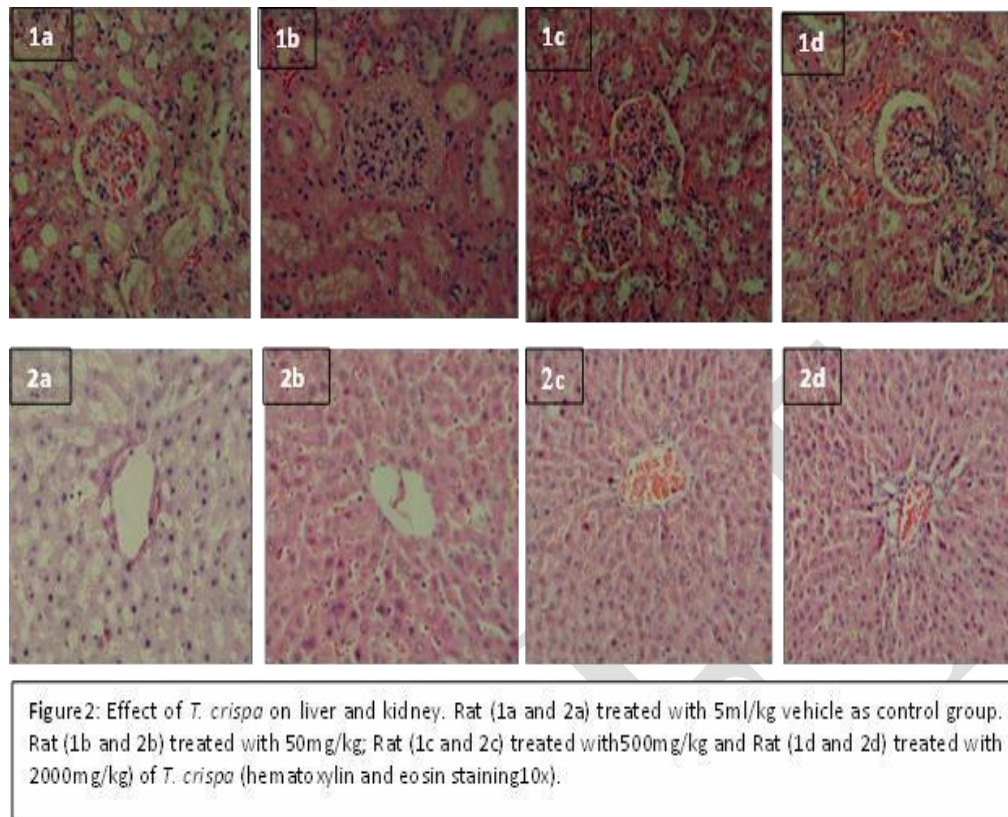
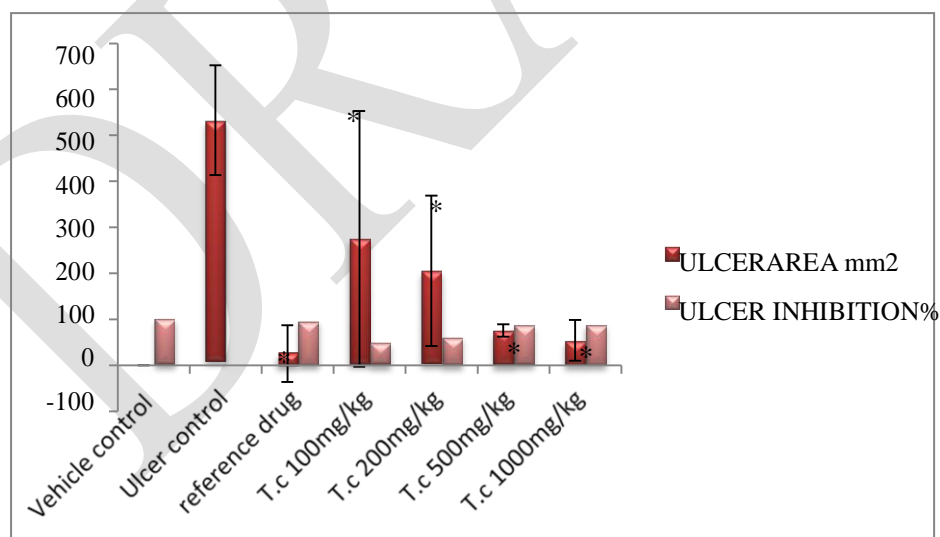


Figure 3: Effect of pretreatment of *T. crispa* (*T. c*) stems extract on the ulcer area, ulcer inhibition. The data expressed as mean  $\pm$  SD, \* significant  $p < 0.05$  compare to the ulcer group.



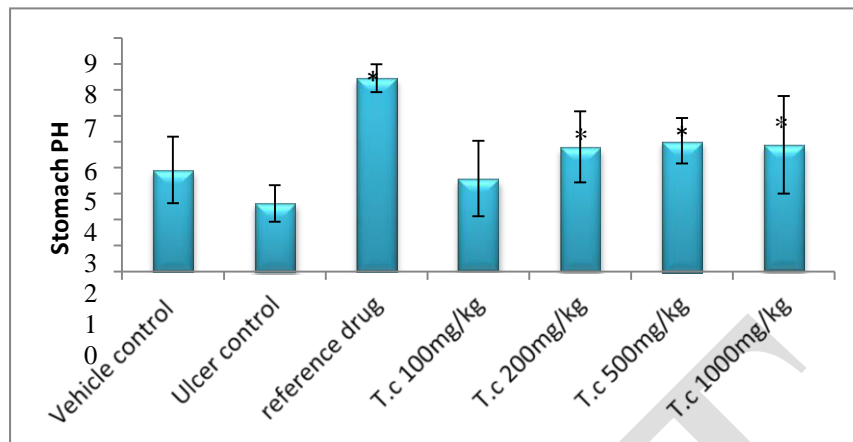


Figure 4: Effect of pretreatment of *T. crispa* (*T. c*) stems extract on gastric PH. The data expressed as mean ± SD, \* significant  $p < 0.05$  compare to the ulcer group.

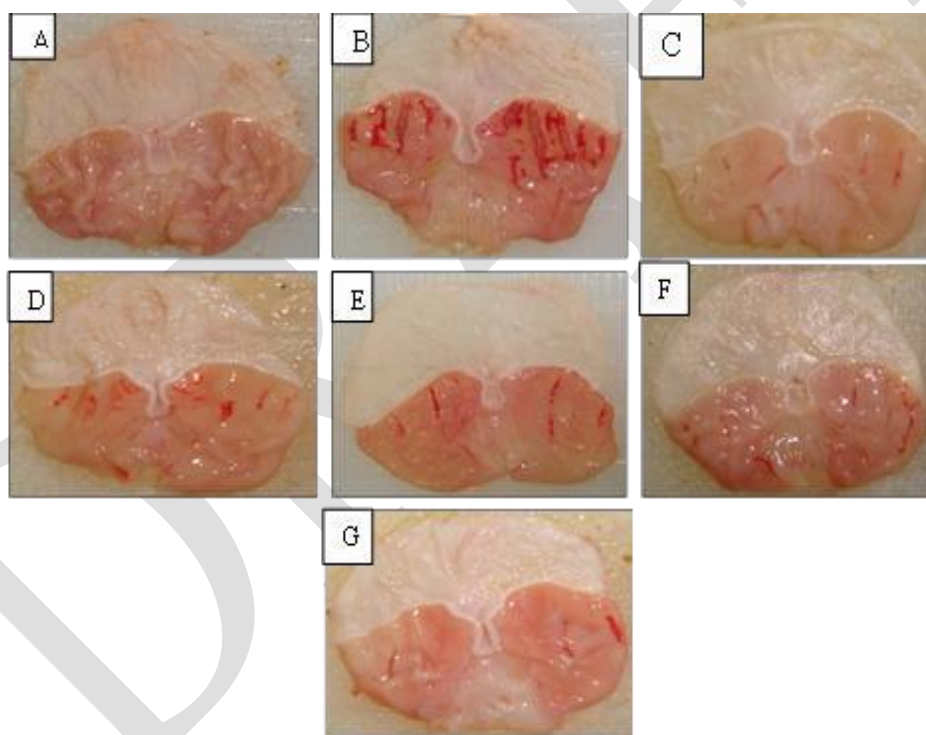
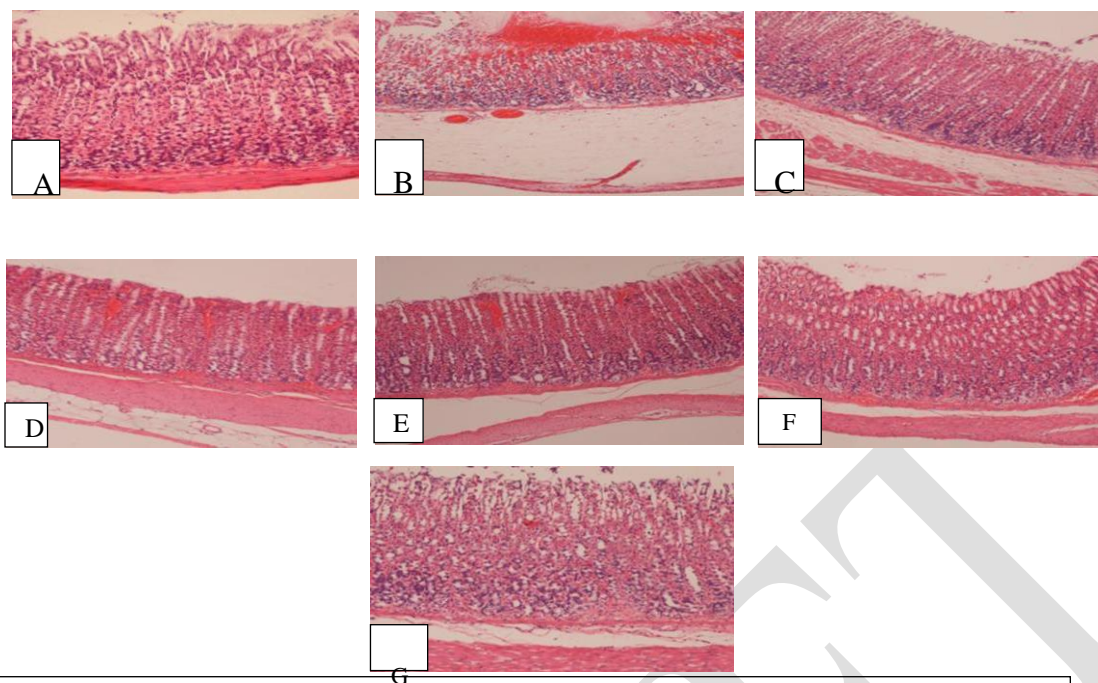
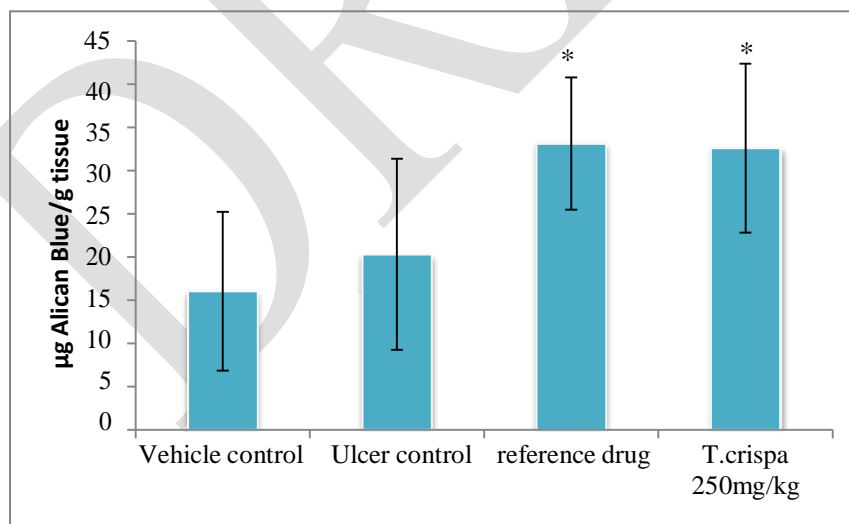


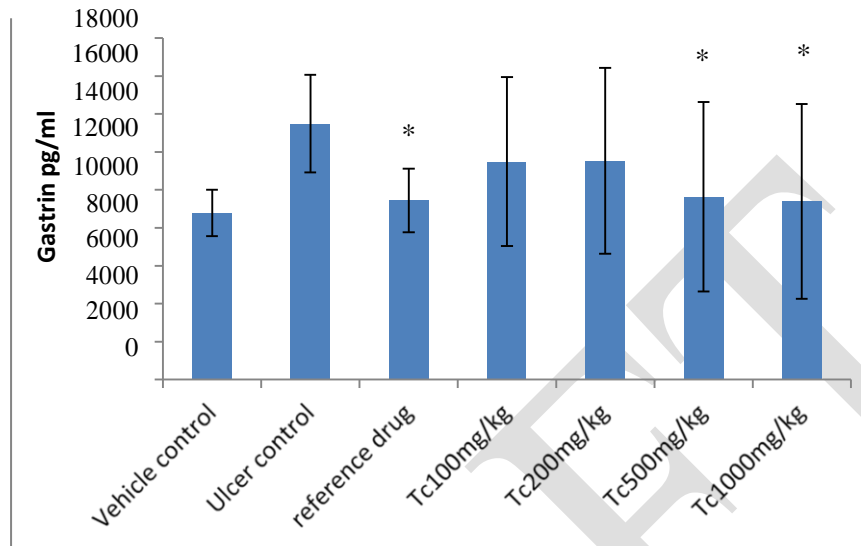
Figure 5: Effect of *T. crispa* on the gross appearance of the gastric mucosa in rats. (A) Rats pretreated with 5ml/kg Teen20, no injuries to the gastric mucosa are seen. (B) Rats pretreated with 5ml/kg Teen20 + EtOH; severe injuries to the gastric mucosa are seen. EtOH produced extensive visible hemorrhagic necrosis of gastric mucosa. (C) rats pretreated with omeprazole (20mg/kg); mild injuries are seen in the mucosa layer. (D & E) rats pretreated with *T. crispa* extract (100 & 200 mg/kg) consecutively, injuries are seen to the gastric mucosa. (F&G) rats pretreated with *T. crispa* o extract (500 & 1000 mg/kg) consecutively, mild injuries are seen to the gastric mucosa.



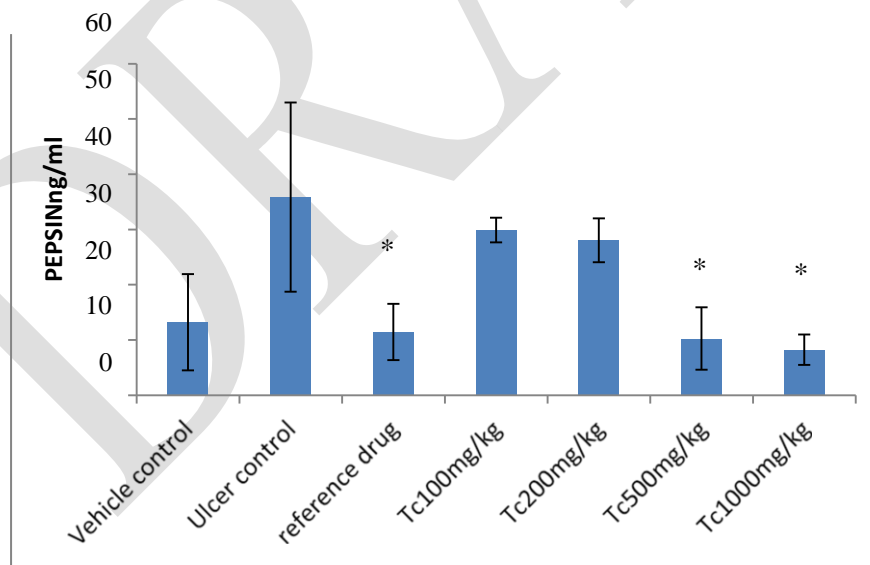
**Figure 6:** Effect of *T. crispa* on the histological appearance of EtOH-induced gastric mucosal damage in rat. (A) Rats pretreated with 5mL/kg of Tween20. No injuries to the gastric mucosa are seen. (B) Rats pretreated with 5mL/kg of Tween20+EtOH. There is severe disruption to the surface epithelium and necrotic lesions penetrating deeply into mucosa and extensive edema of submucosa layer and leucocytes infiltration is present. (C) Rats pretreated with omeprazole (20mg/kg). Mild disruption of the surface epithelium mucosa is seen. (D), (E) rat pretreated with *T. crispa* extract (100, 200mg/kg) consecutively; disruption of the surface epithelium mucosa is seen. There is edema and leucocytes infiltration of the submucosal layer. (F) rat pretreated with *T. crispa* extract (500mg/kg); mild disruption to the surface epithelium and edema, no leucocytes infiltration of the submucosal layer. (G) rat pretreated with *T. crispa* extract (1000mg/kg); mild disruption to the surface epithelium and no edema nor leucocytes infiltration of the submucosal layer (H&E stain 10 $\times$ ).



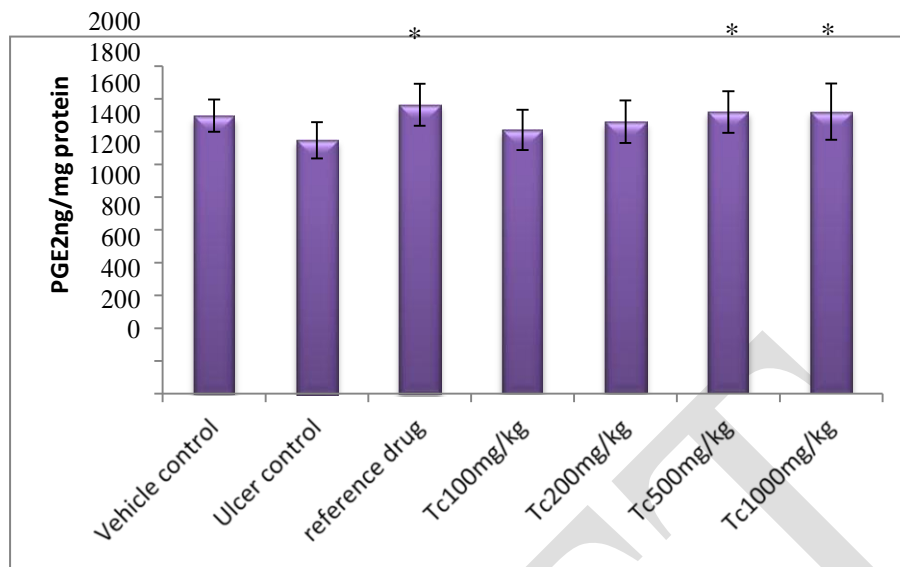
**Figure 7:** Effect of *T. crispa* extract on mucus content in gastric mucosa of rats. All values expressed as mean  $\pm$  SD. The mean difference is \*significant at the  $P < 0.05$  level.



**Figure8:** Effect of *T. crispata* (*P.m.*) on the level of serum Gastrin in ethanol induces gastric ulcer; (6rats/group). The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* the differences mean between groups significant at  $P < 0.05$ .



**Figure9:** Effect of *T. crispata* (*P.m.*) on the level of serum Pepsin in ethanol induces gastric ulcer; (6rats/group). The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* the differences mean between groups significant at  $P < 0.05$ .

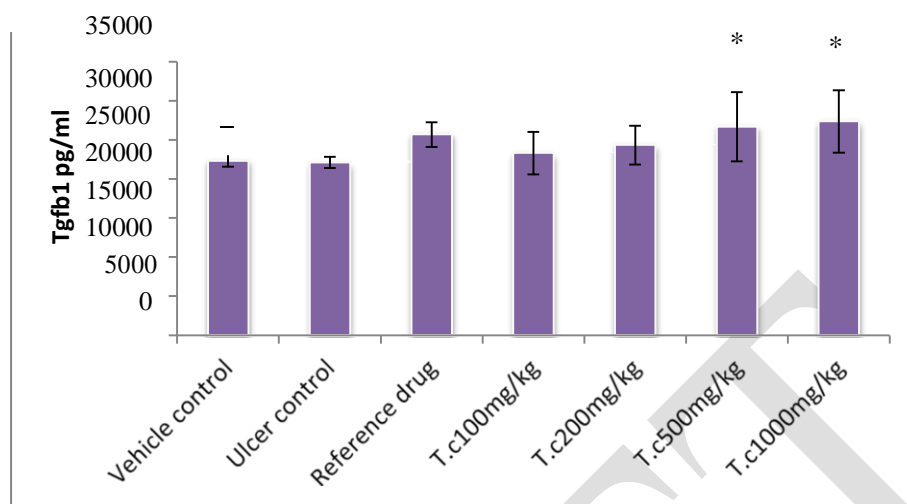


**Figure 10:** Effect of *T. crispus* (*P.m.*) on the level of PGE2 in ethanol induces gastric ulcer; (6rats/group). The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* the differences mean between groups significant at  $P < 0.05$ .

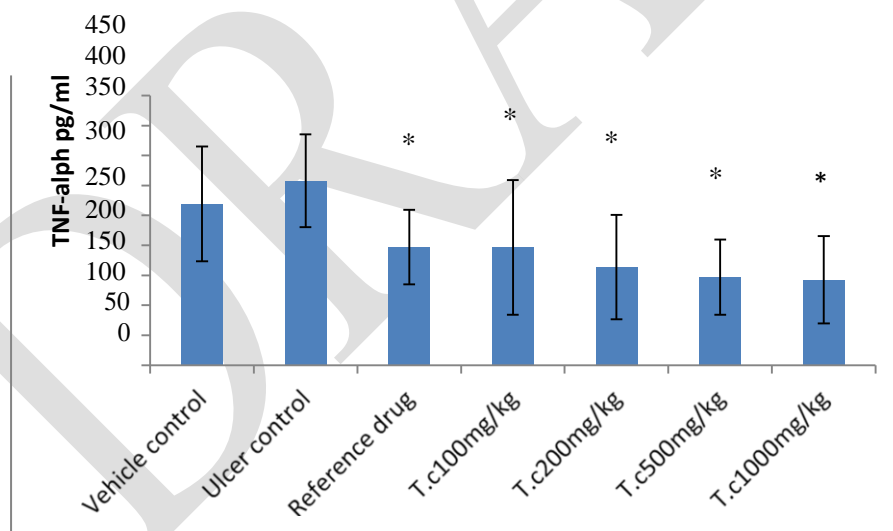
**Table 2:** effect of *T. crispus* (*P.m.*) on the level of SOD, CAT, and MDA in ethanol induces gastric ulcer.

Groups	SOD U/mg protein	CAT nmol/mg protein	MDA umol/mg protein
Vehicle control	190.7 $\pm$ 112.1	1088.5 $\pm$ 586.9	6.16 $\pm$ 2.95
Ulcer control	110.4 $\pm$ 71.6	540.1 $\pm$ 133.3	21.08 $\pm$ 6.97
reference drug	314.9 $\pm$ 102.6*	3140.1 $\pm$ 579.3*	6.95 $\pm$ 3.1*
T. c100mg/kg	215.1 $\pm$ 40.3	1839.2 $\pm$ 715.8*	12.04 $\pm$ 5.34*
T. c200mg/kg	224.5 $\pm$ 114.3	2824.4 $\pm$ 387.95*	10.03 $\pm$ 5.3*
T. c500mg/kg	252.98 $\pm$ 148.8*	3381.94 $\pm$ 102.75*	8.8 $\pm$ 4.4*
T. c1000mg/kg	292.7 $\pm$ 160.6*	3601.2 $\pm$ 515.3*	6.6 $\pm$ 3.96*

The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* significant at  $P < 0.05$  compare with ulcer control group.



**Figure6:** Effect of *T. crista* (*P.m.*) on the level of Tgfb1 in ethanol induces gastric ulcer; (6rats/group). The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* the differences mean between groups significant at  $P<0.05$ .



**Figure7:** Effect of *T. crista* (*P.m.*) on the level of TNF-alpha in ethanol induces gastric ulcer; (6rats/group). The data was expressed as mean  $\pm$  SD. \* the differences mean between groups significant at  $P<0.05$ .

mucosa. The gastroprotective effect is proven by histological examination. This protection is result from the inhibition of the gastric acids secretion and rising stomach PH by extract. The obtained data revealed that there was rising the stomach PH when compared with the ulcer control group so that the mechanism of mucosa protection is due to anti-secretory activity of *T. crispa* stems and the effect to enhance production of mucin.

The other findings in this study are pretreatment with *T. crispa* stems extract induced a remarkable decrease in the level of serum gastrin and pepsin, while cause increasing in the PGE2 level when compared with the ulcer control group, thus indicating the action of *T. crispa* stems in more than one antiulcer mechanism. The gastric secretion decreased after *T. crispa* stems extract pretreatment. This may be a negative feedback mechanism that is, increase in mucus and PGE2, caused reducing in the gastrin and pepsin release in rats treated with *T. crispa* stems extract.

It is well-known that the protective mechanism depends on the mucus and bicarbonate secretion, to a large range, on PGE2 secretion, the activity of the cyclooxygenase (COX) enzyme system play an important role in this function (22). Our results prove the pre-treatment of rats with *T. crispa* stems extract induced increasing of PGE2 levels compared to rats in the ulcer control group. Therefore, these results give a clear indication for involvement of PGE2 in the gastroprotective mechanism of *T. crispa* stems extract. In the stomach, prostaglandins cause elevation the mucus and bicarbonate secretions, keeping the normal response of the gastric environment to intrinsic factors, and inhibition inflammatory mediator released from mast cells and free radical production. (23) mention the increasing in the blood flow in the ulcer region suggested that it may be caused by an increase in PGE2 concentration of in ulcerative regions in comparison to other parts of the gastric mucosa, since PGE2 causes vasodilatation. The supply of blood reveals the active re-epithelization, which needs an abundant supply of oxygen and glucose (24).

. So that, increasing in the production of PGE2 gained in the treatment with *T. crispa* stems extract that clearly indicated exciting of cytoprotective factors participate acceleration of the healing of gastric ulcer.

Reactive oxygen species (ROS) like hydroxyl radical and superoxide radical anion considered one of the major causative factors for mucosal lesions through oxidative stress. ROS plays a main role in tissue injury through the pathogenesis of various disorders of the digestive tract.(25)

Lipid peroxidation (LPO), an important indicator of hydroxyl radical induced oxidative damage of membrane known to play a critical role in the pathogenesis of gastric ulceration. Ethanol caused increase in free radical generation and decrease in endogenous GSH production(26). Endogenous antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which scavenge these ROS and therefore prevent LPO and tissue damage. However, in pathological conditions like gastric ulceration, ROS may be produced in excess and the delicate balance between ROS and endogenous antioxidants or antioxidant enzymes (7). In such situations, *T. crispa* can augment the activity of ROS scavenging enzymes, prevent LPO, by act as scavenging the ROS, decrease the offensive effect of ROS, and decrease the LPO in pretreated groups. Therefore, inhibition of LPO and increase in activity of free radical scavenging antioxidant enzymes (SOD and CAT) could also be one of the mechanisms involved in the beneficial effect of *T. crispa* in preventing gastric ulceration.

One of the important finding in this study was decreasing the level of pro-inflammatory factors TNF- $\alpha$  significantly in the pretreated groups with *T. crispa* stems extract and increase the level of anti-inflammatory cytokine Tgfb1. These result give an indication to the Immunomodulatory effect of the *T. crispa*, may be by effecting in the inflammatory mediator. The gastrointestinal mucosa integrity depends on the balance between the defensive and offensive factors. Many of the components of mucosal defense have proven to be influenced by inflammatory mediators as prostaglandins, leukotrienes and thromboxanes (6). Prostaglandins can also play a role as anti-inflammatory effects, through inhibition of leukocyte recruitment, which can contribute to the beneficial effects for these materials in situations, inflamed the gastrointestinal mucosa(27). TNF- $\alpha$  was pointed out to be a key mediator of the intestinal injury exited by endotoxin One of the mechanisms in which TNF- $\alpha$  can develop inflammatory responses and tissue injury is via its possibility to regulate expression of receptors for other inflammatory mediators, including leukotriene B4 and Platelet Activating Factor (28).

Prostaglandins are powerful inhibitors of TNF- $\alpha$  release from both the macrophage (29) and the mast cell(6), and this may the cause in the cases of pretreatment with *T. crispa* caused elevation of the PGE2 level, it is in turn caused the inhibition of the production of the TNF- $\alpha$ . Another Immunomodulatory effect of *T. crispa* is exiting of production of Tgfb1 an important cytokine in the accelerating gastric ulcer healing. The healing of Gastric ulcer is a complex process, controlled by many factors, hormones and cytokines. Tgfb1 is one of the multifunctional peptide growth factors, has a positive regulate healing of gastric ulcer by induces cell migration,

angiogenesis and improves extracellular matrix production. TGF- $\beta$  exerts its action by binding to its transmembrane serine/threonine kinase receptors, which in turn triggers activation of various intracellular signaling pathways (30). In the previous study reported the immunoreactive of Tgfb1 protein focus to the epithelial cells, in turn of important in the proliferation of gastric glands(31).

## CONCLUSION

In conclusion, our results proof that *T. crispa* pretreatment has protective effects in ethanol-induced gastric ulcers in rats. Moreover, these results provide evidence that these protective effects of *T. crispa* by stimulation of some inflammatory mediators as PGE<sub>2</sub>, gastrin, Tgfb1 and TNF- $\alpha$ . Moreover, important antioxidant enzymes such as SOD and CAT which are scavengers of ROS and therefore prevent gastric injury induced by them.

## REFERENCES

1. Abdel-Fattaha NA, Abdel-Rahman MS. *Effects of omeprazole on ethanol lesions. Toxicology letters* 2000; 118: 21-30.
2. Meneghelli UG, Zaterka S, de Paula Castro L, Malafaia O, Lyra LGC. *Pantoprazole versus ranitidine in the treatment of duodenal ulcer: a multicenter study in Brazil. The American journal of gastroenterology* 2000; 95: 62-6.
3. Israel DM, Hassall E. *Omeprazole and other proton pump inhibitors: pharmacology, efficacy, and safety, with special reference to use in children. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1998; 27: 568-79.
4. Ivarez AnA, Ibiza M, Sales, Andrade M, M. , Blas-Garcı A, Calatayud S. *Gastric Antisecretory Drugs Induce Leukocyte-Endothelial Cell Interactions through Gastrin Release and Activation of CCK-2 Receptors. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007; 323: 406-13.
5. Konturek SJ, Brzozowski T, Piastucki I, Dembinski A, Radecki T, Dembinska-Kiec A, Zmuda A, Gregory H. *Role of mucosal prostaglandins and DNA synthesis in gastric cytoprotection by luminal epidermal growth factor. Gut* 1981; 22: 927-32.
6. Wallace JL, Chin BC. *Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. Experimental Biology and Medicine* 1997; 214: 192-203.
7. Bhattacharya A, Ghosal S, Bhattacharya S. *Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* 2006; 74: 109-16.
8. Zulkhairi A, Abdah M, A, M K, N,H, Nursakinah I, Moklas M, A,M, Hasnah B, Fazali F, Khairunnur F, A, Kamilah K, A,K, Zamree M, S, Shahidan M, M,A. *Biological properties of *Tinospora crispa*(akar patawali) and its antiproliferative activities on selected human cancer cell lines MalJNutr* 2008; 14: 173-87.
9. Trusheva B, Trunkova D, Bankova V. *Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. Chemistry Central Journal* 2007; 1: 1-4.
10. Salga MS, Ali HM, Abdulla MA, Abdelwahab SI. *Acute Oral Toxicity Evaluations of Some Zinc (II) Complexes Derived from 1-(2-Salicylaldiminoethyl) piperazine Schiff Bases in Rats. International Journal of Molecular Sciences* 2012; 13: 1393-404.
11. Ketuly KA, Abdulla M, A. , Hadi H, A., Mariod A, A. , Abdel-Wahab S, Ibrahim *Anti-ulcer activity of the 9alpha-bromo analogue of Beclomethasone dipropionate against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5: 514-20.
12. Barros MPd, Barreto S, Joˆao, Paulo , Bastos J, Kenupp , de Andrade Se, Faloni *Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. Journal of Ethnopharmacology* 2007; 110: 567-71.
13. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. *Roles of oxidantive stress in stomach disorders. JClinBiochemNutr* 2012; 50: 35-9.
14. Freitas FFBP, Fernandes HB, Piauilino CA, Pereira SS, Carvalho KIM, Chavesb MH, Soaresc PMG, Miurad LMCV, Leite JRSA, Oliveiraa RCM, Oliveiraa FA. *Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137: 700-8.
15. Ko J, Cho C, Ogle C. *The Vagus Nerve and its Non-cholinergic Mechanism in the Modulation of Ethanol-induced Gastric Mucosal Damage in Rats. Journal of pharmacy and pharmacology* 1994; 46:



29-33.

16. Glavin GB, Szabo S. *Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. The FASEB journal* 1992; 6: 825-31.
17. Peskar B, Hoppe U, Lange K, Peskar B. *Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on rat gastric mucosal leukotriene C4 and prostanoid release: relation to ethanol-induced injury. British journal of pharmacology* 1988; 93: 937-43.
18. Rao CV, Ojha S, Radhakrishnan K, Govindarajan R, Rastogi S, Mehrotra S, Pushpangadan P. *Antiulcer activity of Uteria salicifolia rhizome extract. Journal of Ethnopharmacology* 2004; 91: 243-9
19. Sannomiya M, Fonseca VB, Da Silva M, Rocha L, dos Santos Ld, Hiruma-Lima C, Souza Brito A, Vilegas W. *Flavonoids and antiulcerogenic activity from Byrsonima crassa leaves extracts. Journal of Ethnopharmacology* 2005; 97: 1-6.
20. Schmassmann A, Tarnawski A, Gerber H, Flogerzi B, Sanner M, Varga L, Halter F. *Antacid provides better restoration of glandular structures within the gastric ulcer scar than omeprazole. Gut* 1994; 35: 896-904.
21. Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CSJ. *Mucins and inflammatory bowel disease. Postgraduate medical journal* 2000; 76: 473-8.
22. Von Herbay A, Rudi J. *Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. Microscopy research and technique* 2000; 48: 303-11.
23. Szabo I, Tarnawski A. *Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. Journal of Physiology and Pharmacology* 2000; 51: 3-16.
24. Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Krause W, J., Gergely H. *Prostaglandin Protection of the Gastric Mucosa Against Alcohol Injury-A Dynamic Time-Related Process Role of the Mucosal Proliferative Zone. Gastroenterology* 1985; 88: 334-52.
25. Casa CL, Villegas I, Lastra C, Alarcon ., Motilva V, Calero M, J., Martin *Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45-53.
26. Glavin GB, Szabo S. *Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. The FASEB Journal* 1992; 6 825-31.
27. Robert A, Lancaster C, Davis J, P. , Field S, O. , Sinha A, J., Wickrema , Thornburgh B, A.. *Cytoprotection by Prostaglandin Occurs in Spite of Penetration of Absolute Ethanol Into the Gastric Mucosa. Gastroenterology* 1985; 88: 328-33.
28. Sun X-m, Hsueh W. *Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. Journal of Clinical Investigation* 1988; 81: 1328.
29. Kunkel S, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J, Remick D. *Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. Journal of Biological Chemistry* 1988; 263: 5380-4.
30. Tanigawa T, Pai R, Arakawa T, Higuchi K, Tarnawski A, S. . *Tgf-b Signaling Pathway: It's Role in Gastrointestinal Pathophysiology and Modulation of Ulcer Healing. Journal of Physiology and Pharmacology* 2005; 56: 3-13.
31. Walsh MF, Ampasala DR, Hatfield J, Vander Heide R, Suer S, Rishi AK, Basson MD. *Transforming growth factor- $\beta$  stimulates intestinal epithelial focal adhesion kinase synthesis via Smad- and p38-dependent mechanisms. The American journal of pathology* 2008; 173: 385-99.

## Investigation of the surface characteristics and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> layers by anodic oxidation

Idil Aritman<sup>1\*</sup>, Metin Yurddaskal<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dokuz Eylul University, Center for Production and Application of Electronic Materials, Izmir, Turkey.

<sup>2</sup>Dokuz Eylul University, Engineering Faculty, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Izmir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: idil.aritman@deu.edu.tr

### Abstract

In this study, investigation of the surface characteristics and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> layers by anodic oxidation with different anodization time were performed. The TiO<sub>2</sub> layers were formed on Ti6Al4V (Grade 23) alloy using electrochemical coating procedure. Anodization parameters such as electrolyte type, anodization time and anodization voltage has great effect on surface properties and photocatalytic activities of the semiconductor oxides. The layers were obtained in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte at 100 V of anodization voltage and in the range of 5-20 minutes of anodization time. The aim of this study is that the effect of the various anodization time on structural properties, surface morphology and photocatalytic properties. Anodization time is determined as 5, 10, 15 and 20 minutes to compare the samples. Surface morphology, phase structure and photocatalytic properties of the TiO<sub>2</sub> layers were analysed by scanning electron microscope, X ray diffraction and UV-vis spectroscopy, respectively. Photocatalytic performances of TiO<sub>2</sub> layers obtained with different anodization time were investigated via methylene blue aqueous solution. It was observed that the anodization time has a great effect on photocatalytic performances due to the formation of different structural properties and surface morphology. Moreover, the further investigation determining the reaction kinetics of photocatalysis were carried out using the related equations. The results showed that the TiO<sub>2</sub> layers formed on Ti6Al4V alloy have porous structures with different pore sizes which implies that it causes the enhancing photocatalytic performances.

**Keywords:** Surface characteristics, photocatalysis, titanium dioxide, structural properties, anodic oxidation.

### INTRODUCTION

Materials such as titanium and its alloys, in special Ti6Al4V, are widely used in various corrosive environments, orthopaedic and dental implants because of their high corrosion resistance in different aqueous solutions, superior biocompatibility, density and mechanical resistance (Fossati, Borgioli, Galvanetto, & Bacci, 2004; Minagar, Berndt, Wang, Ivanova, & Wen, 2012; Ozdemir, Ozdemir, & Basim, 2016; Park et al., 2012; Soares et al., 2008). The preparation of Ti based nanostructured layers is generally carried out by many surface modification techniques including plasma spraying, ion implantation and anodic oxidation. It is noteworthy that the anodic oxidation, among them, is one of the most popular preparation technique for surface modification due to its simple and cost effective, controllable thickness of the layers and surface characteristics. In addition, the formation of nanostructures, porous and tubular structures can be obtained by tuning the parameters of the electrochemical anodization (Indira, Ningshen, Mudali, & Rajendran, 2012; Metin Yurddaskal, 2019).

Photocatalysis has been intensively investigated in recent years. Improving the visible light response of the photocatalyst is one of the issues that need to be addressed. The band gap of TiO<sub>2</sub>, the most widely studied photocatalyst, is 3.2 eV (corresponding to 388 nm) for the anatase phase or 3.0 eV (413 nm) for the rutile phase. Solar light is a favourable excitation source for the photocatalyst; however, UV and visible light are very important for the photocatalytic mechanism considering the solar spectrum (Mizukoshi, Okajima, & Masahashi, 2015). There are very studies about nanostructured TiO<sub>2</sub> layers prepared on Ti and Ti alloys by thermal oxidation and electrochemical procedures (Luo et al., 2008; Matykina, Conde, De Damborenea, Marero, & Arenas, 2011; Sobieszczyk, 2009; Valdez-Salas et al., 2017). It was observed that very few studies reported on effect of anodization parameters on surface characteristics and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> layers on Ti6Al4V by thermal and anodic oxidation.

In this study, investigation of the surface characteristics and photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> layers by anodic oxidation with different anodization time were performed. The TiO<sub>2</sub> layers were formed on Ti6Al4V (Grade 23) alloy using electrochemical coating procedure. Anodization parameters such as electrolyte type, anodization time and anodization voltage has great effect on surface properties and photocatalytic activities of

the semiconductor oxides. The layers were obtained in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte at 100 V of anodization voltage and in the range of 5-20 minutes of anodization time. The aim of this study is to reveal that the effect of the various anodization time on structural properties, surface morphology and photocatalytic properties.

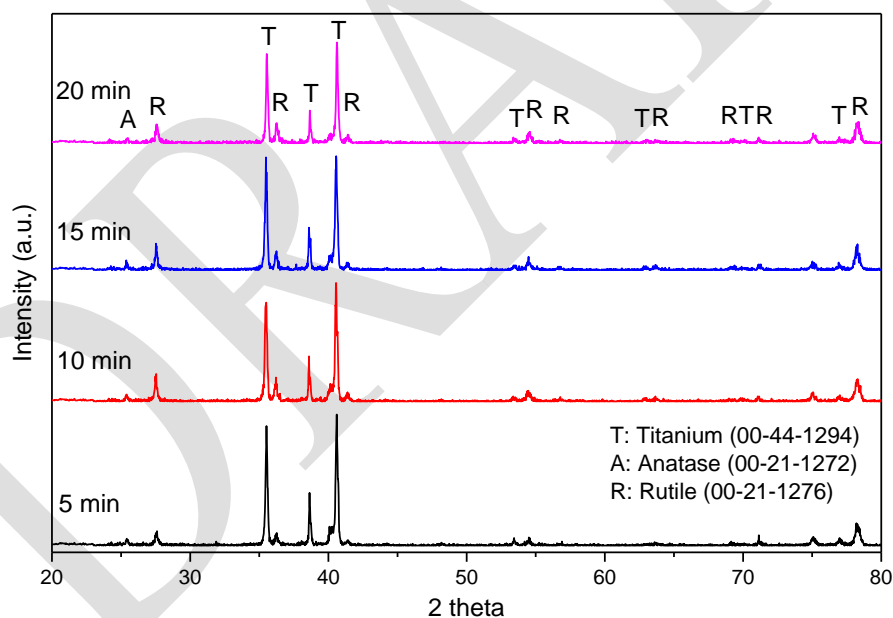
## MATERIALS AND METHODS

The samples with 5 mm thickness and 16 mm diameter were cut from a commercially Ti6Al4V ELI (Grade 23) bar followed by the mechanically grinding and polishing steps. The surfaces of the samples were effectively cleaned with distilled water, ethanol and acetone in an ultrasonic bath for 30 min. Following, a mixture of acid solution was prepared in order to remove the pollutants on the surface. The TiO<sub>2</sub> layers on Ti6Al4V alloy were obtained in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte at 100 V of anodization voltage and in the range of 5-20 minutes of anodization time.

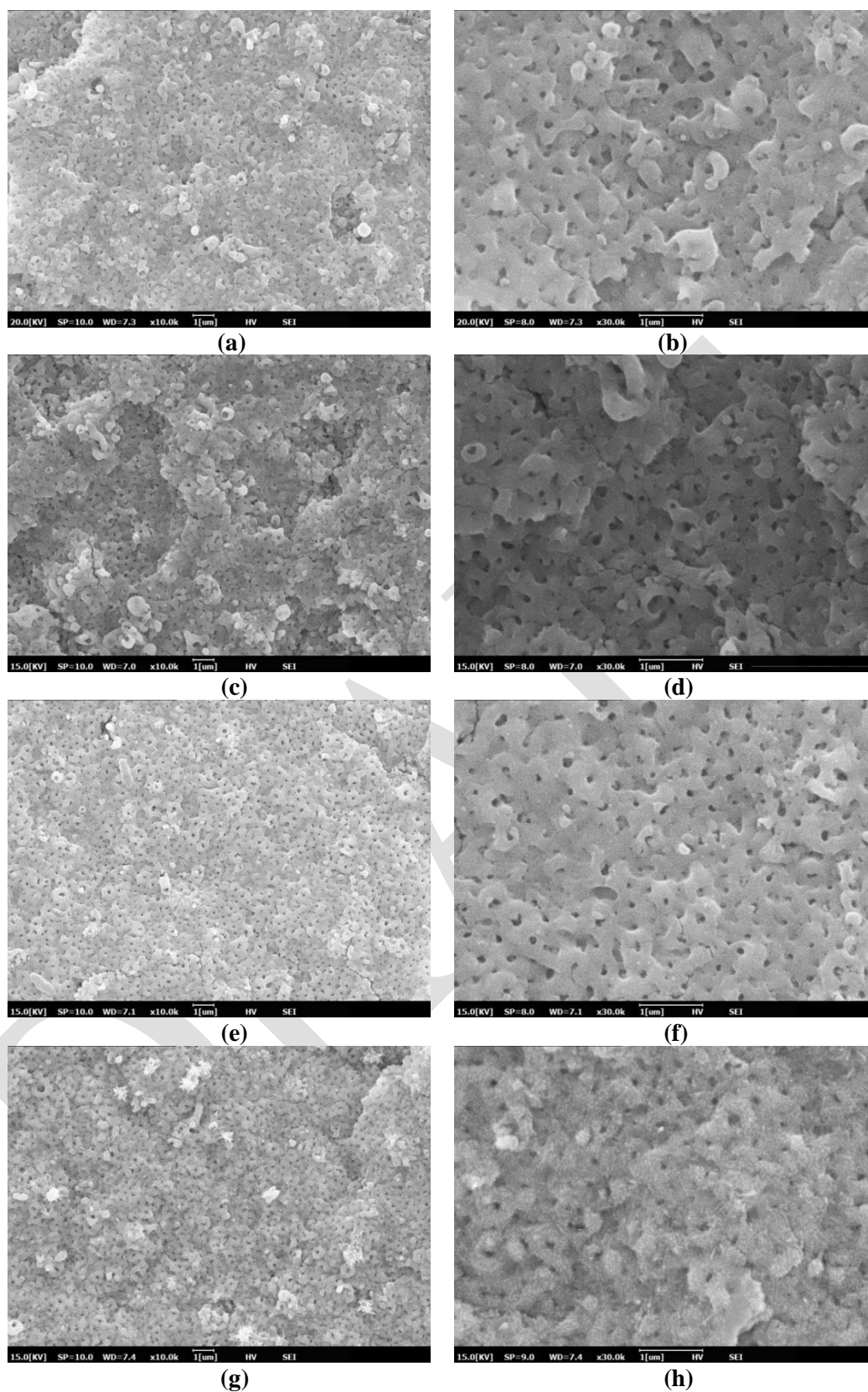
Surface morphology, phase structure and photocatalytic properties of the TiO<sub>2</sub> layers were analysed by scanning electron microscope, X ray diffraction and UV-vis spectroscopy, respectively. Photocatalytic performances of TiO<sub>2</sub> layers obtained with different anodization time were investigated via methylene blue aqueous solution. The photocatalytic degradation efficiencies were determined by using a UV-vis spectrophotometer.

## RESULTS and DISCUSSION

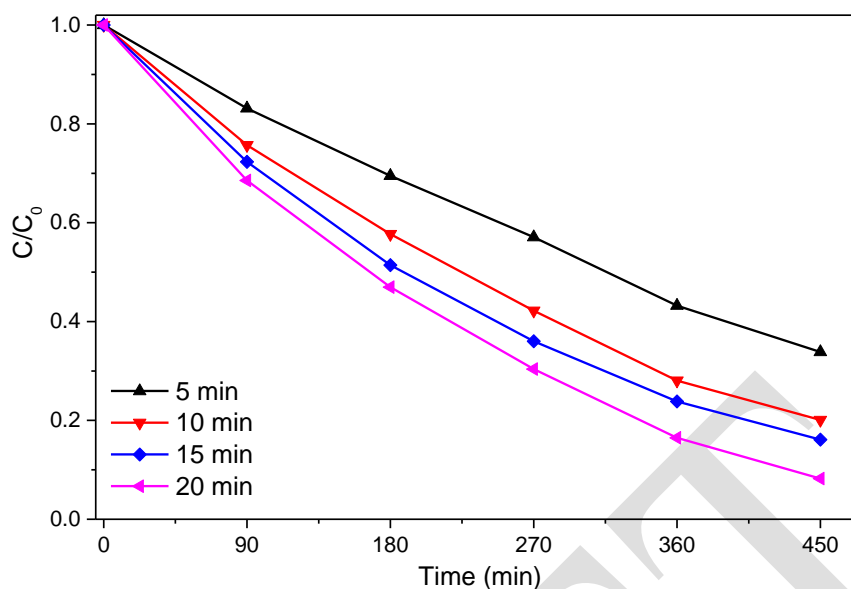
It was observed from the Fig. 1 that the layers prepared in different anodization time are of mixed form of anatase (A), rutile (R) and metallic Ti (T) come from the substrate (ICDD card numbers 00-21-1272, 00-21-1276 and 00-44-1294, respectively). It can be clearly seen from the Fig 1 that the rutile phase is predominant in the layers anodized with increasing the anodization time. It can be understood from the Fig. 1 that the phase transitions of the layers from anatase to rutile are realized after a point which is formed by changing the anodization parameters in accordance with literature (M. Yurddaskal et al., 2015).



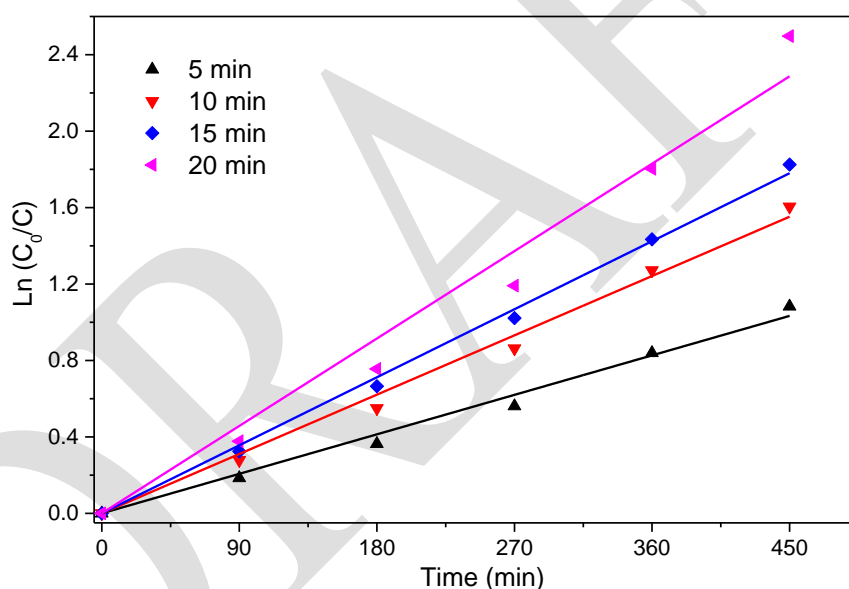
**Figure 19.** XRD patterns of the TiO<sub>2</sub> layers anodized for 100 V at various time (5-20 min) in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> electrolyte.



**Figure 2.** SEM micrographs of the TiO<sub>2</sub> layers formed on Ti6Al4V anodized at different time: 5 min (a, b), 10 min (c, d), 15 min (e, f) and 20 min (g, h)



**Figure 3.** Photocatalytic degradation of MB solution in the presence of the samples prepared in different anodization time



**Figure 4.** Photocatalytic kinetic behaviour of the samples prepared in different anodization time

**Table 14.** Photocatalytic kinetic parameters of the samples

Anodization time	5 min	10 min	15 min	20 min
Degradation efficiency (%)	66.1	79.9	83.8	91.7
Kinetic reaction rate constant ( $\times 10^{-4} \cdot \text{min}^{-1}$ )	23.0	34.5	39.6	50.8
R <sup>2</sup>	0.9981	0.9986	0.9994	0.9952

Figure 2 shows the surface morphology of the samples prepared at different anodization parameters in the range of 5-20 min. It was observed from Fig. 2 that the TiO<sub>2</sub> layers formed on Ti6Al4V have pores that size around 100 nm. It can be seen that the pore sizes are become smaller when the anodization time is increased.

Especially, the sample prepared at 20 min has homogenous and uniform morphology, which may affect the photocatalytic performances (Chiesa, Sandrini, Santin, Rondelli, & Cigada, 2018).

The photocatalytic performances of the TiO<sub>2</sub> surfaces were evaluated for the degradation of the MB ( $1 \times 10^{-5}$  M) aqueous solution in the presence of photocatalysts under UV-visible light irradiation. It can be observed from the Fig. 3 and Table 1 that the MB solution could be degraded more than 90% in 450 min in the presence of the sample anodized at 20 min. To further investigate the photocatalytic activity of the photocatalysts, the photocatalytic degradation kinetics of MB by using TiO<sub>2</sub> films prepared at different anodization time were examined, and the results were shown in Fig. 4. The changes of the MB concentration versus the irradiation time over the TiO<sub>2</sub> layers were obtained according with the pseudo-first-order kinetics plot (An, Zhu, & Xiong, 2002). As a result of photocatalytic tests, the photocatalytic performance increases with the anodization time. The photocatalytic parameters as given in Table 1 the most dramatic increase of degradation rate of MB was achieved with the sample anodized at 20 min. As discussed in XRD characterization of the samples, the anatase/rutile ratio is closely related to the photocatalytic activity of coatings (M. Yurddaskal, Dikici, & Celik, 2016).

## CONCLUSION

In summary, TiO<sub>2</sub> layers successfully prepared on Ti6Al4V alloy substrates by electrochemical anodization following by annealing process in air atmosphere. The crystal structure and surface morphology of the samples could influence the photocatalytic performances greatly. The photocatalytic activities of the TiO<sub>2</sub> layers formed on Ti6Al4V with different anodization parameters were studied by the degradation of MB under UV-vis irradiation. The photocatalytic experimental results indicated that the sample prepared at 20 min has the highest photodegradation efficiency for MB pollutant. It can be said that the photocatalytic activity of the nanostructured TiO<sub>2</sub> films depends on anodization time. Furthermore, an increase of anodization time from 5 min to 20 min led to increasing the photocatalytic performance about 40%.

## REFERENCES

- An, T. T.-C., Zhu, X. X.-H., & Xiong, Y. (2002). Feasibility study of photoelectrochemical degradation of methylene blue with three-dimensional electrode-photocatalytic reactor. *Chemosphere*, 46(6), 897–903.
- Chiesa, R., Sandrini, E., Santin, M., Rondelli, G., & Cigada, A. (2018). Osteointegration of Titanium and Its Alloys by Anodic Spark Deposition and other Electrochemical Techniques: A Review.
- Fossati, A., Borgioli, F., Galvanetto, E., & Bacci, T. (2004). Corrosion resistance properties of plasma nitrided Ti-6Al-4V alloy in nitric acid solutions. *Corrosion Science*, 46(4), 917–927.
- Indira, K., Ningshen, S., Mudali, U. K., & Rajendran, N. (2012). Effect of anodization parameters on the structural morphology of titanium in fluoride containing electrolytes. *Materials Characterization*, 71, 58–65.
- Luo, B., Yang, H., Liu, S., Fu, W., Sun, P., Yuan, M., ... Liu, Z. (2008). Fabrication and characterization of self-organized mixed oxide nanotube arrays by electrochemical anodization of Ti-6Al-4V alloy. *Materials Letters*.
- Matykina, E., Conde, A., De Damborenea, J., Marero, D. M. Y., & Arenas, M. A. (2011). Growth of TiO<sub>2</sub>-based nanotubes on Ti-6Al-4V alloy. *Electrochimica Acta*.
- Minagar, S., Berndt, C. C., Wang, J., Ivanova, E., & Wen, C. (2012). A review of the application of anodization for the fabrication of nanotubes on metal implant surfaces. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 2875–2888.
- Mizukoshi, Y., Okajima, T., & Masahashi, N. (2015). Local structure of vanadium in Ti-6Al-4V alloy anodized in acetic acid aqueous solution and its contribution to visible light response in photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 162, 180–186.
- Ozdemir, Z., Ozdemir, A., & Basim, G. B. (2016). Application of chemical mechanical polishing process on titanium based implants. *Materials Science and Engineering: C*, 68, 383–396.
- Park, J. H., Olivares-Navarrete, R., Baier, R. E., Meyer, A. E., Tannenbaum, R., Boyan, B. D., & Schwartz, Z. (2012). Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1966–1975.
- Soares, P., Mikowski, A., Lepienski, C. M., Santos, E., Soares, G. A., Filho, V. S., & Kuromoto, N. K. (2008). Hardness and elastic modulus of TiO<sub>2</sub> anodic films measured by instrumented indentation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84B(2), 524–530.
- Sobieszczyk, S. (2009). Self-Organized Nanotubular Oxide Layers on Ti and Ti Alloys. *Advances in Materials Sciences*.

- Valdez-Salas, B., Beltrán-Partida, E., Castillo-Urbe, S., Curiel-Álvarez, M., Zlatev, R., Stoytcheva, M., Vargas-Osuna, L. (2017). In Vitro Assessment of Early Bacterial Activity on Micro/Nanostructured Ti6Al4V Surfaces. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(5).
- Yurddaskal, M., Dikici, T., & Celik, E. (2016). Effect of annealing temperature on the surface properties and photocatalytic efficiencies of Cu<sub>2</sub>O/CuO structures obtained by thermal oxidation of Cu layer on titanium substrates. *Ceramics International*, 42(15), 17749–17753.
- Yurddaskal, M., Dikici, T., Yildirim, S., Yurddaskal, M., Toparli, M., & Celik, E. (2015). Fabrication and characterization of nanostructured anatase TiO<sub>2</sub> films prepared by electrochemical anodization and their photocatalytic properties. *Journal of Alloys and Compounds*, 651, 59–71.
- Yurddaskal, Metin. (2019). Formation of Micro- and Nanostructured TiO<sub>2</sub> Films by Anodic Oxidation for Enhanced Photocatalytic Activities. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 1–12.

## Misel Bazlı Biyo-bozunabilir Yalıtım Levhasının Teknolojik Özellikleri

Engin Derya GEZER<sup>1</sup>, Süleyman KUŞTAŞ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Bölümü, Trabzon, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: [suleymankustas@ktu.edu.tr](mailto:suleymankustas@ktu.edu.tr)

### Özet

Bu çalışmada; eşit oranda karıştırılmış yapraklı ve iğne yapraklı ağaç liflerini mantar ön muamelesi edilerek biyo-bozunabilir yalıtım levhası elde edilmiştir. Üretilen yalıtım levhasının yoğunluğu ASTM C303 (2012), eğilme direnci ve elastikiyet modülü ise ASTM C203 05a (2012) standardında belirtilen esaslara göre tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre yoğunluk ve mekanik direnç değerleri standart uygun olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mantar; biyo bozunabilir malzemeler; yalıtım malzemesi; fiziksel ve mekanik özellikler

### GİRİŞ

Son zamanlarda, misel bazlı biyo-bozunabilir kompozitlerinin, petrol ve doğal gaz gibi yenilenemeyen kaynaklardan elde edilen sentetik malzemelere çevre dostu bir alternatif olarak kullanılmasında sürekli bir artışa olmuştur (Holt ve ark., 2012; Arifin ve Yusuf, 2013). Misel, hüf olarak bilinen bir filament hücrelerinin uç uca ilavesiyle mikroskobik iplikçikler ağından oluşan mantar filamentlerinin vejetatif olarak büyümesidir (Fricker ve ark., 2017). Hüfler, enerjiye ihtiyaç duymadan uygun çevresel koşulları altında organik malzemenin yüzeyini sarar ve bağlanır, böylece kendiliğinden doğal tutkal görevi görür (Haneef ve ark., 2017). Misel bazlı biyo-bozunabilir kompozitlerin kullanım sebepleri; düşük maliyetleri, düşük çevresel etkileri ve karbon ayak izi, düşük yoğunlukları, düşük enerji tüketimi ve en önemlisi de biyolojik olarak bozunabilirliğidir (Jones ve ark., 2017). Misel bazlı biyo-bozunabilir kompozitler, plastikler kadar geometrik olarak da çok yönlüdür. Basit ve karmaşık tasarım geometrisiyle benzersiz ürünlerin üretimi için uygundur. Misel büyümesi, basit ve karmaşık tasarım geometrisine bakılmaksızın tasarım kalıbı içindeki organik hammaddeyi sindirmesidir (Holt ve ark., 2012; Pelletier ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2017). Ayrıca misellerin ileri üretim teknikleri kullanılarak çeşitli substratlarda büyüdüğünden dolayı pahalı ve çevreye zararlı petrol türevlerinden elde edilen sentetik malzemelere ve sentetik tutkal kullanılan odun kompozitlerine düşük maliyetli ve sürdürülebilir alternatifler haline getirir (Jones ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı, eşit oranda karıştırılmış yapraklı ve iğne yapraklı ağaç liflerini beyaz çürüklük mantarı ile inkübasyona maruz bırakılarak misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhası elde edilmiştir. Üretilen misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının yoğunluk, eğilme direnci ve eğilmede elastikiyet modülü değerleri araştırılmıştır.

### MATERYAL VE METOT

#### Materyal

Hızlı büyüyen ve yaygın olarak bulunan beyaz çürüklük mantarı lignin ayrışma kabiliyeti ve hızlı büyüdüğünden dolayı bu çalışma için seçilmiştir. Beyaz çürüklük mantar kültürü Northern Research Station United States Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, U.S.A 'den temin edilmiştir. Odun lifleri ise selüloz ve lignin içerdiğinden dolayı substrat malzemesi olarak seçilmiştir. Kastamonu Entegre 'den temin edilen lifler; %50 çam türleri, %50 yapraklı ağaç odunları liflerinden üretilmiştir.

#### Metot

Mantarların besi ortamı için buğday tanesi hazırlanmıştır. Buğday tanesinin hazırlanması bir çelik kazan içerisinde yeterince su ilave edilerek buğday tanelerinin yumuşayınca kadar kaynatılmıştır. Kaynatılan buğday taneleri sterilize etmek için cam şişelere konularak ağızları alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra 121 °C' deki otoklavda 20 dk. bekletilmiş ve sonrasında alınıp aşılama kabiniinde soğumaya bırakılmıştır. İyice soğuduktan sonra buğday tanelerine beyaz çürüklük mantar miselleri aşılandıktan sonra mantarların büyüebilmesi için cam şişeler 25 °C ve %70 bağıl nemdeki iklimlendirme kabiniinde mantar gelişimi tamamlanincaya kadar bekletilmiştir (Şekil 1).





Şekil 1. Mantar besi ortamı hazırlanması. A)Kaynatılmış buğday taneleri, B)Buğday tanelerine sarılmış mantar miselleri

Odun lifleri ise rutubet oranı %70-80'e ve pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra ısıya dayanıklı polietilen poşetlerde 121°C de 30 dakika süreyle otoklavda steril edilip ve steril bir ortamda soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan örnekler buğdaya sardırılmış mantar kültürü ile aşılacak ve 25 °C ve %70 bağıl neme ayarlanmış klima dolabında 35 gün inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra serme işlemine yapılmıştır. Serme işlemi sonrasında oluşturulan levha taslağı, tek katlı sıcak preste preslenerek levha üretimleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra levha örnekleri klimatize edilmiş, boyutlandırılıp testlere hazır hale getirilmiştir.

#### Yoğunluk

Üretilen misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemelerin hava kuru yoğunluk değerleri esas alınmıştır. Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesinin yoğunluğu ASTM C303 (2012)'de belirtilen esaslara uygun olarak belirlenmiştir. Örnekler tam değişmez ağırlığa gelinceye ulaşmaya kadar 103±2 °C kurutulmuş ve örneklerin hava kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Örneklerin; hacimleri ve ağırlıkları belirlenmiştir. Yoğunluğun belirlenmesinde;

$$\delta = m/v \text{ (gr/cm}^3\text{)} \quad (1)$$

Eşitliği kullanılmıştır. Burada;

$\delta$ : Yoğunluk (g/cm<sup>3</sup>)

m: Tam kuru ağırlık (g)

v: Örnek hacmi (cm<sup>3</sup>) dir.

#### Eğilme Direnci

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesinin ve ambalaj malzemesinin eğilme direnci ASTM C203 05a (2012) standardına belirtilen esaslara göre yapılmıştır. Örnekler 20±2°C ve bağıl nemi % 65±5 olan iklimlendirme odasında değişmez ağırlığa ulaşmaya kadar bekletilmiştir. Örneklerin genişlik ve kalınlıkları dijital mikrometre ile belirlenmiştir. Eğilme direnci;

$$\sigma_e = (3/2) \times (F_{\max} \times L_s / b \times d^2) \text{ (kg/cm}^2\text{)} \quad (2)$$

eşitliğinden hesaplanmıştır. Burada;

F<sub>max</sub>: Kırılma anındaki maksimum kuvvet (kg)

L<sub>s</sub>: Dayanak noktaları arasındaki açıklık (cm)

d: Örnek kalınlığı (cm)

b: Örnek genişliği (cm)

#### 5.4.2.1 Eğilmede Elastikiyet Modülü

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesinin eğilmede elastikiyet modülü ASTM C203 05a (2012) standardına belirtilen esaslara göre yapılmıştır. Örnekler 20±2°C ve bağıl nemi % 65±5 olan iklimlendirme odasında değişmez ağırlığa ulaşmaya kadar bekletilmiştir. Eğilmede elastikiyet modülünün (E) belirlenmesinde;

$$E = F \times L_s^3 / 4 \times \Delta_e \times b \times d^2 \text{ (kg/cm}^2\text{)} \quad (3)$$

eşitliği kullanılmıştır. Burada;

$\Delta_e$ : Eğilme miktarı (sehim) (cm)

F: Deformasyon sağlayan kuvvet (kg)

L<sub>s</sub>: Dayanak noktaları arasındaki açıklık (cm)

d: Örnek kalınlığı (cm)

b: Örnek genişliği (cm)

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Yoğunluk

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının ortalama hava kuru yoğunluk değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının ortalama hava kuru yoğunluk değerleri

Malzeme Çeşidi	Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )	
	Ortalama	Standart sapma
Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhası	0.44	0.03

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesinin yoğunluğu 0.44 g/cm<sup>3</sup> olarak tespit edilmiştir. Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesinin yoğunluğu, polistrenin yoğunluğu göre oldukça yüksektir (ASTM C578-04). Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yalıtım malzemesi polistrene alternatif bir malzeme olabileceği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Holt ve ark., 2012).

### Eğilme Direnci ve Eğilmede Elastikiyet Modülü

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının ortalama eğilme direnci ve eğilmede elastikiyet modülü değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının ortalama eğilme direnci ve eğilmede elastikiyet modülü değerleri

Malzeme Çeşidi	Eğilme Direnci (kg/cm <sup>2</sup> )		Eğilmede Elastikiyet Modülü (kg/cm <sup>2</sup> )	
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhası	31.20	3.67	5324.75	3706.57

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının eğilme direnci 31.20 kg/cm<sup>2</sup> olarak belirlenmiştir. Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının eğilme direnci sentetik polistrenden daha düşüktür ancak kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının eğilmede elastikiyet modülü 5324.75 kg/cm<sup>2</sup> olarak tespit edilmiştir. Holt ve ark. (2012) farklı boyutlardaki pamuk kozası ve pamuk tohum atıklarını farklı oranlarda karıştırarak *Ganoderma sp* mantarı inkübasyona maruz bırakarak ambalaj malzemesi elde etmiştir. Üretilen ambalaj malzemelerin eğilmede elastikiyet modülü değerleri ile benzerlik göstermektedir.

## SONUÇ

Bu çalışma misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhaları üretmek mümkündür. Misel bazlı biyo-bozunabilir kompozitlerin, petrol ve türevlerinden elde edilen sentetik yapı malzemelerine karşı ekonomik ve sürdürülebilir bir alternatif olmuştur. Fakat teknolojik özellikleri polistren ile aynı özelliklere sahip değildir. Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhaların hava kuru yoğunluğu, eğilme direnci ve eğilmede elastikiyet modülü değerleri polistrenin direnç değerlerinden farklıdır. Bununla birlikte, Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhasının teknolojik değerleri ilgili standart değerlerine göre kabul edilebilir değerdedir. Teknolojik özelliklerini arttırmak için kullanılan lignoselülozik materyalin ve mantarın türü değiştirilebilir. Misel bazlı biyo-bozunabilir yalıtım levhası teknolojik özelliklerini arttırmak için lignoselülozik materyale katkı maddeleri ilave edilebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK (1001) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 118O145 kodlu proje ile desteklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Arifin YH and Yusuf Y 2013. Mycelium fibers as new resource for environmental sustainability. *Procedia Engineering*, 53, 504-508.
- ASTM C 203 05a 2012. Standard Test Methods for Breaking Load and Flexural Properties of Block-Type Thermal Insulation; ASTM International: West Conshohocken, PA.

- ASTM C 303 2012. Standard Test Method for Dimensions and Density of Preformed Block and Board-Type Thermal Insulation; ASTM International: West Conshohocken, PA.
- ASTM International, ASTM C578–04 2004. Standard Specification for Rigid, Cellular Polystyrene Thermal Insulation, West Conshohocken, PA.
- Fricker MD, Heaton LL, Jones NS, and Boddy L 2017. The mycelium as a network. *Microbiology spectrum*, 5(3).
- Holt GA, McIntyre G, Flagg D, Bayer E, Wanjura J D, & Pelletier MG 2012. Fungal mycelium and cotton plant materials in the manufacture of biodegradable molded packaging material: Evaluation study of select blends of cotton byproducts. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 6(4), 431-439.
- Jones M, Huynh T, Dekiwadia C, Daver F, & John S 2017. Mycelium composites: A review of engineering characteristics and growth kinetics. *Journal of Bionanoscience*, 11(4), 241-257.
- Jiang L, Walczyk D, McIntyre G, Bucinell R and Tudryn G 2017. Manufacturing of biocomposite sandwich structures using mycelium-bound cores and preforms. *Journal of Manufacturing Processes*, 28, 50-59.
- Pelletier MG, Holt GA, Wanjura JD, Bayer E, & McIntyre G 2013. An evaluation study of mycelium based acoustic absorbers grown on agricultural by-product substrates. *Industrial crops and products*, 51, 480-485.

DRAFT

## Mantar Miseli Bazlı Biyo-Bozunabilir Kompozitlerin Fiziksel ve Mekanik Özellikleri

Engin Derya GEZER<sup>1</sup>, Süleyman KUŞTAŞ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Bölümü, Trabzon/Türkiye

\*Sorumlu Yazar: suleymankustas@ktu.edu.tr

### Özet

Mevcut fiziksel ürün ekonomisi, kullanım süresini ve çevresel etkilerini göz önünde bulundurmadan sınırlı olan değerli kaynakları kullanarak malzemeler üretmektedir. Biyo-bozunabilir mantar miseli bazlı kompozitler, lignoselülozik materyallerin ve atıkların değerlendirilmesine ve mantar organizmasının doğal büyümesine dayanan gelişmekte olan bir biyo-kompozitlerdir. Mantarlar, mantar hücrelerinin uç uca ilavesiyle oluşan mikroskopik iplikçikler halinde hüfleri oluşturur. Misellerin yapısında bulunan hüflerin büyümesi ve ağ yapısının genişlemesiyle yapısal olarak bağlama özellikleri sağlar. Yalıtım panelleri, ambalaj malzemeleri ve yeni tasarım malzemeleri üretmek için özel kalıplar kullanarak şekillendirilebilir/üretilebilir. Mevcut literatüre göre, Dünyadaki sadece birkaç öncü şirket malzeme karakterizasyonunu sağlama yeteneğini de elinde tuttuğu dolaylı endüstriyel gizlilik nedeniyle teknik detay ortaya çıkmamıştır. Biyo-kompozitler, düşük yoğunluğa sahip olmaları, iyi yalıtım özelliklerine sahip olmaları, ekonomik olmaları, üretim aşamasında daha az enerji gereksinimleri sentetik yapıştırıcı kompozitler ile kıyaslandığında daha düşüktür.

Bu derleme çalışmasında; mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir kompozitlerin fiziksel ve mekanik özellikleri irdelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mantar; Mantar miseli; biyo-bozunabilir kompozit; yalıtım malzemesi; ambalaj malzemeleri; yeni tasarım malzemeleri.

### GİRİŞ

Sentetik malzemeler genellikle petrol ve doğalgaz bazlı yenilenemeyen veya sınırlı doğal kaynaklardan üretilir. Bu petrol türevi hammaddeler özellikle plastik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte polietilen ambalajlar ve izolasyon malzemelerinden araba tamponlarına kadar bir çok malzemenin üretiminde kullanılmaktadır (Pakse, 2012).

Sentetik malzemeler petrol türevlerinden üretildiklerinden kullanım ömrü sonunda geri dönüşümü veya yok edilmesi için hem ekonomik hem de çevre dostu ürünler değildir. Türkiye’de 2017 yılında 3.150.000 ton plastik ambalaj malzemesi üretilmiş, bunun sadece %15.78 geri kazanılmıştır (CSB, 2019). Sentetik malzeme atıklarının çöplüklere atılmasıyla toksin maddeler yaymaktadır. Toksin maddeler ise toplam sera gazlarının yaklaşık %75 oluşturur. Bu oranın %55’ini oluşturan metan ise küresel ısınmaya etkisi karbondioksitten 21-25 kat fazladır (ACGI, 2009).

Petrol rezerv kaynaklarının azalmasıyla petrol yakıt fiyatları artmaktadır. Bununla birlikte, petrol türevlerinden elde edilen sentetik malzemelerin çevresel zararları ve iklim değişikliği etkisinin artmasından dolayı sentetik malzemelere alternatiflere ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı ülkelerde düzenlemeler yapılmasıyla birçok projede yaşam boyu karbon değerlendirmesine ihtiyaç duymakta ve karbon yoğun tedarik zincirleri olan malzemelere kısıtlamalar getirmektedir (European Commission, 2014). 1.5 trilyon dolar değerindeki küresel kimya endüstrisinin üçte ikisinin petrokimyasal işlemlerin yenilenebilir kaynaklar ile değiştirilmesi beklenmektedir (Mohanty, 2005).

Biyoplastikler, biyofilmler ve fotokatalitikler gibi malzeme bilimi teknolojileri yılda % 20-30 oranında artmaktadır, çünkü geleneksel malzemelerden daha çevrecidirler (Vidal, 2008; Haneef ve ark., 2017; Lian ve ark., 2017). Bunlar, geleneksel plastiklerden en az % 20 daha pahalıdır ama atık depolama alanların da anaerobik çürütücülerle çevreye zarar vermeden yok edilebilirler (Vidal, 2008). Biyo-plastikler çöp deposunda nem varlığından dolayı anaerobik olarak bozulurlarsa metan üretirler (Dell, 2010).

Daha fazla ekonomik ve çevreci malzemeler sürdürülebilir bir dünyaya geçişimizi kolaylaştırmak için gereklidir. Düşük enerji tüketim süreçleri, minimum karbon emisyonları, tamamen biyolojik olarak bozulabilir ve maliyet açısından rekabetçi malzemeler üretmek mümkündür. Bu ise doğal biyolojik malzemelerden ve yan ürünlerden yararlanma yeteneğimize bağlıdır (Jones ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı, yapılan araştırmalar ve potansiyel uygulamalar dikkate alındığında mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzemelerin teknolojik özelliklerine ilişkin mevcut bilgileri özetlemektir. Bu çalışma, özellikle ambalajlama, bina yalıtımı ve iç tasarım alanlarında giderek çeşitlendirilmiş uygulamalar için

kullanılabilecek yeni malzemeler elde etmek için gelecekteki araştırma faaliyetlerini yönlendirmek için faydalı olabilir.

## 2. Mantar Biyolojisi

Mantarlar, organik madde ile beslenen çeşitli tek hücreli, çok hücreli veya sözdizimsel spor üreten organizmalar grubudur. Bunlar küfleri, mayaları, mantarları ve zehirli şapkali mantarları içerir (Stevenson, 2010). Mantarlar âleminde yaklaşık 15000 ile 120000 tür kaydedilmiş ve yaklaşık olarak 80000 ile 120000 tür bulunmaktadır (Hawksworth, 2001; Webster ve weber, 2007; Blackwell, 2011).

Mantarlar, besin kaynaklarını parçalayan selülazlar, oksidazlar, fosfatazlar, kitinazlar ve proteazlar gibi enzimlerin salgılanmasının ardından çözünen besin maddelerinin emilimiyle dış sindirimi gerçekleştirirler (Sinsabaugh, 1994; Webster ve Weber, 2007). Çevresel koşullar ve kimyasal beslenme gibi dış faktörlerin mantar büyümesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu faktörler özellikle mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzeme üretim prosesi ile ilgilidir.

### 2.1 Dış Faktörler

Mantarlar sıcaklık, su aktivitesi ve pH'a göre optimum büyüme ortamlarına göre sınıflandırılabilir. Mezofilik veya nötrofilik mantarlar normal çevre koşullarında en uygun büyümeyi yaşarken, ekstremofilik mantarlar anormal veya aşırı habitatlarda gelişir.

Mantar misellerinin belirli biyolojik koşullarda büyüme için dış faktörlerin optimum değerlerde olması mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzeme üretimi için önemlidir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Mantarların büyümesi için dış faktörlerin optimum değerleri.

Dış Faktörler	Optimum Değerleri
Aşılama koşulları	% 10-32 misel
Sıcaklık(°C)	0-17 (Psikrofilik)
	15-40 (Mesofilik)
	37-50 (Termofilik)
Su Aktivitesi (Rutubet(%))	60-80
pH	4-6

#### 2.1.1 Aşılama Koşulları

Aşılama koşulları mantar misellerinin etkili büyümesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bu ise düşük oranda mantar miseli ve daha yüksek oranda şeker konsantrasyonlarının varlığında olur (Myrath, 1963). İdeal aşılama yoğunluğu, kullanılan malzemelere 5-14 günlük bir inkübasyon süresiyle kullanılan misellerin sıvı veya katı ortamına bağlı olarak tam kuru kompost ağırlığına oranla %10-32 misel miktardır (McIntyre, 2012).

#### 2.1.2 Sıcaklık

Sıcaklık, mantar misellerinin etkili büyümesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Mantar miseli büyümesinde yüksek sıcaklık enzimleri etkisiz hale getirir, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimleri bozan ve proteinlerin ve nükleik asitlerin doğal yapısını bozar (Kavanagh, 2017). Optimum sıcaklıklar psikofiller için 10 °C'den düşük, mezofiller için 18-22 °C ve termofiller için 37 °C'nin üzerindedir ancak aynı zamanda su ve besin mevcudiyeti de bağlıdır (Burge, 2006).

#### 2.1.3 Su Aktivitesi

Su lignoselülozik malzemeye arız olan mantarların gelişmesi için 4 ayrı şekilde rol oynamaktadır.

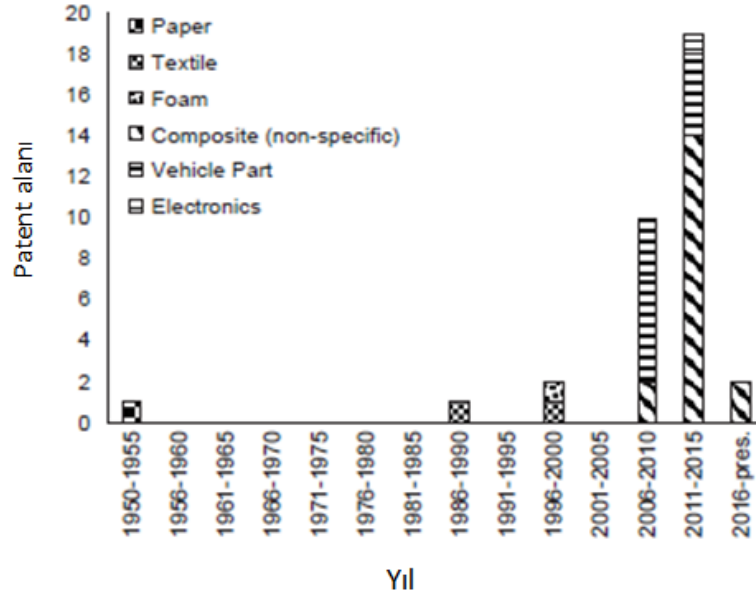
- Çürüme, mantarlarca salgılanan hidrolitik enzimlerce hücre çeperi karbonhidratlarının besin maddesi olarak kullanımını içermektedir. Su bu kimyasal işlemin bir reaksiyon başlatıcısıdır.
- Enzimler ve çözülebilecek yapıdaki besin ortamı molekülleri için difüzyon ortamı olarak: serbest su hidrolitik enzimlerin hüf meydana getirecek şekilde nüfus etmesi için gerekmektedir.
- Su, mantar hüfündeki birçok enzim için mutlak zorunlu bir çözücüdür.
- Lignoselülozik malzemenin su alarak genişlemesi sırasında hücre çeperindeki küçük kapiler boşluklar serbest su ile dolar ve genişler böylece buralara enzimlerin ulaşması sağlanır (Yıldız, 2000).

#### 2.1.3 pH

Çoğu mantar asidofilik olduklarından 4 ila 6 pH aralığında iyi büyür. Bu asidik ortam, optimum mantar büyümesi için gereken hidrojen içeriğini sağlar (Kavanagh, 2017).

## 2.2 Mantar Miseli Bazlı Biyo-bozunabilir Kompozitler

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzemeleri, kağıt, tekstil, köpük (ambalajlama, akustik ve tıbbi uygulamalar için), taşıt parçaları ve elektronikler dahil olmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmakta ve patent başvuru sayısı da her yıl artmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. 1954'ten günümüze mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzemelerin endüstriyel kullanım alanlarına göre patent başvuruları (Bayer ve McIntyre, 2012).

### 2.2.1 Mantar Miseli Bazlı Biyo-bozunabilir Köpük

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir köpük, sentetik polistiren köpüğüne bir alternatif olabilir (Holt ve ark., 2012). Ancak mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir köpüğün yoğunluğu polistiren köpüğüne göre oldukça yüksektir.

Basınç ve eğilme direnci, sentetik polistirenden daha düşüktür, ancak kabul edilebilir sınırlar içindedir. Ambalajlama uygulamaları için basınç dayanımı özellikle önemlidir, çünkü ambalaj malzemesinin en nemli özelliklerinden biri içerisindeki materyali hasara karşı korumaktır.

Elastikiyet modülü, boyutsal stabilite, bozulma oranı, yanmayı geciktirici özellikleri ve ısı iletkenlik de genel olarak kabul edilebilir, ancak su alma bazen ambalajlama uygulamaları için kabul edilemez derecede yüksek olabilmektedir (% 114–278) (Holt ve ark., 2012).

### 2.2.2 Yapı Malzemesi

**a) Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir tuğlalar:** 2009'da Düsseldorf Kunsthalle tarafından *Ganoderma lucidum* mantarı ve talaş kullanarak ürettiği 500 tuğla üreterek “Mycotectural Alpha” çayhanesi yapılmıştır. Bu tarihten beri mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir tuğlalar mimari yapıların yapımında kullanılmaktadır (Fisher, 2010).

Üretilen en büyük mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir tuğla yapısı ise, Şekil 2'deki 2014 yılında inşa edilen “Hy-Fi” organik biyo bozunabilir kuledir. Parçalanmış mısır saplarından ve açıklanmayan mantar türlerinden üretilen 10000'den fazla tuğladan oluşmakta ve 12 m yüksekliğindedir (Rajagopal, 2014).



Şekil 2. “Hy-Fi” organik biyo bozunabilir kule (Danilnagay 2014)

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir tuğlaları öncelikle sanat ve tasarım uygulamaları için kullanıldığından, teknolojik özellikleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, geleneksel tuğlalara kıyasla düşük yoğunluklu ve düşük basınç dayanımı sağlar (Travaglini ve ark., 2013).

MycoBoard markalı mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yonga levha, çalışma yüzeyleri, kalıplanmış mobilya parçaları, koltuk arkılığı, mimari paneller ve dolap gibi alanlarda kullanılmıştır (Şekil. 3). mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yonga levha, sentetik yapıştırıcılar ile üretilen yonga levhaya, kontrplak ve lif levhaya çevresel olarak sürdürülebilir bir alternatif sunar.



Şekil 3. MycoBoard yonga levha (Ecovative Desing, 2016)

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir yonga levhaların muhtemel fikri mülkiyet kısıtlamaları nedeniyle, ürünün nasıl üretildiğine ve bileşiminin nelerden oluştuğu bilinmemektedir. Bununla birlikte, sentetik yapıştırıcılar ile üretilen yonga levhaların eğilme direnci ve elastikiyet modülü değerleri kıyaslandığında hem eğilme direnci hem de elastikiyet modülü değeri eşdeğer tespit edilmiştir (Ecovative Desing, 2016).

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir köpükleri ve yapı malzemeleri en iyi bilinen mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir malzemelerinin örnekleri olsa da, birçok başka basit ve karmaşık tasarım ürünleri de üretilmektedir (Şekil 4). Mantar miselinin büyümesi bulunduğu ortamın geometrisine bakılmaksızın ortamdaki besinlerden beslenerek büyüdüğü için biyo bozunabilir tasarım ürünleri üretmek için özel kalıplar kullanılmaktadır.



Şekil 4. Tasarım Ürünleri; 1. Lambader, 2. Saksı, 3. Oyuncak ayı, 4. Sehpa (Ecovative Desing, 2016).

### 3.Sonuç

Küresel ısınmanın ve çevresel sorunların artmasıyla uluslararası sıkı düzenlemelerle hammaddesi petrol ve türevleri olan birçok malzemelerin biyo-bozulabilir çevreci malzemelerle değiştirilmesini gerekli kılmaktadır. Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir kompozitler, biyolojik olarak üretildiklerinden dolayı üretim esnasında pahalı enerji tüketimi gerçekleşmez, hammadde olarak da düşük maliyetli organik ve organik atıkları kullanıldığından kullanım ömrünün sonunda doğası gereği biyolojik olarak parçalanabildiklerinden ömür boyu elden çıkarma maliyetleri yoktur. Bu onları birçok sentetik malzemelere ekonomik ve çevresel olarak uygun alternatif haline getirmektedir.

Kimyasal beslenme ve aşılama koşulları, sıcaklık, su aktivitesi ve pH gibi dış faktörler misel büyüme hızını etkileyebilir ve bu faktörlerin optimum değerler olması gereklidir.

Mantar miseli bazlı biyo-bozunabilir kompozitlerin mevcut uygulamaları ambalaj malzemesi ve sınırlı yapı malzemeleri olsa da diğer orman endüstri sanayinde de kullanılabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK (1001) Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 1180145 kodlu proje ile desteklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Allen Consulting Group 2009. National Waste Policy Regulatory Impact Statement.
- European Commission 2014. Communication from the commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee of the Regions on Resource Efficiency Opportunities in the Building Sector.
- Bayer E, and McIntyre G 2012. "Substrate composition and method for growing mycological materials." U.S. Patent Application No. 13/492,230.
- Blackwell M 2011. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3), 426-438.
- Burge H 2006. How does heat affect fungi. *The Environmental Reporter*, 4(3), 1-3.
- Çevre ve Şehircilik Bakanlığı-Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü-Sıfır Atık Yönetimi Dairesi Başkanlığı-Sıfır Atık ve Ambalaj Atıkları Yönetimi Şube Müdürlüğü, <http://cygm.csb.gov.tr/> [Erişi: 28.02.2019]
- Dell K 2010. Time Magazine, May 3, p. 1. <http://content.time.com/time/magazine/article/0,9171,1983894,00.html>
- Danilnagay 2014. <http://danilnagay.com/hy-fi>
- Ecovative Design 2016. MycoBoard.
- Fisher A 2010. Industrial-Strength Fungus, Time Magazine, <http://content.time.com/time/magazine/article/0,9171,1957474,00.html>. February
- Haneef M, Ceseracciu L, Canale C, Bayer IS, Heredia- Guerrero JA, and Athanassiou A, 2017 *Sci. Rep.* 7, 1.
- Hawksworth, DL 2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- Holt GA, McIntyre G, Flagg D, Bayer E, Wanjura J D, & Pelletier MG 2012. Fungal mycelium and cotton plant materials in the manufacture of biodegradable molded packaging material: Evaluation study of select blends of cotton byproducts. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 6(4), 431-439.
- Jones M, Huynh T, Dekiwadia C, Daver F, & John S 2017. Mycelium composites: A review of engineering characteristics and growth kinetics. *Journal of Bionanoscience*, 11(4), 241-257.
- Kavanagh K (Ed.) 2017. *Fungi: biology and applications*. John Wiley & Sons.
- Lian Y, Bai X, Li X, Gao Z, Hu Z, and Hu G, 2017. RSC Adv. 12, 6842.
- McIntyre G, Poetzsch A, van Hook S and Flagg D 2012. Method for producing a composite material, U.S. Patent 20,120,225,471, September.
- Mohanty A K, Misra M, & Drzal LT 2005. *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. CRC press.
- Peksa N 2012. The price movement of plastics, spend matters network. Buckinghamshire, UK.
- Rajagopal A 2014. Behind The Living's "100% Organic" Pavilion for MoMA PS1, *Metropolis*.
- Stevenson A. (Ed.) 2010. *Oxford dictionary of English*. Oxford University Press, USA.
- Travaglini S, Noble J, Ross PG, & Dharan CKH 2013. Mycology matrix composites. In *Proceedings of the American Society for Composites-28th Technical Conference, State College, PA, Sept. Sept* (Vol. 9, No. 11, pp. 1-20).
- Vidal, J 2008. 'Sustainable' Bio-Plastic Can Damage the Environment, *The Guardian*, <https://www.theguardian.com/environment/2008/apr/26/waste.pollution>.
- Yıldız ÜC 2000. Odun Zararlıları (Basılmamış Ders Notları). K.T.Ü.Orman Fakültesi, Trabzon.
- Webster J, and Weber R 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press.



## Ladin ve Kızılağaç Odunlarında Çeşitli Ağartıcıların Renk Değişimleri Üzerine Etkisi

Özlem BOZDOĞAN BALÇIK<sup>1</sup>, Turgay ÖZDEMİR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendiliği Bölümü, 61080, TRABZON, TÜRKİYE

<sup>2\*</sup> Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendiliği Bölümü, 61080, TRABZON, TÜRKİYE

\*sorumlu yazar e mail: turgay@ktu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmanın amacı, ağartma işlem uygulamasının ülkemizde ticari öneme sahip ağaç türleri odunlarında yüzey pürüzlülüğü ve renk değişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla yapraklı ağaç türlerinden Kızılağaç, iğne yapraklı ağaç türlerinden ladin ve ağartma maddesi olarak oksalik asit, perasetik asit kullanılmıştır. Standartla belirtilen boyutlarda deneme örnekleri hazırlanmış ve örnekler üzerinde yüzey pürüzlülüğü ve renk değişimi ölçümleri yapılmıştır. Sonuç olarak, ladin ve kızılğaç odunlarında perasetik asit ile ağartmada yüzey pürüzlülük değerleri ve renk değişimi ölçümleri oksalik asit ile ağartmaya göre daha iyi sonuçlar vermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** ladin,kızılağaç, OksalikAsit, Perasetik Asit

### Effect of Various Bleaches on Color Changes in Spruce and Alder Wood

#### Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of bleaching treatment on surface roughness and color change of commercially important wood species in Turkey. For this purpose, alder wood species, coniferous tree species spruce and bleaching agent, oxalic acid, peracetic acid were used. Test samples were prepared in the dimensions specified by the standard and surface roughness and color change measurements were made on the samples. As a result, surface roughness values and color change measurements of bleaching with peracetic acid in spruce and alder wood gave better results than bleaching with oxalic acid.

**Keywords:** spruce, alder, Oxalic Acid, Peracetic Acid

#### GİRİŞ

Odun mobilya ve doğrama endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan ve temelini teşkil eden ana hammaddedir. Odun kompozit malzemeler mobilya ve kabin tipi mobilya üretiminde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, masif odun konstrüksiyon ve doğrama endüstrilerinde hala ana hammadde olma özelliğini sürdürmektedir. Masif odun metal ve plastik malzemelerle karşılaştırıldığında en önemli özelliği işlenebilmesi ve vernik veya boyanabilmesidir. Bunun yanında heterojen yapıya sahip olması işlenme ve boyama işlemlerinde karşılaşılan en önemli sorundur. Tüm üretimlerde odun kullanılmadan önce vernikleme veya boyanma aşamaları öncesi tüm kusurlarından arındırılmalıdır. Bunun için odunda boyanabilme veya verniklenebilme parametrelerinin bilinmesi kullanım açısından önemli olmaktadır (Anonim, 1987; Davis, 1962).

Günümüzde üst yüzey işlemleri için, çok sayıda yüzey işlem malzemesi kullanılması yanında, uygulamada da oldukça fazla yöntem geliştirilmiştir. Mobilya endüstrisinde kullanılan çeşitli ağaç türleri de göz önüne alınırsa, üst yüzey işlemlerinin ne kadar karmaşık ve güç olduğu kolayca anlaşılabilir.

Yüzey işlemi uygulamasının temelde üç amacı vardır; koruma, estetiklik ve hijyeniklik. Bu nedenle odunun yüzeylerin verniklenmesi son ürün eldesinde odunun kullanıldığı tüm endüstrilerde önemli bir parametredir.

Yüzey işlemi yapılmış odunun kalitesi üzerine çeşitli etmenlerin etkileri olmaktadır. Bunlar kullanılan ahşap materyalin özellikleri, uygulanan vernik veya boyanın özellikleri ve ahşap malzeme ile vernik arasındaki etkileşim özellikleridir (Kollmann and Cote, 1964).

Odunun yüzey işlemleri olarak birçok vernik çeşitleri kullanılmaktadır. Bunlar genelde fiziksel kuruyan, kimyasal sertleşen ve hem kimyasal hem de fiziksel sertleşen tipler olabilmektedir. Ayrıca bunlar tek veya çift karışımli da olabilmektedir. Sonuçta her vernik tipinin uygulanması sonrası verniğin özelliklerindeki farklılık, odunla etkileşimindeki farklılık nedeniyle sahip olduğu son özellikler farklı olabilmektedir (Kurtoğlu, 1997) ve (Jaic and et all, 1996).

Bu çalışmada çeşitli ağartıcıların renk değişimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

### Deney Materyali

Çalışmada deney materyali olarak 2 ağaç türü ve 1 vernik çeşidi kullanılmıştır.

### Ağaç Malzeme

Bu çalışmada ülkemizde ticari önemi olan, yapraklı ağaç türlerinden Sakallı Kızılağaç (*Alnus Glitunosa* Subsp. *Barbata* (C.A. Mey.) Yalt.) ile iğne yapraklı ağaç türlerinden Doğu Ladini (*Picea Orientalis* L.(Link.)) odunları kullanılmıştır.

Bu amaçla deneylere tabi tutulacak ağaç türlerinin doğal yayılış gösterdiği Doğu Karadeniz Bölgesi seçilmiştir. Bu bölgede türlere ait optimal büyümenin olduğu Trabzon, Gümüşhane ve Artvin yöreleri örnek alanlar olarak belirlenmiştir. Örnek alanlarda ağaç türlerinin homojen meşcerelerden olmasına özen gösterilmiş ve basit rastlantı örnekleme yöntemine göre örnek ağaçlar seçilmiştir. Ağaçların seçilmesinde; yaş, bakı, çap ve yükselti vb. yetiştirme ortamı özellikleri göz önünde tutulmuştur. Yararlanılan ağaçların yetiştiği ortamı en iyi temsil edebilecek, kusursuz gövde yapısına sahip, düzgün ve sağlam ağaçlardan olmasına özen gösterilmiştir. Çalışmada yararlanılan örnek ağaçların alındığı yerler ve ağaç türlerine ait genel özellikler TS 4176 esaslarına göre belirlenmiştir.

### Vernik Türü

Araştırmada; mobilya ve doğrama endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan selülozik esaslı olmak üzere tek vernik çeşidi seçilmiştir.

### Ağartma maddeleri

Bu çalışmada 5 farklı ağartma maddesi kullanılmış ve bunlar aşağıdaki Tablo 3’de ki gibi kodlanmıştır.

Tablo 1. Kullanılan ağartma maddeleri

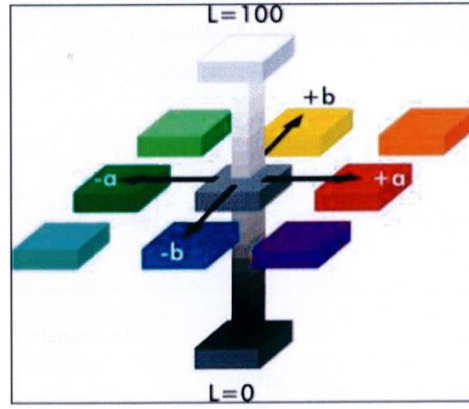
Kontrol grubu	1
Sodyum hidroksit- hidrojen peroksit	2
Oksalik asit	3
Perasetik asit	4
1/3 seyreltilmiş perasetik asit	5
1/6 seyreltilmiş perasetik asit	6

### Deney Yöntemi

#### Optik Özelliklerin Belirlenmesi

Renk ölçümleri ISO/CD 5631 standardına uygun olarak yapılmıştır. Renk değerlendirmeleri CIE (Commission International de l’Eclairage) tarafından 1971 yılında kağıt endüstri için önerilen sistemle L\*, a\* ve b\* CIELAB koordinatlarının hesaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

L\*, a\* ve b\* renk modeli dikey sarı-mavi ve yeşil-kırmızı eksenlerine dayanan dörtgenel koordinatlar kullanılır. L\*, a\* ve b\* renk uzayının iyi dengelenmiş yapısı, bir rengin aynı zamanda hem yeşil hem kırmızı veya hem mavi hem de sarı olamayacağı teorisi üzerine kurulmuştur. Bunun sonucunda kırmızı/yeşil veya sarı/mavi sıfatlarını tarif etmek için basit değerler kullanılabilir. CIE L\*, a\* ve b\* da bir rengi gösterirken, L\* beyazlık, a\* kırmızı/yeşil değerini ve b\* sarı/mavi değerlerini gösterir.



Şekil 1. CIE L\*a\*b\* renk düzlemi (Özcan, 2008)

L\* a\* b\* sistemine göre,iki renk arasındaki renk farkı veya uzaklık;

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

formüllerine göre hesaplanır. Formülün açılımı;

Kontrol hamurunun renk değişimi =L1 ,a1,b1

Oksijenle ağartma sonrası elde edilen hamurun renk değeri =L2,a2,b2

Renk farkı ( $\Delta E$ )=(L1-L2)<sup>2</sup> + (a1-a2)<sup>2</sup> +(b1-b2)<sup>2</sup>'dir.

## BULGULAR

### Ladin odununda ağartma işlemleri sonucu renk değişimleri

Tablo 2. Ağartma işlemleri sonucu ladin odununda renk değişim ( $\Delta E$ ) değerleri

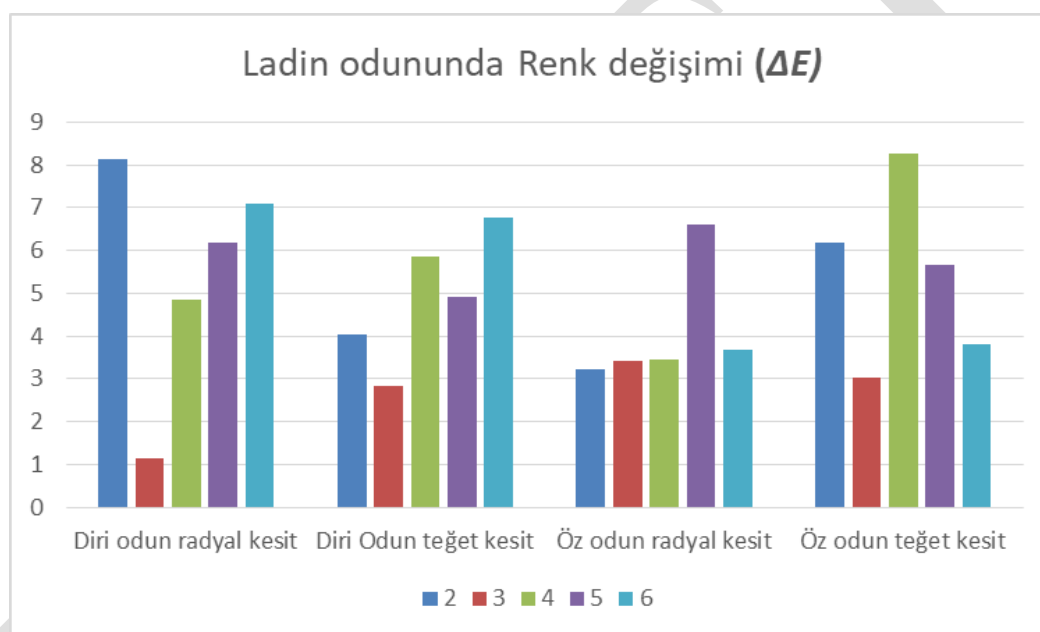
	Diri Odun		Öz Odun		
	Radyal Kesit	Teğet Kesit	Radyal Kesit	Teğet Kesit	
2	8.12	4.03	3.22	6.19	<b>5.39</b>
3	1.14	2.82	3.41	3.03	<b>2.60</b>
4	4.84	5.86	3.45	8.26	<b>5.60</b>
5	6.18	4.92	6.61	5.67	<b>5.84</b>
6	7.08	6.77	3.69	3.80	<b>5.33</b>
	<b>5.47</b>	<b>4.88</b>	<b>4.08</b>	<b>5.39</b>	

## Kızılağaç Odununda Ağartma İşlemleri Sonucu Renk Değişimi

Tablo 3. Ağartma işlemleri sonucu ladin odununda renk değişim ( $\Delta E$ ) değerleri

	Diri odun	Diri Odun	Öz odun	Öz odun	
	Radyal kesit	Teğet kesit	Radyal kesit	Teğet kesit	
2	14,92	14,92	15,23	14,59	<b>14,91</b>
3	1,83	1,83	3,89	2,46	<b>2,50</b>
4	4,52	4,52	9,04	3,78	<b>5,46</b>
5	7,56	7,56	9,18	5,36	<b>7,41</b>
6	8,30	8,30	9,43	9,51	<b>8,88</b>
	<b>7,42</b>	<b>7,42</b>	<b>9,36</b>	<b>7,14</b>	

## İRDELEME



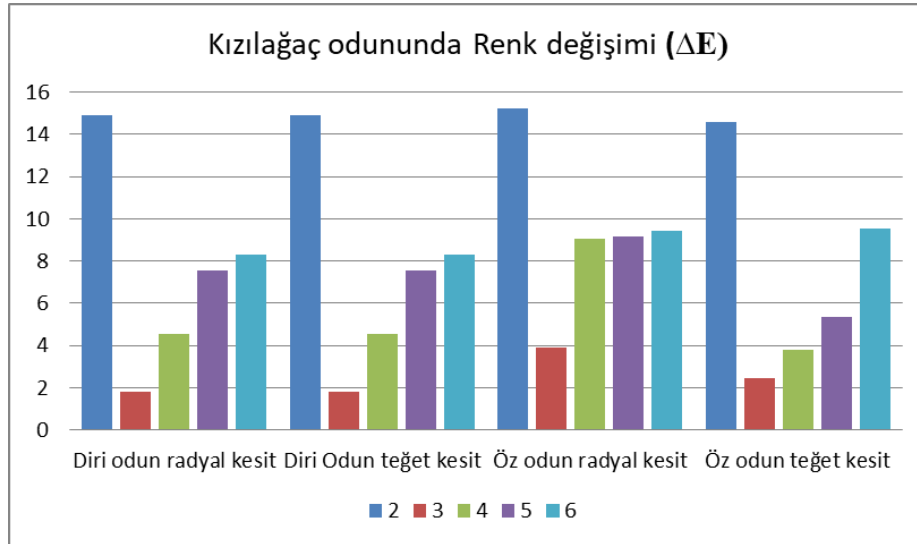
Şekil 2. Ladin odununda renk değişimi

Buna göre diri odun radyal kesitte en yüksek renk değişimi 2 nolu (8,12) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,5,4 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (1,14) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Diri odun teğet kesitte en yüksek renk değişimi 6 nolu (6,77) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 4,5,2 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (2,82) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Öz odun radyal kesitte en yüksek renk değişimi 5 nolu (6,61) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,4,3 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 2 nolu (3,22) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Öz odun teğet kesitte en yüksek renk değişimi 4 nolu (8,26) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 2,5,6 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (3,03) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.



Şekil 3. Kızılağaç odununda renk değişimi

Buna göre diri odun radyal kesitte en yüksek renk değişimi 2 nolu (14,92) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,5,4 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (1,83) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Diri odun teğet kesitte en yüksek renk değişimi 2 nolu (3,17) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,5,4 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük 3 nolu (1,83) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Öz odun radyal kesitte en yüksek renk değişimi 2 nolu (15,23) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,5,4 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (3,89) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

Öz odun teğet kesitte en yüksek renk değişimi 2 nolu (14,59) ağartma işlemi sonucu elde edilirken, bunu sırasıyla 6,5,4 nolu ağartma işlemi izlerken en düşük ise 3 nolu (2,46) ağartma işlemi sonucu elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

Anonym., 1987, *Furniture and Joinery for Developing Countries*, UNIDO, Unido Publication No.: E. 88.III, Vienna.

ASTM D 4138, Test Method for Measurements of Dry Film Thickness of Protective Coatings. ASTM:Philadelphia, 1971.

Davis, E.M:1962, *Machining and Related Characteristics of United States Hardwoods*, Technical Bulletin No: 1267, US Department of Agriculture-Forest Service, Washington, DC, 1962.

Jaic, M.; Zivanovic, R.; Stevanovic-Janezic T. ; Dekanski, A.: 1996, Comparison of surface properties of beech and oakwood as determined by ESCA Method, *Holz Roh-und Werkstoff*, 54, pp. 37-41

Kollmann, F.F.P.; Cote, W.A.:1984, *Principles of Wood Science and Technology vol. I*, Springer, Berlin 162 pp.

Kurtoğlu, A., Ağaç Malzeme Yüzey İşlemleri, İ.Ü Orman Fakültesi, 2000.

## The mineral composition of the roots of *Barbarea vulgaris* R.Br.

Ruzanna Aitkazina<sup>1\*</sup>, Sluken Rakhmadieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eurasian National University named after L.N.Gumilyov, Department of Chemistry, Nur-Sultan, Kazakhstan.

\*Corresponding author e-mail: ruzanna0598@gmail.com

### Abstract

The purpose of the work is to determine the mineral composition of *Barbarea vulgaris* R.Br. Brassicaceae Burnett family by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with mass spectrometry from *Leeman Lab Profile Plus*. As a result of the research, it was revealed that the roots of the plant *B. vulgaris* R.Br. rich in macro - and microelements (41 elements), 11 of which are vital. Roots are represented by the highest content of such elements as - P, Al, Fe, Sr, Ti, Zn and Mn. Analysis of the content of heavy metals showed that the content of the elements Pb, As, V, Cd, Co, Cu corresponds to the MPC, with the exception of zinc, the concentration of which exceeds twice. Also, an analysis of the good quality of raw materials was carried out. According to these calculations, the rate of extractability of raw materials is 28.183%, the total ash was 6.4398%, the ash is insoluble in 10% HCl is 2.4633%, and the value of sulfate ash is 4.4534%.

### INTRODUCTION

The object of the study *Barbaréa vulgáris* R. Br belongs to the genus *Barbaréa* WT Aiton, to the family Brassicáceae Burnett, to the order *Cruciferae* Juss., to the class Magnoliophyta Cronq., Takht. & W.Zimm., to the department Angiospermae Lindl. The plant has the names of bitter cress, herbal barbara, rocket cress, yellow rocket cress, winter rocket and a rocket with winding. The *B. vulgaris* litters the crops of perennial grasses and winter grain crops, kitchen gardens, orchards, less often the crops of spring grain crops and tilled crops; especially grows plentifully on poorly processed steam fields and on clay soils.

Since ancient times, the roots of the plant are known for their diuretic, wound-healing and diuretic properties are used in food as a replacement for arugula. The plant reaches a height of about 30-60 cm, a maximum of 1 m, and there are basal sockets of shiny, dark green petioles and lyrically pointed, i.e. with large terminal lobes and smaller lower lobes of leaves, taproot, branched (Figure 1).



**Figure 1.** Herbarium of the roots of the plant *B. vulgaris* R.Br.

The plant *B. vulgaris* is originally from Eurasia and North Africa, Algeria, Tunisia, was later naturalized in many parts of North America and New Zealand as a weed. The range of distribution extends from the tropical parts of Asia, Afghanistan, Japan, China, to the south-west of Europe, Estonia, the Netherlands, Greece, and France. In the CIS, the distribution area extends to Kazakhstan, Kyrgyzstan, Georgia, Russia, Moldova, Turkmenistan, Tajikistan, Ukraine and Belarus. In Kazakhstan, it grows occasionally on the slopes of mountains or as a weed in meadows and fields. It is found in the vicinity of the Ishim River, in the Aktobe region, in Zaisan and Tarbagatai, at the lakes of Balkhash and Aralsk, at the foot of the Dzungarian Alatau and Trans-Ili Alatau, in the Chui Valley and in the west of the Tien Shan.

Previously, during the phytochemical study of the aerial parts of the plant, carbohydrates, flavonoids, tannins, organic acids were identified and the composition of volatile substances was determined. Analysis of the literature data showed that the composition of the roots of the plant *B. vulgaris* has not been studied for chemical components, which is of scientific and practical interest.

This report provides information on the study of the mineral composition of plant roots, since most micro and macro elements have a significant impact on the life of living organisms by binding to organic substances synthesized in cells and often ensuring their chemical and biological activity.

## MATERIALS AND METHODS

Underground parts of the plant were collected in the Akmola region near the city of Nur-Sultan in 2017. To determine whether the raw materials of the *B. vulgaris* plant were high, such important parameters were studied as: humidity; extractives; ash content: total ash, ashes, insoluble in 10% HCl, sulphate ash; solubility according to the methods adopted by the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. The qualitative composition and quantitative content of mineral elements were distinguished using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) from *Leeman Lab Profile Plus*.

The determination was carried out using calibration curves constructed on the basis of artificial mixtures with a given concentration of trace elements. Artificial mixtures were prepared from spectrally sieve salts of sodium chloride, calcium carbonate in the ratios characteristic of the biological objects studied, taking into account the concentration factors of the oxides of the elements being determined.

Method of execution: a sample of the analyzed sample weighing 1.0-2.0 g is placed in a heat-resistant flask with a capacity of 50 cm<sup>3</sup>, 10 cm<sup>3</sup> of nitric acid with a molar concentration of 5.0 mol / dm<sup>3</sup> are poured in a cylinder with a capacity of 10 cm<sup>3</sup> (raw materials ratio: 1: 5) . Rotate the flask gently moisten and mix the sample of the analyzed raw materials. The flask is closed, placed on an electric plate and kept under gentle heating for 3 hours. After each hour of heating, the sample is gently mixed with rotational movements. After three hours, the sample is removed from the plate and cooled to room temperature. After cooling, the sample is filtered in a volumetric flask with a capacity of 50 cm<sup>3</sup>, washing the filter with bidistilled or deionized water. The obtained filtrate is brought to the mark with a filter with bidistilled or deionized water and mixed well.

A solution of the prepared sample using a peristaltic pump, is fed into the spray chamber of an atomic emission spectrometer, and in a stream of argon, the resulting aerosol enters the burner, in which the atoms are ionized. Analytical signals for the emission of excited atoms are measured and processed using standard spectrometer software.

The calculation of the mass concentration of the elements to be determined is carried out using the software of the devices on the basis of the calibration characteristics of the metal solutions established by the standards.

## RESULTS AND DISCUSSION

To determine the quality of plant materials of the roots of *B. vulgaris*, indicators of good quality were obtained. The data are shown in Table 1.

**Table 1.** Indicators of good quality of raw materials of roots in terms of dry raw materials

Plant organ	Moisture, %	Total ash, %	Ash insoluble in 10% HCl, %	Sulphated ash, %	Extractives, %
roots	5,3806	6,4398	2,4633	4,4534	28,183

As a result of analyzing the roots of a plant, it was established that the plant is prone to accumulating a total of 41 elements: macronutrients such as phosphorus (1631 mg / kg), aluminum (280 mg / kg), iron (187 mg / kg), strontium (40.2 mg / kg), titanium (37 mg / kg), zinc (20 mg / kg), manganese (14.1 mg / kg). The limits of concentrations of elements in raw materials are not more than 0.1 mg / kg, such as silver, arsenic, beryllium, bismuth, gallium, germanium, hafnium, indium, niobium, lead, selenium, antimony, strontium, tellurium, thorium, thallium, uranium, vanadium, tungsten, yttrium and ytterbium. The data in Table 2 suggests that the roots of the plant *B. vulgaris* R.Br. rich in macro - and microelements, 11 of which are vital: phosphorus, iron, cobalt, manganese, copper, molybdenum, selenium, chromium, zinc, boron and vanadium. Also, an analysis of the good quality of raw materials was carried out. According to these calculations, the rate of extractability of raw materials is 28.183%, the total ash was 6.4398%, the ash is insoluble in 10% HCl is 2.4633%, and the value of sulfate ash is 4.4534%.

**Table 2.** Content of mineral elements in the roots of *B. vulgaris*, mg/kg

№	Element		Roots mg/kg	№	Element		Roots mg/kg
1	Silver	Ag	<0.1	22	Niobium	Nb	<0.1
2	Aluminum	Al	280	23	Nickel	Ni	1.6
3	Arsenic	As	<0.1	24	Phosphorus	P	1631
4	Boron	B	4	25	Lead	Pb	<0.1
5	Barium	Ba	7	26	Selenium	Se	<0.1
6	Beryllium	Be	<0.05	27	Antimony	Sb	<0.1
7	Bismuth	Bi	<0.1	28	Scandium	Sc	<0.1
8	Cadmium	Cd	0.13	29	Tin	Sn	0.2
9	Cerium	Ce	0.66	30	Strontium	Sr	40.2
10	Cobalt	Co	0.2	31	Tellurium	Te	<0.1
11	Chromium	Cr	11.3	32	Thorium	Th	<0.05
12	Copper	Cu	3.3	33	Titanium	Ti	37
13	Iron	Fe	187	34	Thallium	Tl	<0.1
14	Gallium	Ga	0.1	35	Uranus	U	<0.05
15	Germanium	Ge	<0.1	36	Vanadium	V	<0.1
16	Hafnium	Hf	<0.1	37	Tungsten	W	0.1
17	Indium	In	<0.1	38	Yttrium	Y	0.1
18	Lanthanum	La	0.27	39	Ytterbium	Yb	<0.1
19	Lithium	Li	0.3	40	Zinc	Zn	20
20	Manganese	Mn	14.1	41	Zirconium	Zr	0.2
21	Molybdenum	Mo	0.2				

Analysis of the content of heavy metals showed that the content of the elements Pb, As, V, Cd, Co, Cu corresponds to the MPC, with the exception of zinc, the concentration of which exceeds 2 times. Data on the content of heavy elements are shown in Table 3.

**Table 3.** Comparison of the maximum permissible concentration (MPC) in the roots of the plant

№	Element	Content in the roots, mg/kg	MPC
1	Pb	<0.1	10
2	As	<0.1	2
3	V	<0.1	15
4	Cd	0.13	8
5	Co	0.2	23
6	Cu	3.3	35
7	Zn	20	10



## CONCLUSION

Thus, indicators of the good quality of raw materials, the mineral composition of the roots of *B. vulgaris* growing on the territory of the Republic of Kazakhstan were determined for the first time. The presence of 41 elements is established, 11 of which are vital elements. The heavy metal content corresponds to the MPC with the exception of zinc.

## BIBLIOGRAPHY

- Aiton W.T. 2017. Taxon: *Barbarea vulgaris*. U.S. National Plant Germplasm System, 109 c.
- HDPE F 16.1:2.3:3.11 -98. Methods for measuring metal content in solid objects using inductively coupled plasma spectrometry. 1998. Moscow: pp. 13-16.
- Marenich M, Rakhmadiyeva S, Aibuldinov Y 2011. The new source of biologically active substances – *Barbarea vulgaris* W. T. Aiton. *Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research*, 12(77): 1428.
- Pavlov NV 1961. Flora of Kazakhstan. Alma-Ata. Academy of Sciences of the Kazakh SSR. genus *Barbarea*, pp. 209-210.
- Skalny AV, Rudakov IA 2004 Bioelements in medicine. Onyx 21st Century, Mir, pp. 18-23. 272 s. ISBN 5-329-00930-8.
- State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan 2008. Almaty: “Zhibek Zholy”. C. 121.

## Ön İşlemlerin Vernikli Odun Plastik Kompozitlerinin Aşınmada Meydana Gelen Ağırlık Kayıpları Üzerine Etkisi

Turgay Özdemir<sup>1</sup>, Engin Derya Gezer<sup>2</sup>, Fatih Mengeleoğlu<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendiliği Bölümü, 61080, TRABZON, TÜRKİYE, turgay@ktu.edu.tr

<sup>2</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendiliği Bölümü, 61080, TRABZON, TÜRKİYE, engin\_gezer@yahoo.com

<sup>3</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendiliği Bölümü, 61080, TRABZON, TÜRKİYE, fmengelo@ksu.edu.tr

### Özet

Odun plastik kompozitlerin (OPK) kullanım alanları ve kullanımı her geçen gün artmaktadır. Plastiklerin boyanabilme kabiliyetlerinin artırılması için örnek yüzeylerinde farklı ön işlemler uygulanmış ve bu özellikleri belirli oranda iyileştirilebilmiştir. Bu çalışmanın amacı, farklı boya türleri ve ön işlemler kullanılarak OPK'nın aşınmada meydana gelen ağırlık kayıpları değerlerinin belirlenmesidir. Bu amaçla 2 farklı boya (sentetik ve su bazlı) ve 4 farklı ön işlem (zımparalama, asit muamelesi, UV, mikrodalga) kullanılmıştır. OPK malzemelerin yüzeylerine farklı ön işlemler ve boyama yapılarak test örnekleri hazırlanmıştır. Boyanmış örnekler üzerinde aşınma indeksi ölçümleri yapılmıştır. Sonuç olarak, ön işlem uygulamalarının aşınma indeksi değerini etkilediği, vernik türlerinde ise su bazlı verniklerin daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Odun plastik kompozit, boyanma özellikleri, aşınmada ağırlık kayıpları

### Effect of Pre-Treatments on Weight loss for Abrasion Resistance Of Varnished Wood Plastic Composites (WPC)

#### Abstract

The utilization and usage areas of the wood plastic composites (WPC) have increased over the years. To be able to increase the coating ability of plastics, different pre-treatment had been used and some improvements were achieved. It is the purpose of this study to determine the weight loss for abrasion resistance of the WPCs using various coating and pre-treatments. For this purpose, it was used 2 different coating types (acrylic, water based) and 4 different pretreatments (sanding, acid treatment, UV, microwave). WPCs were manufactured and samples after various pretreatment and coating were prepared. The weight loss for abrasion resistance was determined after coating. The results showed that pre-treatments used in this project affected the weight loss for abrasion resistance.

**Keywords:** Wood plastic composites, coating properties, abrasion resistance

#### GİRİŞ

Plastikler hayatımızın her alanında çok miktarda kullanılmaktadır. Son yüzyılda polimer kimyasındaki gelişmeler, gelişen ve değişen toplumun yaşam tarzı tüketim alışkanlıkları gibi nedenlere bağlı olarak, polimerleri günlük hayatımızda ve endüstrinin hemen hemen her dalında kullanılan malzemeler haline getirmiştir. Plastikler çöpe atıldığında çürümeden, paslanmadan, çözünmeden ve biyolojik olarak bozulmadan doğada uzun zaman kalmaktadır. Bazı plastikler, doğada 700 yıl bozulmadan kalabilmektedir. Suyun ve toprağın kirlenmesine sebep olmaktadır. Sulardaki canlılara zarar vermekte ve hatta onların ölümlerine neden olmaktadır. Plastikler, normal sıcaklıkta katı halde bulunan, basınç ve sıcaklık kullanılarak farklı yöntemlerle şekillendirilebilen ya da kalıplanabilen maddelerdir. Polimerizasyon, polimer zincirini oluşturan benzer moleküllerin bağlanmasıdır.

Alev substrata yaklaşık bir inç uzakta düzenlenen bir brülör tarafından üretilen yanma ile desteklenen bir subsonik dalgadır (DiGiacomo 1998). Bu uygulamada kritik parametreler gaz-hava oranı, eşdeğerlilik oranı ve alev ve poliolefin arasındaki temas süresidir. Alev plazma işlemi malzemenin yüzeyindeki kontaminasyonu temizler ve fonksiyonel grupların ve zincirler arasındaki çapraz bağların oluşmasıyla bir yüzey aktivasyonu gerçekleştirir. Bir alev zonu tipik sıcaklığı 1850 °C civarındadır (DiGiacomo 1998). Bu yüksek sıcaklık, alev plazma-uygulaması olarak da bilinen yöntem, iyonların, atomların ve moleküllerin aktifleştirilmiş karışım formuna (yapısına) dönüşmesine oksijen neden olur. Aktif edilmiş türler hidrokarbon hidrojen atomlarıyla yer

değiştirerek yüzeye nüfuz eder. Aktif edilmiş türlerin hidrojen atomlarıyla yer değiştirmesi serbest radikallerin ve fonksiyonel oksijen gruplarının oluşmasına neden olur.

Benzer şekilde, ekstrüzyon işlemi de dış-orta tabaka morfolojisi ve rutubet alma özelliklerinde farklılıklara yol açar. Ekstrüzyon ile üretilen odun plastik kompozitinin yüzeyi orta tabakaya oranla daha yüksek yoğunluğa ve daha fazla lif bağlantılarına sahip olduğunu gösterir (BarbosaandKenny, 2000). Ayrıca, planyalanmış odun kompozitleri gerek ekstrüzyon işlemiyle gerekse enjeksiyonla üretilen odun plastik kompozitlerine oranla çok daha fazla odun içermektedir. Bu nedenle, genel olarak, odun plastik kompozitlerinin doğası işlem koşullarına, örnekleme derinliğine ve numune hazırlama yöntemine bağlı olduğu görülmektedir.

Bu amaçla, çalışmada ön işlemler sonrası odun plastik kompozitlerinin aşınmad ağırlık kayıpları değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

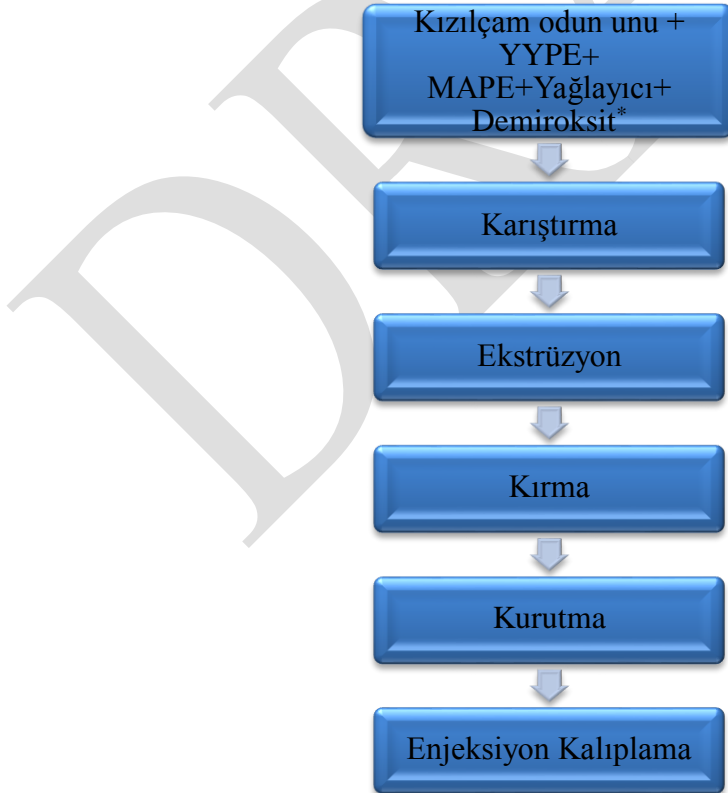
Kahramanmaraş sanayisinde kızılçam kerestesi işleyen kereste fabrikalarından şerit testere atıkları alınmıştır. Temin edilen bu kızılçam atıkları ilk önce öğütme makinesi yardımıyla öğütülmüş, daha sonra sarsak elek yardımıyla boyutlandırılmış ve Şekil 3 (b) de gösterilen 40 mesh (0,400 mm) elekten geçip 60 mesh (0,250 mm) eleğin üzerinde kalan kızılçam unları kullanılmıştır. Lignoselülozik dolgu maddesi olan kızılçam odun unları üretim öncesinde 24 saat süreyle 103±2 0C de kurutma işlemine tabi tutularak hazır hale getirilmiştir. Termoplastik kompozit üretiminde kullanılacak malzemelerin miktarları Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 1. Termoplastik kompozit üretimi için deneme dizaynı.

Örnek Kodu	Polimer Miktarı (%)	Lignoselülozik Dolgu Maddesi Miktarı (%)	MAPE (%)	Çinko Sterat (%)	Waks (%)
TE	44	50	2	2	2

## YYPE esaslı kompozitlerin üretilmesi

YYPE esaslı kompozitlerin üretimi Şekil 1' de verilen şemaya göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Kompozit üretimi iş akışı

## Örnekler Üzerinde Ön İşlemlerin Yapılması

Boyama işlemleri öncesi OPK levhaları üzerinde boyanabilme performanslarına etkililerini belirlemek amacıyla bazı ön işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu ön işlemler, mekanik aşındırma, kimyasal aşındırma (seyreltilmiş asitle muamele), ultraviyole (UV) ışık ve mikrodalga uygulamalarıdır.

### Mekanik aşındırma

Mekanik aşındırma olarak zımparalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler ; 60 ve 80 no' lu zımparalarla iki farklı zımpara işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu örnekler Z60 (60 nlu zımpara ile zımparalanmış) ve Z80 (80 nolu zımpara ile zımparalanmış) olarak kodlanmışlardır.

### Kimyasal aşındırma

Kimyasal aşındırma olarak % 5 ve % 10 olarak iki farklı konsantrasyonlardaperasetik asit ile uygulama yapılmıştır. Bu örnekler PA5(% 5 konsantrasyondapersatit asit uygulanmış örnekler) ve PA10 (%10) konsantrasyonda perasetik asit uygulanmış örnekler) olarak kodlanmışlardır.

### Ultraviyole (UV) Işık

Kompozit örnekler 10 ve 20 dk.lık olmak üzere iki farklı UV uygulaması gerçekleştirilmiştir.

### Mikrodalga

Örnekler 15 ve 30 snlik iki farklı sürelerde mikrodalga uygulaması yapılmıştır. Mikrodalga uygulaması proje kapsamında satın alınan mikrodalga fırınında gerçekleştirilmiştir.

### Ön İşlem Uygulanmış ve Uygulanmamış OPK Levha Örneklerinin Boyanması

OPK levhalarının boyanabilme performanslarının belirlenmesi amacıyla ön işlem görmüş ve görmemiş yüzeyler üzerinde farklı boyalar kullanılarak boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, literatürde ve endüstriyel olarak en çok kullanılan 4 farklı boya uygulaması seçilmiştir. Bu boyalar poliüretan (çift bileşenli), akrilik (çift bileşenli), sentetik (tek bileşenli) ve su bazlı (tek bileşenli) boyalar olup, bunların uygulamasında üretici firma karışım önerileri esas alınmıştır.

Boya uygulamaları püskürtme metoduna göre yapılmış, püskürtme uç açıklığı 1.8 mm olan normal basınçlı alttan depolu vernik tabancası kullanılarak, m2 ye 125-150 gr boya gelecek şekilde iki kat dolgu ve tek kat son kat uygulaması olarak gerçekleştirilmiştir. Boya uygulaması sonrası tüm örnekler tam kurumaları sağlandıktan sonra klima odasında bekletilmişlerdir.

### Aşınmada Meydana Gelen Ağırlık Kayıpları

Aşınmada meydana gelen ağırlık kayıplarının belirlenmesi için her bir vernik çeşidine ait 100x100x7 mm boyutlarındaki 5' er örnekten yararlanılmış ve ASTM D 4060-10 esaslarına uygun olarak yapılmıştır.

Buna göre; örnekler üzerinde aşınma indeksi (1), ağırlık kaybı (2) ve her bir devirdeki aşınma miktarı (3) belirlenmiştir.

Bu amaçla örneklerin aşınma direnci öncesi ve aşınma sonrası ağırlıkları  $\pm 0,01$  g duyarlılıkta belirlenmiştir.

Aşınma indeksi I, aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır,

$$I = \frac{(A - B) 1000}{C} \quad (1)$$

Burada:

- A = Aşınma testi öncesi örneğin ağırlığı, g,  
B = Aşınma testinden sonra örneğin ağırlığı, g,  
C = Aşınmada kaydedilen devir sayısı.

Ağırlık kaybı (L), aşağıdaki formülü ile hesaplanmıştır:

$$L = A - B \quad (2)$$

Burada;

- A = Aşınmadan önceki örneğin ağırlığı, g, ve  
B = Aşınmadan sonraki örneğin ağırlığı, g.

### 1.5. Örneklerin Kodlanması

Elde edilen örneklerin aşağıdaki gibi kodlanmışlardır.

Örnek grupları ve kodları	Kodların açıklaması
TE-Z60	60 nolu zımpara uygulanmış örnekler
TE-Z80	80 nolu zımpara uygulanmış örnekler
TE-UV10	10 dakika UV uygulanmış örnekler
TE-UV20	20 dakika UV uygulanmış örnekler
TE-MD15	15 dakika mikrodalga uygulanmış örnekler
TE-MD30	15 dakika mikrodalga uygulanmış örnekler

TE-PA5 %5 lik perasetikasit uygulanmış örnekler  
TE-PA10 %5 lik perasetikasit uygulanmış örnekler

## BULGULAR

### Aşınma Direnci

Yapılan aşınma direnci sonuçları ortalamaları vernik türlerine göre aşağıdaki Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 2 . Vernik türlerine göre pigmentsiz (TE) örneklerde aşınma indeksi sonuçları

TE	sentetik	Su bazlı
kontrol	0,6667	0,7333
MD15	0,4333	0,7000
MD30	0,4667	0,7667
UV10	0,4667	0,7000
UV20	0,5000	0,5333
PA5	0,6333	0,6333
PA10	0,6333	0,7000
Z60	0,5000	0,7000
Z80	0,6667	0,6333

### 2.1.1. Aşınmada Ağırlık Kayıpları İçin İstatistik Değerlendirme sonuçları

Aşınmada ağırlık kayıpları için değerlerinde elde edilen sonuçlar için varyans analizi yapılmış ve varyans analizi sonuçları Tablo 4' da verilmiştir.

Tablo 3. Aşınmada ağırlık kayıpları için varyans analizi sonuçları

		Kareler toplamı	df	Ortalama kareler	F	Önem düzeyi
SENTETİK TE	Gruplar arası	,221	8	,028	1,680	,171
	Gruplar içi	,296	18	,016		
	Toplam	,516	26			
SU BAZLI TE	Gruplar arası	,113	8	,014	,998	,470
	Gruplar içi	,256	18	,014		
	Toplam	,369	26			

Varyans analizi sonuçlarına bağlı olarak yapılan Duncan testi sonuçları aşağıda verilmiştir.

Tablo 4. Sentetik vernik için pigmentsiz (TE) örneklerde aşınma indeksi değeri Duncan testi sonuçları

GRUPLAR	N	1
MD15	3	,4333
MD30	3	,4667
UV 10	3	,4667
UV 20	3	,5000
Z60	3	,5000
PA5	3	,6333
PA5	3	,6333
Z80	3	,6667
Kontrol	3	,6667
Önem düzeyi		,067

Elde edilen Duncan testi sonuçlarına göre aşınma indeks değerlerinin tek farklı grupta toplandığı, en yüksek indeks değerinin kontrol grubu örneklerde en düşük ağırlık kaybının ise 15 sn mikrodalga uygulaması yapılmış örneklerde olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak ön işlem uygulamasının aşınma indeksi değerini etkilemediği görülmektedir.

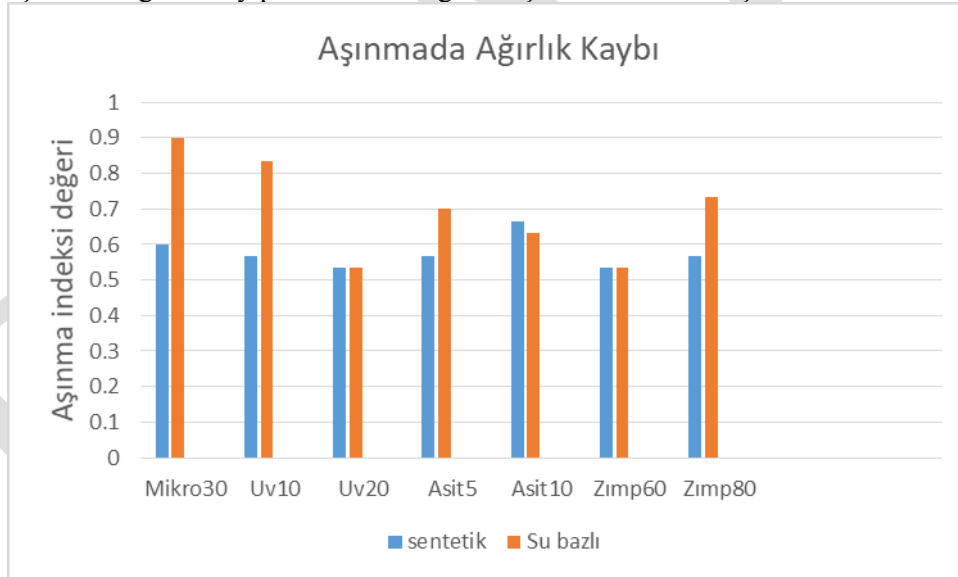
Tablo 5. Su bazlı vernik için pigmentsiz (TE) örneklerde aşınma indeksi değeri Duncan testi sonuçları

GRUPLAR	N	1
UV 20	3	,5333
PA5	3	,6333
Z80	3	,6333
MD15	3	,7000
UV 10	3	,7000
PA5	3	,7000
Z60	3	,7000
Kontrol	3	,7333
MD30	3	,7667
Önem düzeyi		,051

Elde edilen Duncan testi sonuçlarına göre aşınma indeksi değerinin tek farklı grupta toplandığı, en yüksek indeks değerinin 30 sn lik mikrodalga uygulaması yapılmış örneklerde en düşük indeks değerinin ise 20 dakikalık UV uygulaması yapılmış örneklerde olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak ön işlem uygulamalarının aşınma indeksi değerini etkilemediği belirlenmiştir.

## İRDELEME

Örneklere ait aşınmada ağırlık kayıpları direnci değerleri Şekil 2' de verilmiştir.



Şekil 2. Pigmentsiz (TE) örneklerin aşınmada ağırlık kayıpları

Aşınma indeksi değerleri incelendiğinde pigmentsiz örneklerde (TE) ön işlemler sonunda indeks değerlerinin düştüğü görülmektedir. Buda ön işlemlerin aşınmada meydana gelen ağırlık kayıpları için olumlu bir gösterge olduğu görülmektedir. Ön işlemler pigmentsiz örneklerde aşınmada ağırlık kayıpları üzerine olumlu etki yaptığı söylenebilir.

Vernik türlerine göre incelendiğinde sentetik verniğin aşınma indeks değeri düşük çıkarken en yüksek ise su bazlı vernikte elde edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 214O683 proje tarafından sağlanan katkılarla yapılmış olup desteklerinden dolayı yazarlar olarak TÜBİTAK' a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- ASTM D 3359-09E2, Standard Guide for Evaluation of Coatings Applied to Plastics, American Standard of Testing of Materials, 2002.
- ASTM D 4060-10, Standard Test Method for Abrasion Resistance of Organic Coatings by the Taber Abraser, American Standard of Testing of Materials, 2010.
- Barbosa S. E., Kenny J. M.: Polymer Engineering Science, 40 (2000), 11
- Castell P., Wouters M., With G. de, Fischer H., Huijs F.: "Surface Modification of Poly (propylene) by Photoinitiators: Improvement of Adhesion and Wettability", Journal of Applied Polymer Science, 92 (2004), pp 2341-2350
- DiGiacomo J.: "Extrusion Coating Manual", TAPPI Press, Atlanta, Ga (1998)
- Novak I., Florian S.: "Influence of Ageing on Adhesive Properties of Polypropylene Modified by Discharge Plasma", Polymer International, 50 (2001), pp 49-52
- Ranby B., Yang W. T., Tretinnikov O.: "Surface Photografting of Polymer Fibers, Films and Sheets", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 151 (1999), pp 301-305
- Ryntz R. A.: "Adhesion to Plastics Molding and Paintability", Polymer Surfaces and Interfaces Series, Global Press, 1998
- Ryntz R. A.: "Coating Adhesion to Low Surface Free Energy Substrates", Progress in Organic Coatings, 25 (1994), pp 73-83

## Metilen mavisi adsorpsiyonu ile elde edilen biyokompozit malzemenin yara iyileşmesindeki rolü

Hakan Duran<sup>1\*</sup>, Muzaffer Başak Ulkay<sup>2\*</sup>, Fulya Üstün Alkan<sup>3</sup>, Selcan Karakuş<sup>1</sup>, Abit Aktaş<sup>2</sup>, Tuba Şişmanoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, İstanbul

<sup>2</sup> Veterinerlik Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bölümü, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa/İstanbul

<sup>3</sup> Veterinerlik Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa/İstanbul

\*Sorumlu yazar e-mail: tusase@istanbul.edu.tr; bulkay@istanbul.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, gam arabik (GUM) ile fonksiyonlaştırılmış içi boş silika kürecikler (HSS) sentezlendi. 0,02g biyokompozit (HSEPCGUM) üzerinde metilen mavisi (MB) adsorpsiyonu ile üçlü biyokompozit malzeme elde edildi (HSEPCGUM-MB). HSEPCGUM-MB için Langmuir adsorpsiyon izotermi 35°C sıcaklık için uygulandı. Adsorbanın tek tabakadaki maksimum adsorplama miktarı ( $X_{max}$ ) 125mg g<sup>-1</sup> bulundu. Toz halde elde edilen HSEPCGUM-MB'nin epitelizasyon ve fibroblast aktiviteyi düzenleyici etkisi in vivo çalışarak yapıldı. Epidermin hemen altında yer alan derinin dermis tabakasında HSEPCGUM-MB'nin oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metilen mavisi, Adsorpsiyon, Gam arabik, Fibroblast

### The role of wound healing of obtained biocomposite material by methylene blue adsorption

#### Abstract

A triple biocomposite material (HSEPCGUM-MB) was obtained by adsorption of methylene blue (MB) on the 0.02 g biocomposite (HSEPCGUM). The Langmuir adsorption isotherm for HSEPCGUM-MB was applied at 35°C temperature. The maximum adsorption amount ( $X_{max}$ ) of the adsorbent in a single layer was found as 125 mg g<sup>-1</sup>. The power the biocomposite (HSEPCGUM-MB) material was studied with in vivo for effects of epithelialization and fibroblast. It has been observed that HSEPCGUM-MB is very effective in the dermis layer of the skin just below the epidermis.

**Keywords:** Methylene Blue, Adsorption, Gum arabic, Fibroblasts

#### GİRİŞ

Günlük yaşamda insanlar çeşitli yara enfeksiyonlarına maruz kalmaktadır ve bu yüzden yaralar dünya çapında ciddi bir problem oluşturmaktadır (Lazarus ve ark., 1994). Genellikle yara enfeksiyonları birçok bakteri veya mantardan kaynaklanmaktadır. Gram-pozitif Staphylococcus aureus ve Gram-negatif Pseudomonas aeruginosa, yara enfeksiyonlarının çoğundan sorumlu olan en yaygın iki bakteridir. Yaraların yüzeyini kolayca kirletebilir ve alttaki dokuya erişebilir, böylece iyileşme sürecini erteleyebilmektedirler (Nurhasni ve ark., 2015). Yara iyileşme süreci dört aşamadan oluşmaktadır. Bunlar: hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme aşamalarıdır ve burada temel amaç minimal yara iyileşmesidir (Liang ve ark., 2007). Son zamanlarda nanoteknoloji ile yeni jenerasyon ilaçların geliştirilmesi ve yaraların enfeksiyonunu önleyen polimer nanopartiküllerin geliştirilmesi hızlanmıştır. Nanopartiküllerin yüksek yüzey alan/hacim oranı nedeniyle, kimyasal aktivitelerinde artış gözlemlenmektedir (Deng ve ark., 2011). Son zamanlarda içi boş silika kürecik nanopartiküller HSS (hollow silica spheres) yüksek kimyasal ve termal kararlılığa, düşük yoğunluğa, düşük toksisiteye ve iyi biyouyumluluğa sahip olmaları sayesinde çok sayıda araştırmacının önemli ölçüde ilgisini çekmektedir (Lou ve ark., 2008; Zhao ve ark., 2009). HSS'nin mühendislik, kimyasal kataliz, enerji depolama, fotonik ve biyomedikal gibi alanlarda farklı uygulamaları bulunduğu gibi biyouyumluk özelliği ve geniş yüzey alanları sayesinde, eczacılık ve biyokimya alanında da kullanılmaktadır. Buna ilaveten, kromatografide farklı uygulamalarda, enzimler veya proteinler için immobilizasyonda, ilaç taşıyıcı sistemlerde, boyalar veya mürekkeplerde, fotonik kristallerde de kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2009). Gam arabik, hem yüksek moleküler ağırlıklı arabinogalaktan-protein kompleksine (GA-GP-GA-glikoprotein) ve hem de yapıdaki küçük fraksiyonlara sahiptir. Gam zincirleri, bir protein zincirine serin ve hidrokisprolin grupları ile kovalent olarak bağlanmıştır (Dauqan ve ark., 2013). Gam arabik, şekerleme kaplama ve sır, ilaç



ve bitkisel ilaçlar gibi çeşitli uygulamalara sahiptir; bunun yanında gam krem ve losyonların formülasyonu için önemlidir. Gam arabik antibiyotik ilaçlarda da kullanılır ve karbopol hidrojenlerin mukodatif doğasının antioksidan yapısı nedeniyle yara iyileşme potansiyelini arttırmak için kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2013).

Bu çalışmada, gam arabik (GUM) ile fonksiyonlaştırılmış içi boş silika kürecikler (HSS) sentezlenmiştir ve metilen mavisini (MB) adsorbe ederek üçlü biyokompozit (HSEPCGUM-MB) yapı elde edilmiştir. İlk olarak HSS mekanokimya (Ball miling) yöntemiyle elde edilmiştir. İkinci adımda, HSS'nin epoksidasyon işlemi uygulanmıştır ve daha sonra gam arabik ile fonksiyonel hale getirilmiştir (HSEPCGUM). Üçüncü adımda adsorpsiyon yöntemiyle MB'nin HSEPCGUM üzerinde adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. HSEPCGUM-MB karakterizasyonu FTIR, SEM ile yapılmıştır. Toz halde elde edilen HSEPCGUM-MB'nin epitelizasyon ve fibroblast etkisi in vivo olarak yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Kullanılan kimyasallardan feniltrimetoksisilan (PTMS) %99 and epiklorhidrin Sigma Aldrich firmasından satın alındı. Nitrat asit (HNO<sub>3</sub>) %55-56, amonyum hidroksit (NH<sub>4</sub>OH) %35, saf etil alkol ve N,N-dimethylforamid (>%99) Merck firmasından temin edildi. Metilen mavisini Türkiye de bir tekstil firmasından temin edildi.

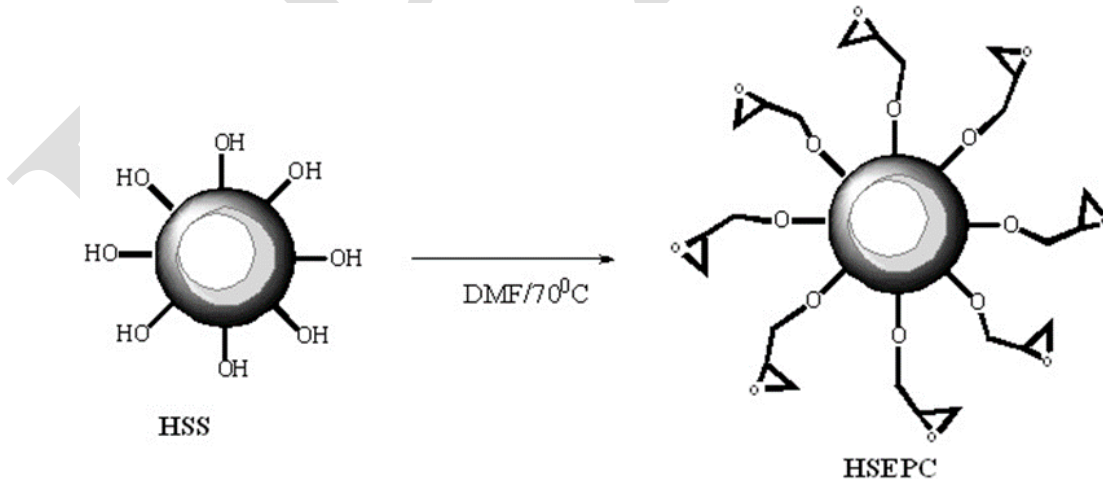
### 2.1. Kimyasal Sentezler

#### 2.1.1. İçi boş silika kürecikler (HSS) sentezi

Geliştirdiğimiz bu yeni yöntemde, HSS parçacıkları mekanokimya yöntemine dayanan bilyeli öğütme (ball miling) ile hazırlandı. Çelik toplu öğütme çelik hücreesine (çelik hücre hacmi 5ml) 1 ml feniltrimetoksisilan (PTMS) konuldu ve daha sonra yoğunlaşma için homojen çözeltiye 1 ml NH<sub>4</sub>OH çözeltisi ilave edildi. Bilyalı öğütme işlemi sürekli olarak 15 dakika boyunca 25 Hz'de devam ettirildi. Sonuç olarak, renksiz karışım işlemin sonunda değişti ve süt şeklinde elde edildi. Daha sonra süzgeç kağıdı ile süzüldü ve daha sonra birkaç kez su / etanol çözeltisi ile yıkandı. Ürün 80 ° C'de vakumlu bir fırında 2 saat kurutuldu ve HSS elde edildi.

#### 2.1.2. Epoksidasyon Süreci

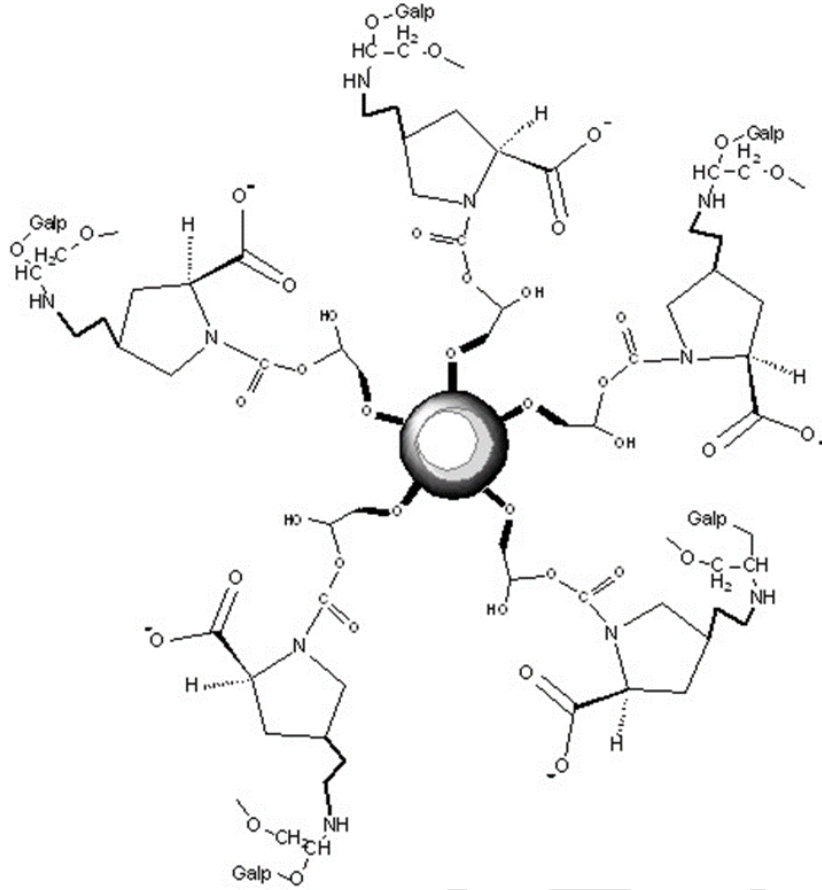
Epoksidasyon işlemi, HSS çözücü DMF içerisinde dağıtıldı sonra bu çözeltiye damla damla epiklorhidrin ilave edildi. Bu süreçte, HCl gazı çözeltiden serbest bırakıldı ve sıcaklık 1 saat boyunca 70 ° C'de sabit tutuldu ve HSEPC elde edildi.



Şekil 8. HSS nin epoksidasyonu(HSEPC)

#### 2.1.3. HSEPC nin Gam Arabik ile Fonksiyonelleştirilmesi

Bu aşamada, elde edilen HSEPC üzerine ağırlıkça (w/w) 1:1 oranında gam arabik eklendi ve karışım 3 saat boyunca 70°C'de reaksiyona sokuldu. Daha sonra süzüldü ve birkaç kez su / etanol çözeltisi ile yıkandı, vakum altında 80° C'de kurutuldu ve HSEPCGUM elde edildi. Gam arabik yapısında dipolar halde bulunan 4-hidroksipirrolinden (Kanchan ve ark., 2018). Şekil 2'de görüldüğü gibi HSEPC ile bağlanabileceği tahmin edilmiştir.



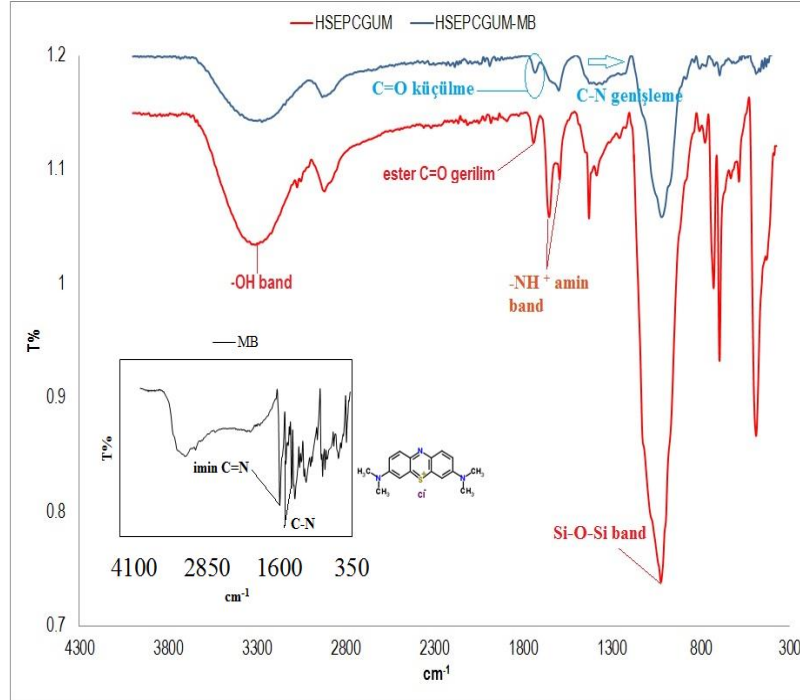
Şekil 9. Gam arabik (dipolar -4-hidroksiprolin) fonksiyonelleştirilmiş HSS (HSEPCGUM).

#### 2.1.4. Boya Stok Çözeltisi ve Adsorpsiyon Deneylelerinin Hazırlanması

Metilen mavisi (MB) stok çözeltileri, 125 mg boya tozunun 250 mL damıtılmış su ile çözülmesiyle hazırlandı. Sonuç olarak, boyanın stok konsantrasyonu 500 ppm'e ayarlandı. 5 ppm ile 50 ppm konsantrasyon aralığında boya standart çözeltileri, 500 ppm stok çözeltisinden hazırlandı. Boya stok çözeltilerinin hazırlanmasından sonra, her bir konsantrasyonu için MB sulu çözeltisinden 10 ml 0,02 g HSEPCGUM üzerine ilave edildi, daha sonra bu numuneler, toplam 60 dakika boyunca 35 ° C'de bir su banyosunda çalkalandı ve santrifüj edildi. Sıvı kısmın (çözelti) absorbans değerleri UV spektrofotometre ile 665nm'de ölçüldü. Katı kısımdan üçlü biyokompozit malzeme HSEPCGUM-MB elde edildi.

#### 2.1.5. Karakterizasyon

Gam arabik ile fonksiyonlaştırılan içi boş silika küreciklerin (HSEPCGUM) FTIR spektrumu incelendiğinde; 3050 cm<sup>-1</sup> de doymamış hidrokarbon bağına ait C-H gerilme bandı gözlenmiştir. HSEPC ait epoksi grubunun açılmasıyla hidroksiprolinine ait NH yapısı amin -NH<sup>+</sup> olarak çift pik ile 1650-1590 cm<sup>-1</sup> de gözlenmiştir. Ayrıca, dipolar-4-hidroksiprolinin HSEPC ile etkileşimi sonunda konjugat estere ait C=O gerilim piki 1740 cm<sup>-1</sup> gözlenmiştir (Şekil 3). Adsorpsiyondan sonra, MB yapısında mevcut imin (C=N) bandının 1590 cm<sup>-1</sup> oldukça küçüldüğü buna karşılık 1484-1386 cm<sup>-1</sup> de (C-N) bandının genişlediği görülmüştür. Bunun sonucunda, HSEPGUM'daki dipolar-4-hidroksiprolin'in karboksil grupları (C-O<sup>-</sup>) ile metilen mavisine ait C=N<sup>+</sup> ve C-N bağlarında bir iyonik yapının oluşabileceği Şekil 3 de FTIR karakterizasyonu ile tahmin edildi (Duran ve ark., 2009).



Şekil 10. FTIR karakterizasyonu

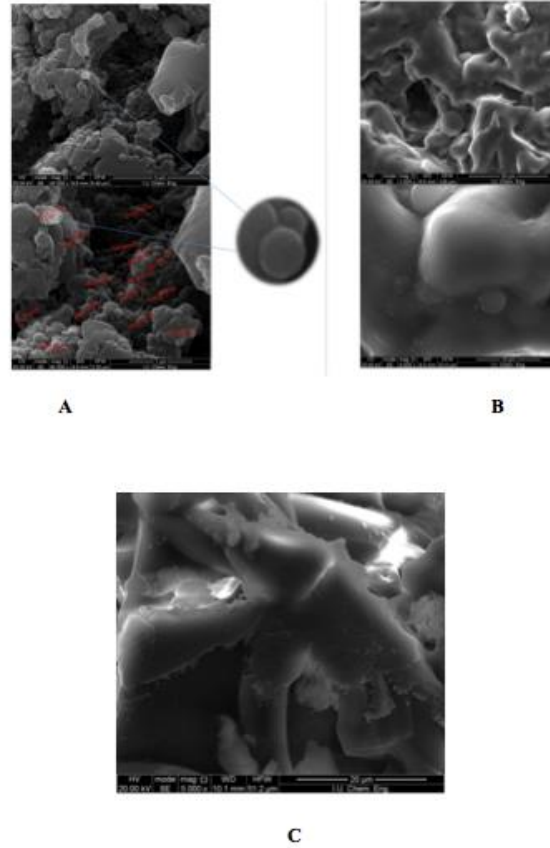
SEM karakterizasyonu incelendiğinde, Şekil 4' de görüldüğü gibi, HSS için parçacıklar küresel bir yapıya sahiptir. Bu parçacıkların büyüklüğü 70 nm ila 250 nm arasındadır. Şekil 4b de, HSEPCGUM için gam arabik ve silika arasında faz ayrımı gözlenmedi ve gam arabik içindeki silika fazının homojen dağılımı tespit edildi. Şekil 4c de, HSEPCGUM-MB için gam arabik ile değiştirilmiş içi boş silis küreye yüklenen MB adsorbanın yüzeyini değiştirmiştir. MB boya, ikinci olarak adsorbanın yüzeyini tamamen kapladığı görüldü.

### 2.1.6. Adsorpsiyon Çalışmaları

0,02g HSEPCGUM üzerine farklı derişimlerde (10, 25, 50 ppm) 35°C de MB çözeltisinden 10ml katıldı. Dengeye gelme zamanı olarak 45 dakika bulundu ve dengedeki madde miktarı ( $q_d$ ) değerleri hesaplandı. Ve bu değerler Langmuir izotermine uygulandı. 0,02g HSEPC için maksimum MB adsorplama değeri  $125\text{mgg}^{-1}$  olarak Tablo 1 gösterildiği gibi bulundu.

**Tablo 1.** Adsorpsiyon izoterm sabitleri 35°C

0.02g HSEPCGUM	
İzoterm/boya	MB
Langmuir	
b ( $\text{L mg}^{-1}$ )	0.01
$X_{\text{max}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	125
$R^2$	0.98

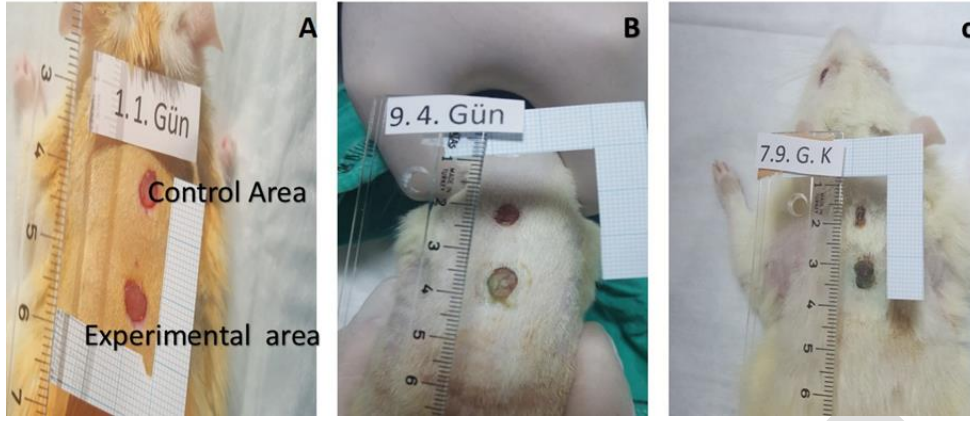


Şekil 11. A) HSS'nin, B) HSEPCGUM'min C) HSEPCGUM-MB 'mın, SEM görüntüleri

## 2.2. Histolojik Çalışmalar

İn vivo testleri için Türkiye Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bağıcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu, çalışma protokolünü onayladı (Sayı: 2017/54). Çalışmamızda aynı yaşta toplam 12 Sprague - Dawley erkek rat oda sıcaklığında ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda ayrı kafeslerde standart rat yemi ve su ile beslendi. Hayvanlara xylazin %2 (0,1 mg/kg) ve ketamin (0,1 mg/kg) kombinasyon anestezisi uygulanmıştır. Her bir ratta aseptik koşullar altında sırt bölgelerinden biyopsi pensi ile 6 mm çapında kontrol ve deney amaçlı iki yara bölgesi Şekil 5' de görüldüğü gibi oluşturuldu (Paddock ve ark., 2003). Kontrol grubuna ait yara bölgesine hiçbir madde uygulanmadı.

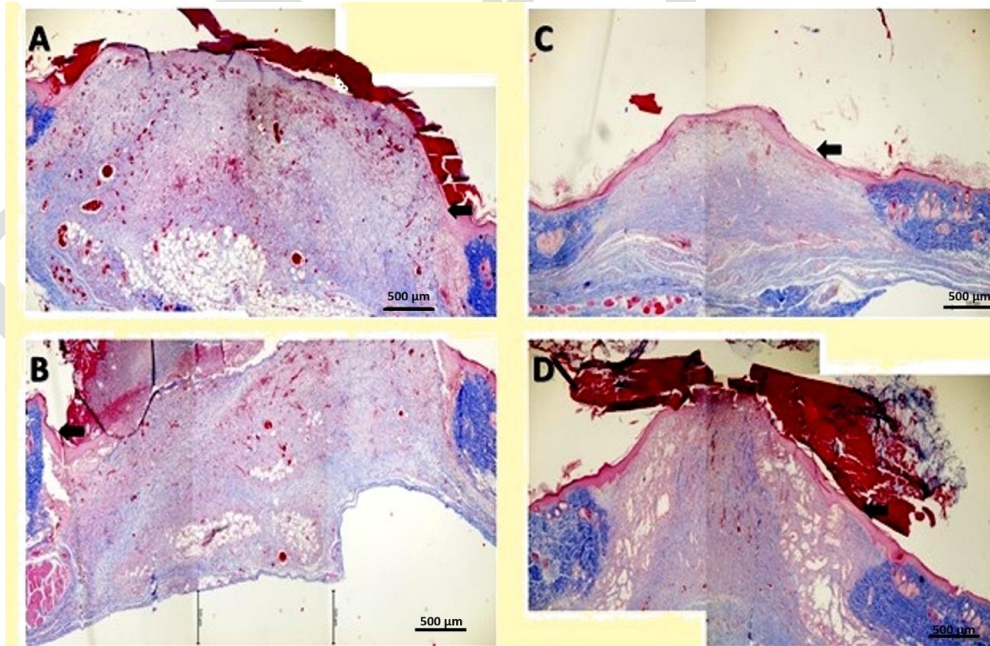
Deney grubuna ait yara bölgesine ise her gün 0.55 mg HSEPCGUM (toz) uygulanmıştır. Her gün ilaç uygulamadan önce kontrol ve deney yara bölgeleri kamera ile görüntülendi. İlaç etki süresini değerlendirmek için ratlar iki gruba ayrıldı. İlaç uygulaması I. grup 4 gün (n:6) ve II. grup 8 gün (n:6) olarak belirlendi. Birinci grup ilaç uygulanmasını takip eden dört günlük süre sonunda beşinci gün altı hayvan sakrifiye edilerek yara bölgesinden alınan kontrol ve deney grubuna ait deri örnekleri %10 tampomlu formaldehit içerisine alındı. İkinci grupta ise dört gün daha ilaç uygulama işlemine devam edildi ve günlük olarak görüntülendi. Toplam sekiz günlük tedavi sonrasında dokuzuncu günde bu hayvanlardan da anestezisi altında deri örnekleri % 10 luk tampionlu formaldehite alındı. Alınan deri örnekleri rutin histolojik doku takip işlemi yapılarak bloklandı. Bu bloklardan 5 µm kalınlığında 10'ar adet kesit alındı ve bu kesitlere Masson triple boyandı. Histolojik olarak yapılan değerlendirmelerde epitel uzunluğu, yara ağızları arasındaki uzunluk, fibroblast sayısı, damar sayısı ve yara yüzey alanları hesaplandı. Yara bölgesinde yeni şekillenen epitel uzunluğunu, yara ağızı arasındaki açıklık ve yara yüzey alanını belirlemek için İmage Analiz programı kullanıldı (Keskin ve ark., 2017). Damar sayısını belirlemek için noktalı gratikül ile 40'lık büyütmede yara ağzının iki kenarı ve orta bölgesinden olmak üzere her preparatta üç ayrı bölgede toplam 235.200 µm<sup>2</sup> alanda damar sayısı belirlendi. Fibroblastlar noktalı gratikül ile her hayvanda 10 ayrı alanda (10x10000 µm<sup>2</sup>) sayım gerçekleştirildi (x100). Elde edilen değerler Independent samples T Test ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 5. Yara iyileşme bölgelerinin Kontrol ve Deney gruplarında karşılaştırmalı görüntüleri; (A). Postoperatif 1. Gün, (B) Postoperatif 5. Gün, (C) Postoperatif 9. Gün.

### TARTIŞMA

Yeni ve hızlı bir yöntem olan ball milling ile elde edilen nano boyuttaki HSS nin doğal reçine olan gam arabik ile fonksiyonlandırılması ile HSEPCGUM elde edildi. Bu biyokompozit malzemenin katyonik boya olan metilen mavisini yüksek (maksimum) adsorplama kapasitesi ile tuttuğu yapılan adsorpsiyon çalışmaları sonucunda bu değer  $125\text{mg g}^{-1}$  olarak bulundu. Adsorplama yöntemi ile toz halde elde edilen üçlü biyokompozit malzemenin (HSEPCGUM-MB) yara iyileşmesi üzerindeki etkisi tespit edilmeye çalışıldı. Üçlü biyokompozit toz malzemenin, yapılan histolojik değerlendirmelerde tüm kontrol ve deney gruplarında yara iyileşme bölgesinde herhangi bir kıl follikülünün gelişmediği gözlemlendi (Şekil 6). Yeni şekillenen epitel uzunluğu karşılaştırıldığında dört günlük süre sonunda oluşan epitel uzunluğunun, kontrol grubuna göre daha uzun olduğu belirlendi. Sekiz günlük deney sonunda ise deney grubunda epitel uzunluğu fazla olmasına rağmen dört günlük ve sekiz günlük gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı belirlendi ( $P>0.05$ ) (Tablo 2). Yara dudakları arasındaki mesafe de ise dört günlük ve sekiz günlüklerde kontrol grubunda deney grubuna göre daha az olduğu fakat istatistiksel bir fark görülmediği belirlendi ( $P>0.05$ ) (Tablo 2, Şekil 6).



Şekil 6. Masson tricrom boyanmış Histolojik Mikrofotografılar; Siyah oklar: yara bölgesinde epitel oluşumu; (A) 5. günde kontrol grubu yara bölgesi, (B) 5. günde deney grubu yara bölgesi, (C) 9. günde kontrol grubu, (D) 9. günde deney grubu yara bölgesi. Bar: 500 µm

Fibroblast sayısı bakımından dört günlük deney sonrasında deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla sayıda olduğu ve istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi ( $P<0.05$ ) (Tablo 2). Sekiz günlük grupta ise deney grubunda sayısal olarak kontrol grubuna göre fazla olmasına rağmen istatistiksel bir fark bulunmamıştır ( $P<0.05$ ) (Tablo 2).

Damar sayısı değerlerin de ise dört günlük kontrol grubunda deney grubuna göre sayısal olarak daha fazla ve istatistiksel bir fark bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (Tablo 2). Sekiz günlük grup ta ise deney grubundaki damar sayısı kontrol grubuna göre fazla olmasına rağmen istatistiksel bir fark bulunmamıştır ( $P>0.05$ ) (Tablo 2).

Yara yüzey alanı değerleri karşılaştırıldığında en belirgin farkın bu parametrede olduğu görüldü. Dört günlük ve sekiz günlük kontrol gruplarında deney gruplarına göre yara yüzey alanının belirgin bir şekilde küçüldüğü belirlendi ve gruplar arasında belirgin bir istatistiksel fark bulunmuştur ( $P<0.05$ ) (Tablo 2).

**Tablo2.** Yara İyileşirmesi

	4 Günlük Kontrol	4 Günlük Deney	8 Günlük Kontrol	8 Günlük Deney
Epitel Uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )	1616,83 $\pm$ 102,751 <sup>NS</sup>	1477,83 $\pm$ 127,442 <sup>NS</sup>	2802,117 $\pm$ 256,957 <sup>NS</sup>	3449,33 $\pm$ 303,508 <sup>NS</sup>
Yara Dudakları arasındaki açıklık ( $\mu\text{m}$ )	4969 $\pm$ 157,476 <sup>NS</sup>	5401 $\pm$ 224,826 <sup>NS</sup>	2740,5 $\pm$ 317,375 <sup>NS</sup>	3695,83 $\pm$ 340,796 <sup>NS</sup>
Fibroblast Sayısı	207,33 $\pm$ 19,082*	288,83 $\pm$ 10,904*	232,5 $\pm$ 13,978 <sup>NS</sup>	299,5 $\pm$ 16,28 <sup>NS</sup>
Damar Sayısı	29,5 $\pm$ 1,979*	23,33 $\pm$ 1,358*	22 $\pm$ 1,751 <sup>NS</sup>	25 $\pm$ 1,789 <sup>NS</sup>
Yara Yüzey Alanı	0,14375 $\pm$ 0,016387***	0,25283 $\pm$ 0,020081***	0,6983 $\pm$ 0,0066***	0,15867 $\pm$ 0,16186***
	n=6	n=6	n=6	n=6

NS:  $P>0.05$ , \*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$

Yara iyileşmesi farklı aşamalardan oluşan kompleks bir süreçtir (Singer ve ark., 1999). Deneysel olarak oluşturulan yara modellerinde kıl follüküllerinin 14 günde şekillendiğini bildirmişlerdir (Sabol ve ark., 2012). Çalışmamız 8 günlük bir deneysel aşamada tamamlandığı için bu süre içerisinde herhangi bir kıl follükülü şekillenmemiştir.

Deney hayvanlarında ve insanlarda yara iyileşmesi üzerine farklı maddelerle oluşturulan farklı yara modellerinde birçok çalışma yapılmıştır (Piskin ve ark., 2012; Bazaz ve ark., 2013; Faisal ve ark., 2014; Zheng ve ark., 2017; Ermutlu ve ark., 2018). Zheng-Mei ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metilen mavisi-protein cilt fibroblast proliferasyonunu uyarmada ve hücrel yaşlanmayı geciktirmede etkili olduğunu belirtmişlerdir (Zheng ve ark., 2017). Fakat, bizim elde ettiğimiz biyokompozit malzemenin (HSEPCGUM-MB) ana maddesi olan gam arabik yapısında bulunan arabinogalaktan protein (AGP) kompleks, hidroksiprolin (Hyp), Ala, Ser, Thr, ve Gly gibi majör amino asit bileşenlerini içerir (Showalter ve ark., 2001). Yaptığımız in vivo deney sonucunda HSEPCGUM-MB yara iyileşmesi alanında özellikle epitelizasyon bakımından olumlu bir katkısı olmadığı fakat dermis alanında bağ doku çoğalması bakımından daha fazla etkili olduğu gözlemlenmiştir. Dermis alanında, deri altı dokuların büyümesi, gelişmesi ve tamirinde rol oynayan hyalüronik asit (HA), kondroitin sülfat, dermatin sülfat ve heparin sülfat içeren glikosaminoglikan ve uzun zincirli doğal bir şeker olan bir polisakarittir. HA diğer doğal maddelerden daha fazla su tutabilir.

Histolojik olarak bağ dokunun fetal dönemdeki gelişimi ve buna bağlı olarak yara bölgesinin iyileşmesi iki ayrı aşamada gerçekleşir. Önce az sayıda iplikli yapılar ve çok sayıda fibroblast olduğu belirtilmiştir. Sonraki gelişim aşamasında ise ipliksel yapılar ve hücreler arası temel madde miktarı artmaktadır (Aktaş ve ark., 2009). HSEPCGUM'a ait hidroksiprolinin OH grubu ile karboksil grupları arasında direk hidrojen bağı oluşturma yeteneği oldukça düşüktür (Bella ve ark., 1995). Bu yüzden, HSEPCGUM'nin adsorpsiyon işleminden sonra metilen mavisi ile dipolar iyonik yapı oluşturduğu düşünülmüştür. Daha kararlı yapıya geçmek için, ortamda bulunan su molekülleri yardımıyla karbonil ve amin gruplarının su köprüleri oluşturduğu tahmin edilmiştir (Duran ve ark., 2019). In vivo çalışmada, dermis yapıda mevcut olan hyalüronik asidin hidratasyon özelliğinin fazla olmasından su köprülerini kendi bünyesine sıkıca bağladığı tahmin edilmektedir (Sağlam ve ark., 2001).

## SONUÇ

HSEPCGUM üzerinde metilen mavisini (MB) oldukça iyi adsorplandığı görülmüştür. Adsorpsiyon sonunda üçlü biyokompozit malzeme elde edildi (HSEPCGUM-MB). Toz halde elde edilen biyokompozit malzeme epitelizasyon ve fibroblast etkisi in vivo çalışma sonunda epiderminin hemen altında yer alan derinin ikinci

ana tabakasında oldukça etkili olduğu ve dermiste hücre sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Ancak, epitelizasyon hattının ilerleyişini engellediği görülmüştür. Bunun ise kullanılan biyokompozitin toz halinde uygulanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu biyokompozit maddenin yapısında değişiklik oluşturulmadan katkı maddeleri ile krem formuna getirilerek kullanılmasının daha olumlu sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Aktaş A, Dağlıoğlu S, 2009. Examination of structural features of skin in sheep breeds fetuses with histological methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(3): 391-396.
- Bazaz MR, Mashreghi M, Shahri MN, Mashreghi M, Asoodeh A, Behnam M, Rassouli & Golmohammadzadeh S 2013. Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice. *Pharmaceutical Biology*, 51:12, 1600-1606, DOI: 10.3109/13880209.2013.804846.
- Bella J, Brodsky B, Berman HM, 1995. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure*, 3 (9): 893-906.
- Dauqan E, Abdullah A 2013. Utilization of gum Arabic for industries and human health. *American Journal of Applied Sciences*, 10 (10): 1270-1279.
- Deng Z, Zhen Z, Hu X, Wu S, Xu Z, Paul K 2011. Hollow chitosan-silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy. *Biomaterials*, 32: 4976-4986.
- Duran H, Alkan ÜF, Ulkay MB, Karakuş S, Aktaş A, Şişmanoğlu T 2019. Investigation of the in vitro cytotoxic effects and wound healing activity of ternary composite substance (hollow silica sphere/gum arabic/methylene blue). *International Journal of Biological Macromolecules*, 121: 1194-1202, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.098>.
- Ermütlu CŞ, Kılıç E, Aksoy Ö, Yayla S, Baran V, Dağ S, Ulkay MB, Aydın U, Demirtaş B 2018. Effect of bovine corpus vitreum on full-thickness dermal wound healing: An experimental study in rats. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24 (1): 33-38.
- Faisal AK, Kachiwal AB, Shah Muhammad MG, Shoaib K, Ghulam ML, Abdul M, Israr ul H. and Faiz MK 2014. Histological characterization of wound healing of flank versus midline ovariohysterectomy indifferent age groups of cats. *Journal of Clinical Pathology and Forensic Medicine*, 5(2): 6-16.
- Kanchan U, Sebastian B, and Ali AH 2018. Quantum mechanical effects in zwitterionic amino acids: The case of proline hydroxyproline, and alanine in water. *The Journal of Chemical Physics*, 148:, 222-826.
- Keskin I, Gunal Y, Ayla S, Kolbasi B, Sakul A, Kilic U, Gok O, Koroglu K & Ozbek H 2017. Effects of *Foeniculum vulgare* essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing. *Biotechnic & Histochemistry*, 92:4, 274-282, DOI:10.1080/10520295.2017.1306882.
- Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *130 (4): 489-93*.
- Liang CC, Ann YP & Guan JL 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Division of Molecular Medicine and Genetics and Cell and Developmental Biology. Departments of Internal Medicine, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan 48109, USA*.
- Liu J, Liu F, Gao K, Wu JS, Xue D.F 2009. Recent developments in the chemical synthesis of inorganic porous capsules. *Journal Material Chemistry*, 19: 6073-6084.
- Lou XW, Archer LA, Yang Z 2008. Hollow Micro-/Nanostructures: Synthesis and Applications. *Advanced Materials*, 20: 3987-4019.
- Nurhasni H, Cao J, Choi M, Kim I, Lee BL, Jung Y, Yoo JW 2015. Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid) polyethylenimine Nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and in vivo wound healing activity. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 3065-3080.

- Paddock HN, Schultz GS, Mast BA 2003. Methods in reepithelialization: A porcine model of partial-thickness wounds. In: DiPietro LA, Burns AL, eds., Wound Healing: Methods and Protocols. Totowa: Humana Press Incorporation, 17–36.
- Piskin A, Altunkaynak BZ, Tumentemur G 2012. The beneficial effects of *Momordica charantia* (bitter gourd) on wound healing of rabbit skin. *Journal of Dermatological Treatment*, 19:1–8.
- Sabol F, Dancakova L, Gal P, Vasilenko T, Novotny M, Smetana K, Lenhardt L 2012. Immuno histological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. *Veterinarni Medicina*, 57 (2): 77–82.
- Sağlam M, Aştı RN, Özer A 2001. Genel Histoloji, Yorum Matbacılık. Ankara 6. Basım. 144-174.
- Showalter AM 2001. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1399–1417.
- Singer AJ, Clark RA 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341:738–46.
- Singh B, Sharma S, Dhiman A 2013. Design of antibiotic containing hydrogel wound dressings: Biomedical properties and histological study of wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 457: 82–91.
- Zhao W, Lang M, Li Y, Li L, Shi J 2009. Fabrication of uniform hollow mesoporous silica spheres and ellipsoids of tunable size through a facile hard-templating route. *Journal Material Chemistry*, 19: 2778-2783.
- Zheng MX, Mike O'D, Linlin S, Ji YC, Margaret R & Cao K 2017. Anti-Aging Potentials of Methylene Blue for Human Skin. *Longevity Scientific Reports*, 7: 2475, 1-11.



## ***Lactarius salmonicolor* as an effective biomaterial for the removal of cadmium from solutions**

Tamer AKAR<sup>1</sup>, Melda KARADAĞ<sup>2\*</sup>, Sema ÇELİK<sup>1</sup>, Sibel TUNALI AKAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, 26480, Eskişehir, Turkey.

<sup>2\*</sup>Eskişehir Osmangazi University, Graduate School of Natural and Applied Science, Department of Chemistry, 26480, Eskişehir, Turkey.

Corresponding author e-mail: meldakaradag@gmail.com

---

### **Abstract**

Pollution of the water sources by various pollutants such as heavy metals is a serious environmental problem. Uncontrolled discharge of metal bearing industrial effluents into aquatic environment can pose serious effects on the living systems. In this context, interest has arisen on the biosorption applications for the treatment of contaminated waters. This process is based on the physicochemical interactions between toxic metal ions and biomaterial surface. This study was undertaken to prepare an environmentally friendly biomaterial for the treatment of cadmium contaminated waters. Batch mode biosorption potential of the biomaterial prepared from *Lactarius salmonicolor* was systematically explored for the treatment of Cd<sup>2+</sup> contaminated aquatic media. Initial pH, biomaterial dosage and contact time parameters were screened through the biosorption experiments. Equilibrium biosorption experiments showed that the suggested biomaterial has a good biosorption potential for Cd<sup>2+</sup> at the pH values of 5.0, 6.0 and 7.0. More than 80% metal removal efficiency was obtained by using 5 g L<sup>-1</sup> biomaterial. Equilibrium for the biosorption process occurred within 5 min. Langmuir model was well predicted the equilibrium biosorption data. The obtained results in this study indicated the potential applicability of *L. salmonicolor* as a low-cost and environmental friendly biomass for the removal of Cd<sup>2+</sup> pollution in aquatic media.

**Keywords:** Biosorption, Cadmium, Fungal Biomaterial, *Lactarius salmonicolor*.

### **INTRODUCTION**

Nowadays, rapid increases in population and growing industrialization have lead to pollution of environment by various toxic substances and environmental pollution have become a serious threat for living organisms in the ecosystem (Adeniyi et al., 2019; Igiri et al., 2018; Çay et al., 2004). Heavy metals, paints, pharmaceuticals, surfactants, pesticides, personal care products and other chemicals that can be found in industrial wastewaters are important pollutants. (Adeniyi et al, 2019; Siyal et al., 2018). Heavy metal ions, which are extremely stable, spread to the environment as a result of many activities such as industrial wastes, fossil fuels and mining activities. Metal pollutants are a major threat to living systems with heavy environmental damage and accumulation in the food chain. (Tsezos et al., 1995; Bueno et al., 2008; Çay et al, 2004; Chandra Sekhar et al., 2003). Excessive heavy metal toxicity can cause adverse effects on plants, animals and humans, besides, irritation of central nervous system and damage to kidney and liver (Yuan et al., 2019; Siyal et al, 2018).

Cadmium is one of the most toxic heavy metals which is frequently found in industrial wastewaters. This heavy metal may cause significant health problems even with a small amount of exposure. (Sari et al., 2008; Li et al., 2018; Ouzouni et al., 2007). There are various traditional methods for the removal of metal pollutants from contaminated industrial waters (Bueno et al, 2008; Fomina et al., 2014). However, the implementation of these methods is often restricted by technical and economic reasons. (Yuan et al, 2019; Li et al, 2018).

In recent years, there has been an increasing interest in low cost treatment technologies that require a small amount of chemicals and low energy consumption in order to remove environmental pollutants from waste waters. (Adeniyi et al, 2019; Chojnacka et al., 2019). Biosorption as an effective, simple, feasible and economical method is the widely used environmentally friendly alternative technique among wastewater treatment methods (Adeniyi et al, 2019; Siyal et al, 2018; Chojnacka et al, 2019; Çay et al, 2004; Yuan et al, 2019).

In this method, biomass obtained from microorganisms, agricultural and industrial wastes, algae, bacterial species, animal materials and plants are used as biosorbent for removing the contaminants from aqueous solutions (Yuan et al, 2019; Adeniyi et al, 2019). Among the microbial type biomass, generally dead microbial biomass are of choice because of their properties such as high binding affinity and no toxicity limitations (Li et al, 2018; Bueno et al, 2008; Tsezos et al, 1995). In the biosorption process, one or more of the mechanisms such as ion exchange, complexation microprecipitation and redox processes may play a role (Escudero et al, 2016) The yield of toxic metal ions biosorbed by various biomaterials may affected from some parameters including metal ion concentration, biomass dosage, contact time and solution pH (Yuan et al, 2019).

The objective of this study was to explore the biosorption of Cd<sup>2+</sup> by macro fungi *Lactarius salmonicolor* (*L. salmonicolor*). Batch biosorption conditions (initial pH, contact time, biosorbent amount and initial concentration of cadmium ions) were optimized. Biosorption process was evaluated using equilibrium and isotherm models.

## MATERIAL AND METHODS

### Preparation of the biomass and metal solutions

Macro fungi *L. salmonicolor* was collected from its natural habitat in Gemlik, Turkey. The fruiting bodies of mushroom were washed repeatedly with deionized water to remove water-soluble impurities. Later, biomass dried in an oven at 60°C. Dried mushroom biomass was ground using a laboratory mill (IKA A-11) and sieved to obtain uniform particle size of less than 212 µm. Besides a stock solution of Cd<sup>2+</sup> was prepared from Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O by using deionized water at a concentration of 1.0 g/L. Different concentrations of cadmium ions for each biosorption experiments were obtained by diluting this stock metal solution. The initial pH values of the solutions were adjusted to desired value with 0.1 mol/L HCl or NaOH solutions.

### Metal biosorption studies in batch system

The biosorption performance of *L. salmonicolor* was investigated in batch mode. The batch mode biosorption studies were conducted by contacting of biosorbent with 25 mL of metal solutions by varying pH, biosorbent amount, contact time and initial Cd<sup>2+</sup> concentration. The metal biomass mixture in 100 mL beakers was stirred on a multipoint digital magnetic stirrer at 200 rpm. The effect of initial pH on the biosorption capacity of biosorbent was investigated by equilibrating the dye–biomass suspension containing 0.1 g biosorbent sample and 100 mg L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> solutions, at different pH values between 2.0 and 8.0. In order to determine the effect of biosorbent dosage on the biosorptive removal process, the amount of biosorbent used was varied from 1.0 to 7.0 g L<sup>-1</sup>. Equilibrium time profile of biosorption was studied in the range of 1–90 min. Finally, in order to determine the effect of dye concentration on the biosorption process, Cd<sup>2+</sup> concentrations were changed between 10 and 300 mg L<sup>-1</sup>. At the end of the biosorptive treatment process, the biosorbent was separated from the liquid phase by centrifugation and the residual concentration of cadmium in the supernatant was determined by an Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) (Unicam, 929).

The biosorption capacity ( $q_e$ ) and yield (%) was determined by using the following equations, respectively:

$$q_e = \frac{V(C_i - C_e)}{m} \quad (1)$$

$$\text{Biosorption}(\%) = \frac{C_i - C_e}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

Where,  $C_i$  and  $C_e$  are the initial and equilibrium concentrations (mg L<sup>-1</sup>) of cadmium ions, respectively,  $V$  is the volume (L) of the solution and  $m$  (g) is the biosorbent amount.

Data presented are the mean values from three independent experiments. Experimental errors were estimated and are depicted with error bars. Statistical treatment of the results was done using SPSS 10.0 for Windows where it is possible to evaluate whether the effect and the interaction among the investigated factors are significant with respect to the experimental error.

## Biosorption isotherm studies

Batch biosorption equilibrium data were evaluated with widely used isotherm models of Langmuir (Langmuir, 1916), Freundlich (Freundlich, 1906) and Dubinin–Radushkevich (Dubinin and Radushkevich, 1947). The linearized forms of the model equations are given as:

$$\text{Langmuir model: } q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (3)$$

$$\text{Freundlich model: } q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (4)$$

$$\text{Dubinin-Radushkevich (D-R) model: } \ln q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad (5)$$

where  $q_e$  and  $C_e$  are the amount of cadmium ions biosorbed per unit mass of *L. salmonicolor* biomass ( $\text{mol g}^{-1}$ ) and equilibrium cadmium ion concentration in solution ( $\text{mol L}^{-1}$ ), respectively.  $q_{max}$  is the maximum monolayer biosorption capacity ( $\text{mol g}^{-1}$ ) of *L. salmonicolor* and  $K_L$  is a constant related to biosorption energy ( $\text{L mol}^{-1}$ ),  $K_F$  ( $\text{L g}^{-1}$ ) and  $n$  (dimensionless) are Freundlich constants.  $q_{max}$  is the maximum biosorption capacity ( $\text{mol g}^{-1}$ ),  $\beta$  is the activity coefficient related to the biosorption energy,  $\varepsilon$  is the Polanyi potential which is represented by following equation:

$$\varepsilon = RT \ln(1 + 1/C_e) \quad (9)$$

where,  $R$  is the ideal gas constant and  $T$  (K) is the absolute temperature.

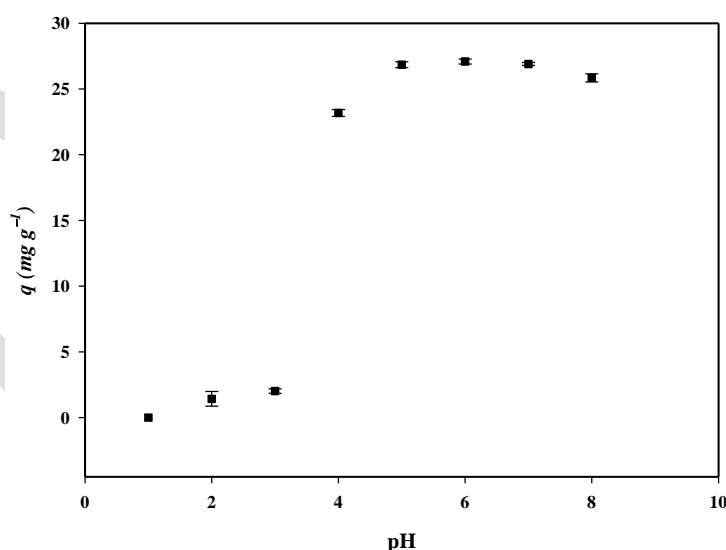
The average biosorption free energy  $E$  ( $\text{KJ mol}^{-1}$ ) can be calculated from Eq. (10) by using  $\beta$  constant.

$$E = 1/(2\beta)^{1/2} \quad (10)$$

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of pH on the biosorption capacity of *L. salmonicolor*

The cadmium biosorption performance of *L. salmonicolor* was tested over the pH range of 2.0-8.0 (Fig. 1). As can be seen from this figure, biosorption of cadmium ions onto *L. salmonicolor* biomass was controlled by pH-dependent mechanism. At the pH range of 1.0-3.0 cadmium biosorption was almost negligible. Between pH 4.0 and pH 8.0, high  $\text{Cd}^{2+}$  biosorption capacities were observed.



**Fig. 1** Biosorption capacities of *L. salmonicolor* at different pH values

The low biosorption capacities observed at acidic conditions can be explained by the high protonation of the functional groups of the *L. salmonicolor* which restrict the approach of  $\text{Cd}^{2+}$  ions. In this conditions, hydrogen ions might effectively compete with metal cations for binding to the biosorption sites. The high biosorption capacities observed at high pH values can be explained by deprotonation of biosorbent surface with increasing pH. As a result of the deprotonation, negatively charged functional groups appear on the biosorbent surface. Thus, the electrostatic interaction between  $\text{Cd}^{2+}$  ions and biosorbent functional groups is

increasing. This trend is similar to previous studies about the effect of the initial pH on the biosorption of cadmium ions onto different biomasses (Barka et al., 2010; Peng et al., 2018).

### Effect of Biosorbent Dosage

The effect of biosorbent amount on the percentage removal of Cd<sup>2+</sup> was studied by changing the biomass amount from 1.0 to 7.0 g L<sup>-1</sup>. The dependence of the Cd<sup>2+</sup> biosorption to biosorbent dosage is presented in Fig. 2.

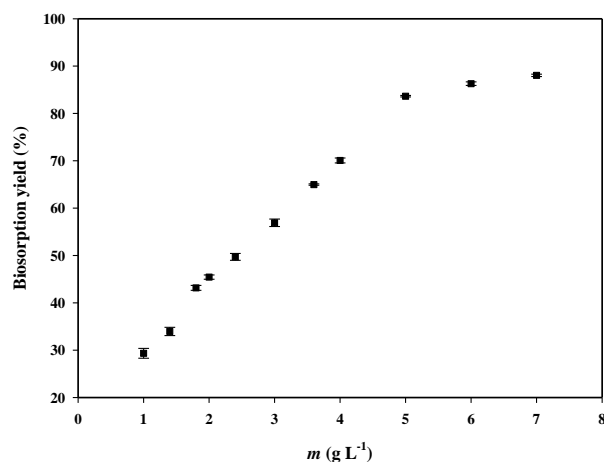


Fig. 2. Effect of biosorbent dosage on the sorption of Cd<sup>2+</sup> onto *L. salmonicolor*

Fig.2 indicated that biosorption yields of *L. salmonicolor* increased from about 30 to 83% when the biomass amount in the biosorption mixture varied from 1.0 to 5.0 g L<sup>-1</sup>. The increasing biosorption yield with increasing biosorbent dosage may be explained by the greater surface area and the large number of vacant biosorption sites thus favoring more metal biosorption. Therefore, the optimum dosage of biosorbent was selected as 5.0 g L<sup>-1</sup> in the further biosorption experiments. Increase in the biomass dosage after this point did not cause any effect on its biosorption yield of *L. salmonicolor* due to the partial agglomeration of sorbent particles in the aquatic medium. It lead to increase in the diffusion path length and to reduce of the biosorbent surface area (Barka et al., 2010; Akar et al., 2018).

### Effect of contact time

Fig. 3. shows the biosorption of Cd<sup>2+</sup> onto *L. salmonicolor* biomass as a function of contact time.

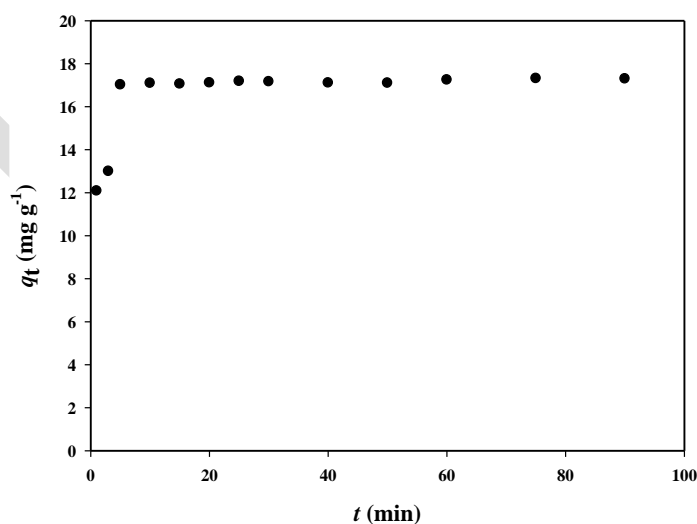


Fig. 3. Effect of contact time for Cd<sup>2+</sup> biosorption by *L. Salmonicolor*

The biosorption capacity of biomass increased in a linear manner with time and the biosorption equilibrium was attained within 5 min. After the equilibrium period dye biosorption was nearly constant. The rapid biosorption can be explained by the abundance of metal binding sites on the biosorbent and with gradual occupancy of the binding sites the biosorption became less efficient in the further stages (Vimala and Das, 2009). On the other hand short biosorption equilibrium time observed in this stage is an important advantage for the real application of this process.

### Evaluation of biosorption with different isotherm models

Isotherm studies are important applications for the understanding of the biosorption mechanism. Langmuir, Freundlich and D-R isotherm models were used for modelling the batch mode biosorption of Cd<sup>2+</sup> onto *L. salmonicolor*. The general biosorption isotherm plot for batch mode of operations is given in Fig. 4.

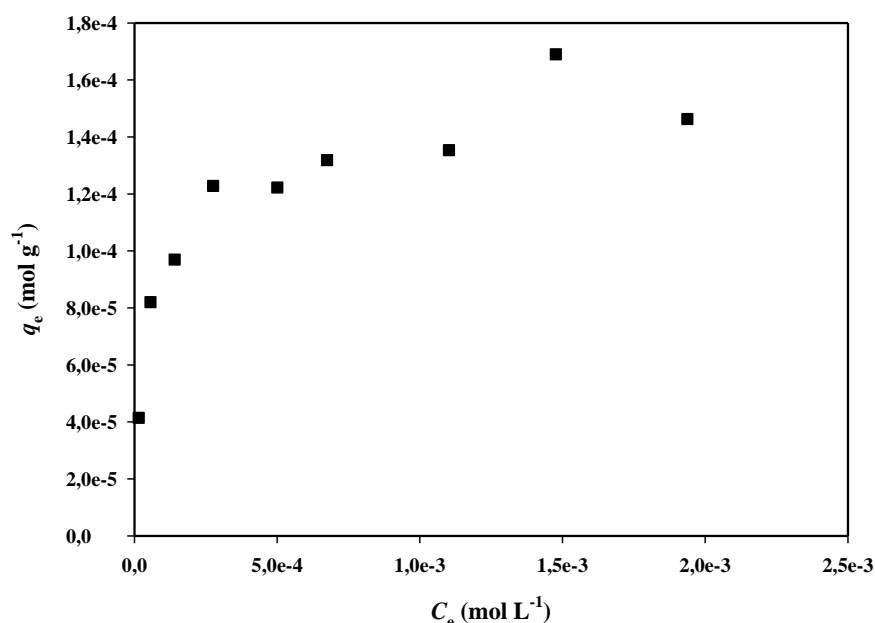


Fig.4. General isotherm plot for the batch mode biosorption of Cd<sup>2+</sup> onto *L. salmonicolor*

All of the isotherm model parameters for the biosorption are presented in Table 1.

Table 1. Isotherm parameters for the sorption of Cd<sup>2+</sup> by of *L. Salmonicolor*

Sorbent-Metal	Langmuir		Freundlich			Dubinin-Radushkevich (D-R)			E	
	$q_{max}$ (mol g <sup>-1</sup> )	$K_L$ (L mol <sup>-1</sup> )	$r_L^2$	n	$K_F$ (L g <sup>-1</sup> )	$r_F^2$	$q_{max}$ (mol g <sup>-1</sup> )	$\beta$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-2</sup> )		$r_{D-R}^2$
LS-Cd	1,39x10 <sup>-4</sup>	2,75x10 <sup>4</sup>	0,983	4,03	8,03x10 <sup>-4</sup>	0,906	2,92x10 <sup>-4</sup>	1,54x10 <sup>-3</sup>	0,940	17,98

Higher coefficients of determination value for Langmuir (0.983) than Freundlich (0.906) and D-R (0.940) models suggesting that the equilibrium data predicted well the Langmuir isotherm model in the investigated concentration range.  $q_{max}$  value, calculated from the Langmuir model is  $1.39 \times 10^{-4}$  mol g<sup>-1</sup> (mg g<sup>-1</sup>). The appropriate parameters of the Langmuir isotherm model suggest that the biosorption of Cd<sup>2+</sup> ions onto *L. salmonicolor* biomass occurs as monolayer.

## CONCLUSION

The batch biosorption characteristics of *L. salmonicolor* biomass were evaluated for Cd<sup>2+</sup> ions. The results showed the potential applicability of *L. salmonicolor* as a low-cost and ecofriendly biomaterial for the removal of Cd<sup>2+</sup> ions from aqueous solutions. The present study indicated that biomass prepared from *L. salmonicolor* was efficiently used for the biosorptive treatment of Cd<sup>2+</sup> contaminated solutions with the good biosorption yields in batch systems. pH, biosorbent dosage and contact time were optimized for the biosorption process. The metal biosorption equilibrium was attained within 5 min. The biosorption yield was higher than 80% at pH 6.0 by using 5 g L<sup>-1</sup> of biosorbent. Overall findings indicated that the suggested biosorbent can be regarded as an alternative candidate for the removal of toxic Cd<sup>2+</sup> from contaminated aqueous solutions.

## Acknowledgement

This study was financially supported by the commission of Scientific Research Projects of Eskisehir Osmangazi University with the project number 200819007.

## REFERENCES

- Adeniyi AG, Ighalo JO 2019. Biosorption of pollutants by plant leaves: An empirical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7: 103100.
- Akar T, Uzun C, Çelik S, Tunali Akar S 2018. Biosorption of basic blue 7 by fungal cells immobilized on the green-type biomatrix of *Phragmites australis* spongy tissue. *International Journal of Phytoremediation*, 20 (2): 145-152.
- Barka N, Abdennouri M, Boussaoud A, Makhfouk ME 2010. Biosorption characteristics of cadmium (II) onto *Scolymus hispanicus* L. as low-cost natural biosorbent. *Desalination*, 258 (1-3): 66-71.
- Bueno BYM., Torem ML, Molina F, de Mesquita LMS 2008. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies, *Minerals Engineering*, 21: 65-75.
- Chandra SK, Kamala CT, Chary NS, Anjaneyulu Y 2003. Removal of heavy metals using a plant biomass with reference to environmental control. *International Journal of Mineral Processing*, 68: 37-45.
- Chojnacka K, Marcin M 2019. Green analytical methods of metals determination in biosorption studies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116: 254-265.
- Çay S, Uyanık A, Özaşık A 2004. Single and binary component adsorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions using tea-industry waste, *Separation and Purification Technology*, 38: 273-80.
- Dubinín M, Radushkevich L, 1947. Equation of the characteristic curve of activated charcoal. *Chem. Zentr*, 1: 875-890.
- Escudero LB., Maniero MA, Agostini E, Smichowski PN 2016. Biological sub-strates: green alternatives in trace elemental preconcentration and speciation analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 80: 531-546.
- Fomina M, Gadd GM 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, 160: 3-14.
- Freundlich H 1906. Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 57, 385-471.
- Igiri BE, Okoduwa SIR, Idoko GO, Akabuogu EP, Adeyi AO, Ejiogu IK 2018. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: a review, *Journal of Toxicology*, Article ID 2568038, 16 pages, <https://doi.org/10.1155/2018/2568038>.
- Langmuir I 1916. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11): 2221–2295.
- Li X, Li D, Yan Z, Ao Y 2018. Biosorption and bioaccumulation characteristics of cadmium by plant growth-promoting rhizobacteria, *RSC Advances*, 8: 30902-30911.
- Ouzouni PK, Veltsistas PG, Paleologos EK, Riganakos KA 2007. Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 480-86.
- Peng SH, Wang R, Yang LZ, He L, He X, Liu X 2018 Biosorption of copper, zinc, cadmium and chromium ions from aqueous solution by natural foxtail millet shell. *Ecotoxicology and environmental safety*, 165, 61-69.

- Sari A, Mendil D, Tuzen M, Soylak M 2008. Biosorption of Cd(II) and Cr(III) from aqueous solution by moss (*Hylocomium splendens*) biomass: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies, *Chemical Engineering Journal*, 144: 1-9.
- Siyal AA, Shamsuddin MR, Khan MI, Rabat NE, Zulfikar M, Man Z, Siame J, Azizli KA 2018. A review on geopolymers as emerging materials for the adsorption of heavy metals and dyes', *Journal of environmental management*, 224: 327-39.
- Tsezos M, Remoudaki E, Angelatou V 1995. A systematic study on equilibrium and kinetics of biosorptive accumulation. The case of Ag and Ni, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35: 129-53.
- Vimala R, Das N 2009. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: a comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 168 (1), 376-382.
- Yuan W, Cheng J, Huang H, Xiong S, Gao J, Zhang J, Feng S 2019. Optimization of cadmium biosorption by *Shewanella putrefaciens* using a Box-Behnken design, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 175: 138-47.

## Lead Biosorption potential of *Gibberella fujikuroi* biomass for water treatment

Tamer AKAR<sup>1</sup>, Ümmü Gülsüm UZUNEL<sup>2\*</sup>, Sema Çelik<sup>1</sup>, Sibel TUNALI AKAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, 26480, Eskişehir, Turkey.

<sup>2\*</sup>Eskişehir Osmangazi University, Graduate School of Natural and Applied Science, Department of Chemistry, 26480, Eskişehir, Turkey.

Corresponding author e-mail: gulsumuzunel6727@gmail.com

---

### Abstract

Water pollution caused by toxic metals poses a serious threat to public health and environment. Effective removal of metal pollutants from contaminated waters is a challenge for environmental protection. Biosorption is a promising alternative process to remove such pollutants from aquatic media. This study focused on the preparation of an effective and ecofriendly biomaterial for the removal of Pb<sup>2+</sup> from contaminated aquatic solutions. In this context, a biomass was prepared from a fungal culture *Gibberella fujikuroi* to investigate the Pb<sup>2+</sup> biosorption potential. Biosorption characteristics of the biomaterial were explored by means of batch mode optimization experiments. Process was modelled by kinetic studies. Biosorption was found to change by initial pH, biosorbent amount, contact time and initial metal concentration. Maximum biosorption was observed at the initial pH of 5.0. The kinetic findings indicate the appropriateness of the Pseudo-second-order kinetic model. Results indicated that *G. fujikuroi* biomass has a good treatment potential for contaminated waters.

**Keywords:** *Gibberella fujikuroi*, biosorption, lead, equilibrium, optimization.

### INTRODUCTION

As a result of industrial operations, the toxic pollutants introduced into the aquatic systems are worldwide concern in recent years. Among many organic and inorganic pollutants, heavy metal ions like Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, etc. have a special importance because of their chronic toxicities, accumulation abilities in living tissues and carcinogenic in natures. Lead, as a common pollutant, has a wide application field such as mining, batteries, dying and so on. It is necessary to eliminate toxic metals like Pb<sup>2+</sup> from contaminated effluents before their release into receiving bodies of waters. Many techniques have been developed for heavy metal decontamination in wastewater such as precipitation, coagulation, reduction, cementation, evaporation, reverse osmosis, ultrafiltration, and ion exchange (Park et al., 2010; Akar et al., 2013a).

Conventional water treatment processes generally involve some disadvantages such as high operating and maintaining costs, incomplete metal removal, high reagent or energy requirements, generation of metal bearing sludge or other waste products that require safe disposal (Arief et al., 2008; Akar et al., 2013b).

In this context, Biosorption has been regarded as a cost-effective and environmental-friendly alternative technique, which can almost entirely remove metal ions from water especially at low concentrations without secondary pollution (Volesky and Holan, 1995; Fomina and Gadd, 2014).

So far, numerous biomaterials have been developed for heavy metal removal from water. Biological origin materials have following advantages: (1) Raw materials are easy to obtain. (2) They have high removal efficiency and sorption capacity due to abundance polar functional groups on their surface. (3) They generate the minimization of sludge after sorption process (Yinta et al., 2019).

The aim of this study was to investigate the process Pb<sup>2+</sup> biosorption potential of fungal biomass produced from *Gibberella fujikuroi* culture. Solution pH, the amount of biosorbent, contact time and initial Pb<sup>2+</sup> concentration were investigated. Kinetics of the biosorption are predicted using various kinetic models.



## MATERIAL AND METHODS

### Microorganism and culture media

The culture of *G. fujikuroi* (ATCC 12616) stored in potato dextrose agar (PDA) at 4°C. Biomass was produced in the liquid medium with the composition (per liter) of glucose (8 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g), MgSO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O (1 g), NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> (2,4 g), distilled water (1 L) and trace element solution (2 mL). Trace element solution was prepared by mixing ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6 H<sub>2</sub>O (0,1 g/L), H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (0.005 g/L), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,025g/L), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,005g/L), citric acid monohydrate (0,5 g/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,005g/L). This suspension was distributed equally to the Erlenmeyer flasks under the sterile conditions. After the inoculation of the spore suspension of fungi, liquid growth medium was shaken for 7 days at 24°C in incubator shaker. After this period, fungal biomass was separated from growth medium by filtration and washed with distilled water. The biomass was dried at 60 °C in an oven and ground and sieved to obtain particle fraction less than 150 µm (de Oliveira et al., 2007).

### Preparation of metal solutions and biosorption studies

A stock solution of Pb<sup>2+</sup> (1000 mg L<sup>-1</sup>) was prepared by dissolving a weighed quantity of Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (analytical grade, Merck) in deionized water. Other concentrations were prepared by diluting a proper amount of this stock solution. The pH values of the test solutions were adjusted to the desired values by adding 0.1 M HNO<sub>3</sub> or 0.1 M NaOH.

Batch mode biosorption experiments were performed by contacting a known amount of biosorbent with 50 mL, 100 mg L<sup>-1</sup> of metal solutions. Biosorption mixture was agitated on a multipoint magnetic stirrer at a constant stirring rate of 200 rpm. The effect of pH on the sorption of Pb<sup>2+</sup> was investigated by varying the pH values between 2.0 and 6.0. Sorbent dosage was changed from 1.0 to 6.0 g L<sup>-1</sup> at an initial Pb<sup>2+</sup> ion concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. For kinetic evaluation of Pb<sup>2+</sup> removal process, the contact time was varied from 5 to 90 min. The effect of initial metal ion concentration on the biosorption process was investigated in the concentration range of 10-300 mg L<sup>-1</sup>.

All the experiments were carried out in triplicate and the arithmetical mean values were used in calculations. All statistical analysis was done using SPSS 9.05 for Windows and standard deviations and error bars are indicated wherever necessary. The concentrations of residual Pb<sup>2+</sup> ions in the supernatant were determined by using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer, Analyst 400) with an air-acetylene flame. The calibration was checked periodically by using standard metal solutions.

Biosorption capacity ( $q_e$ ) (Eq. (1)) and biosorption yield (%) (Eq. (2)) of the biomass were calculated from the following equations:

$$q_e = \frac{(C_i - C_e)V}{m} \quad (1)$$

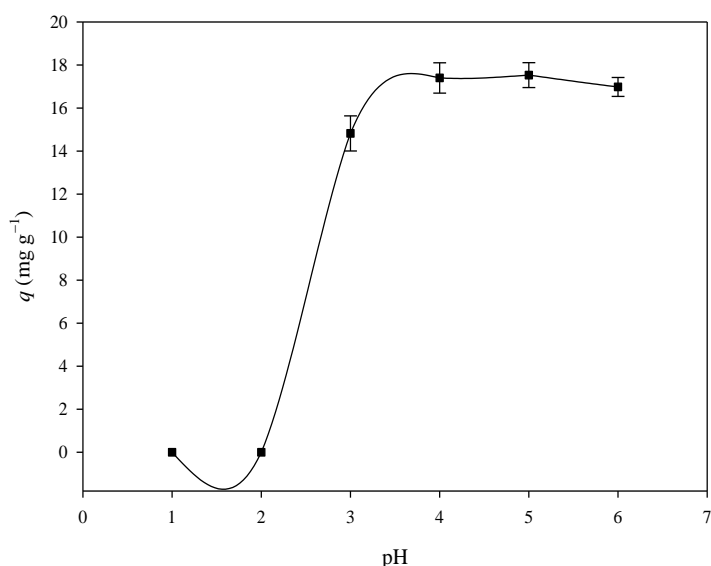
$$\text{Biosorption yield (\%)} = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

Where  $C_i$  and  $C_e$  (mg L<sup>-1</sup>) are the initial and equilibrium Pb<sup>2+</sup> concentrations in liquid-phase, respectively,  $V$  (L) is the volume of the Pb<sup>2+</sup> solution, and  $m$  (g) is the biosorbent dosage.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of pH

The batch biosorption studies were carried out at different initial pH values ranging from 1.0 to 6.0 in order to determine the effect of pH on the biosorption of Pb<sup>2+</sup> by microbial biomass of *G. fujikuroi*. The results presented in Fig. 1.

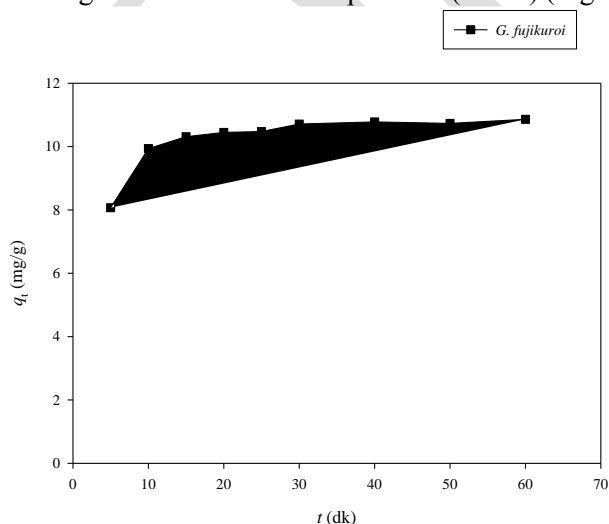


**Fig. 1.** Effect of pH on the Pb (II) biosorption capacity of *G. fujikuroi*

This figure indicated that the biosorption of  $Pb^{2+}$  was strongly pH dependent. Under highly acidic medium (pH 1.0 and 2.0) almost no biosorption was observed ( $p > 0.05$ ). The pH dependence of the  $Pb^{2+}$  removal process could be largely related to electrostatic attraction forces between functional groups present on *G. fujikuroi* surface and  $Pb^{2+}$  cations. At lower pH values metal binding sites on the biosorbent surface would be closely associated with the hydronium ions and repulsive forces restrict the access of  $Pb^{2+}$  ions to the binding sites of biosorbent. In the present study, the high biosorption capacities were observed at the pH 4.0 and 5.0 (Fig. 1). The biosorption capacity of the biomass increased rapidly from pH 2.0 to 4.0 ( $p < 0.05$ ) and remained constant between 4.0 and 5.0 ( $p > 0.05$ ). The precipitation of  $Pb^{2+}$  ions was noted in the form  $Pb(OH)_2$  after the pH value of 5.5. Similar biosorption trend about the lead biosorption by different biosorbents were previously reported by Göksungur and co-workers (Göksungur et al., 2005) and Vimala and Das (Vimala and Das, 2009).

### Effect of contact time

The effect of contact time on the biosorption of  $Pb^{2+}$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) on *G. fujikuroi* (ATCC 12616) was investigated at a constant temperature ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (Fig. 2).



**Fig. 2.** The effect of contact time on the  $Pb^{2+}$  biosorption by *G. fujikuroi*

It has been determined that rapid biosorption of  $Pb^{2+}$  ions was observed at initial at 10 min, respectively, and then the uptake of  $Pb^{2+}$  did not significantly change with contact time ( $p > 0.05$ ). This rapid initial uptake of

metal may be an important parameter for a practical application of biosorption in industrial wastewater treatment.

### Biosorption kinetic studies

In order to determine the kinetic parameters of Pb<sup>2+</sup> biosorption, was examined by using the Lagergren's pseudo-first-order (Lagergren, 1898) and the pseudo-second-order kinetic (Ho and McKay, 1998) models. These equations are given as:

The Lagergren pseudo-first-order kinetic model:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

The pseudo-second-order kinetic model:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (4)$$

In Eq. (3)  $q_e$  and  $q_t$  are the biosorption capacities of biomaterial at equilibrium, and time  $t$  (mg g<sup>-1</sup>), respectively.  $k_1$  is the rate constant for pseudo-first-order model (min<sup>-1</sup>). In Eq. (4)  $q_e$  (mg g<sup>-1</sup>) and  $k_2$  (g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) are the maximum biosorption capacity and the equilibrium rate constant for the pseudo-second-order model, respectively. The calculated parameters for these models are presented in Table 1.

Table 1. Kinetic parameters for the biosorption of Pb<sup>2+</sup> onto *G.fujikuroi*

Pseudo-first-order			Pseudo-second-order			
$k_1$	$q_e$	$R_1^2$	$k_2$	$q_e$	$h$	$R_2^2$
(dk <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> )		(g mg <sup>-1</sup> dk <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> )	(mg g <sup>-1</sup> dk <sup>-1</sup> )	
1.71x10 <sup>-2</sup>	2.82	0.289	1.11x10 <sup>-2</sup>	32.05	11.40	0.998

According to coefficients of determination values in Table 1, biosorption of Pb<sup>2+</sup> ions onto *G.fujikuroi* biomass was well predicted by the pseudo second order kinetic model.

### Effect of biosorbent dosage

Sorbent dose is considered as another important parameter affecting the sorptive removal process since it determines pollutant removal capacity of a biomaterial at a given pollutant concentration (Akar and Tunali, 2006). In order to investigate the effect of the biosorbent amount on the biosorption process of Pb<sup>2+</sup> *G.fujikuroi*, different amounts of biosorbent were contacted with Pb<sup>2+</sup> solutions at an initial metal concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. The dependence of the biosorption yield of *G.fujikuroi* to biosorbent dosage was plotted in Fig 3.

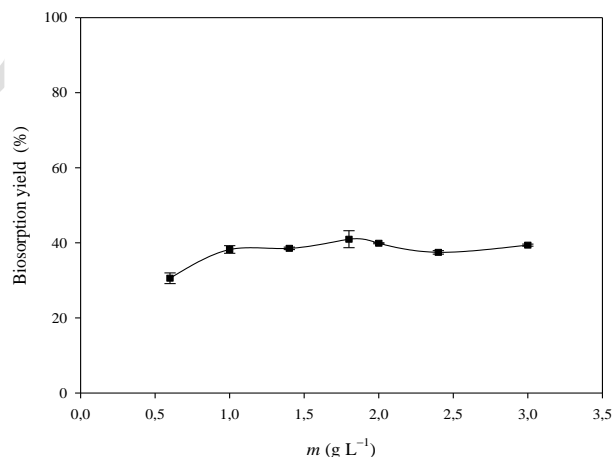


Fig. 3. Effect of sorbent amount on the sorption of Pb<sup>2+</sup>

As shown in Fig. 3, biosorption yield of *G. fujikuroi* increased with an increase in biomass dosage ( $p < 0.05$ ). Biosorption reached the maximum value at the biomass dosage of  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  and then nearly remained constant ( $p > 0.05$ ). These observations could be attributed to the increasing surface area and active binding sites on the biosorbent surface when the biosorbent amount increased biosorption yield (Akar et al., 2013a). Therefore,  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  of biomass was selected as the most efficient dosage for the maximum biosorption yield.

### Effect of initial $\text{Pb}^{2+}$ concentration

The initial  $\text{Pb}^{2+}$  concentration in the biosorption mixture remarkably influenced the equilibrium biosorption of  $\text{Pb}^{2+}$  (Fig. 4). The increase in biosorption capacity of fungal biosorbent up to equilibrium period with the increase in initial  $\text{Pb}^{2+}$  concentration can be attributed to higher availability of metal ions for bind to biosorbent. Moreover higher concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  leads to driving force to overcome mass transfer resistance between solid and aqueous phases (Vimala and Das, 2009).

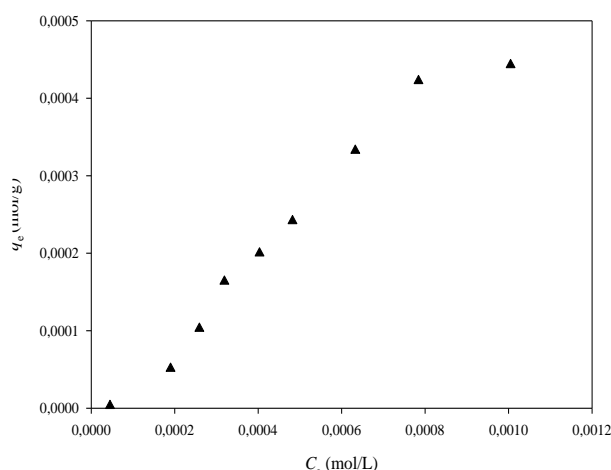


Fig. 4. General isotherm plot for the biosorption of  $\text{Pb}^{2+}$  by *G. fujikuroi*

### CONCLUSIONS

In this study, the removal of  $\text{Pb}^{2+}$  from the aqueous medium was achieved by a fungal biomass produced from *G. fujikuroi* cells. The biosorption process was affected by experimental conditions such as pH, initial metal ion concentration and contact time. Better sorption efficiencies were obtained for  $\text{Pb}^{2+}$  under weakly acidic conditions. The pH value of 5.0 and biosorbent amount of  $1.0 \text{ g L}^{-1}$  were selected for the optimum values of biosorptive removal process. Biosorption equilibrium was observed within 10 minutes. The equilibrium kinetic data were well described by Pseudo-second-order kinetic model indicated that the chemisorption played a role in the sorption of  $\text{Pb}^{2+}$  onto *G. fujikuroi*. The results indicated that *G. fujikuroi* may be used as an inexpensive, effective and easily cultivable biosorbent for the removal of  $\text{Pb}^{2+}$  ions from aqueous solutions.

### REFERENCES

- Akar T, Balk Yetimoğlu Y., Tuna O, Tunalı Akar S 2013a. Characterization and application of plant-based magnetic biomaterial for batch and fixed-bed mode sequestration of lead from synthetic and real effluents. *Ecological Engineering*, 61: 251-257.
- Akar T, Çelik S, Görgülü Arı A, Tunalı Akar 2013b. Removal of  $\text{Pb}^{2+}$  ions from contaminated solutions by microbial composite: Combined action of a soilborne fungus *Mucor plumbeus* and alunite matrix. *Chemical Engineering Journal*, 215-216: 626-634.
- Arief VO, Trielstari K, Sunarso J, Indraswati N, Ismadji Z, 2008. Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: characterization, biosorption parameters and mechanism studies. *Clean*, 36 (12): 937-962.
- Akar T, Tunalı Akar S, 2006. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of  $\text{Pb(II)}$  and  $\text{Cu(II)}$  ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology* 97(15): 1780-1787.
- de Oliveira BH, Packer JF, Chimelli M, de Jesus DA 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, 131: 92-96.

- Fomina M, Gadd GM 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160:3-14.
- Göksungur Y, Üren S, Güvenç U 2009. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. *Bioresource Technology*, 96: 103-109.
- Ho YS, McKay G 1998. Kinetic Models for the sorption of dye from aqueous solution by wood. *Process Safety and Environmental Protection*, 76:183-191.
- Lagergren S, 1889. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 24: 1–39.
- Park D, Yun YS, Park JM, 2010. The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15: 86-102.
- Vimala R, Das N 2009. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 376-382.
- Volesky B, Holan ZR 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11: p. 235-250.
- Yinta L, Song S, Xia L, Yin H, Meza JVG, Ju W 2019. Enhanced Pb(II) removal by algal-based biosorbent cultivated in high-phosphorus cultures. *Chemical Engineering Journal*. 361: p. 167-179.

## Biosorptive removal of cadmium from aqueous solutions by the biomaterial prepared from *Neurospora sitophila* cells

Tamer AKAR<sup>1</sup>, Büşra Nur PEHLİVAN<sup>2,\*</sup>, Sema ÇELİK<sup>1</sup>, Sibel TUNALI AKAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Arts and Science, Department of Chemistry, 26480, Eskisehir, Turkey.

<sup>2\*</sup> Eskisehir Osmangazi University, Graduate School of Natural and Applied Science, Department of Chemistry, 26480, Eskisehir, Turkey.

Corresponding author e-mail: bsrnrphlvn@gmail.com

### Abstract

Pollution of water sources by heavy metals is a problem of global concern given their environmental impacts and potential toxicities. A significant increase has been noted in the researches related to preparing efficient and alternative materials for the treatment of metal contaminated effluents. Our study was aimed of determining the Cd<sup>□□</sup> biosorption potential of *Neurospora sitophila* (*N. sitophila*) as an easily cultivated fungal strain. Biosorption potential of *N. sitophila* was investigated with respect to initial pH (1.0–8.0), contact time (5–90 min), biosorbent dosage (1.0–7.0 g L<sup>□□</sup>) and initial metal ion concentration (10–250 mg L<sup>□□</sup>). The biosorption yield of *N. sitophila* biomass reached up to 80% with the biosorbent amount of 5.0 g L<sup>□□</sup>. At the optimum pH (6.0) the cadmium biosorption reached to equilibrium within short time (15 min) and equilibrium data was well described by the Langmuir isotherm model. The findings of batch mode biosorption experiments imply that the suggested biomaterial may find promising applications for the removal of cadmium contamination from aquatic environment.

**Keywords:** Biosorptive treatment, Batch process, Cadmium, *Neurospora sitophila*.

### INTRODUCTION

Heavy metals are extremely toxic and non-biodegradable pollutants. They also accumulate in the food chain. The presence heavy metals in water or soil even at low concentrations can pose a risk for living systems (Chen et al., 2019). Cadmium is an extremely toxic heavy metal. The Cd<sup>□□</sup> in the human body is that causes emphysema and itai-itai disease, kidney disorder and damage, high blood pressure, bone fraction and destruction of red blood cells (Dujaili et al., 2012). The removal of heavy metals like cadmium from contaminated waters is one of the most important research areas. There are several industrial sources of Cd<sup>□□</sup> ions that cause pollution of the environment including metal coating, cadmium-nickel batteries, phosphate fertilizers, mining, pigments, stabilizers, metallurgy, ceramics, photography, textile, printing, lead mining, sewage sludge, alkaline batteries and electroplating (Ossman and Mansour, 2013; Patterson, 1997).

To minimize environmental impacts of metals wastewater treatment is mandatory. Treatment methods aims to eliminate toxic substances before they are released into the environment (Butter et al., 1998). Traditional treatment methods are usually expensive methods, which often do not provide sufficient efficiency in the removal of pollutants. In addition, significant disadvantages such as high energy and reactive requirement and need, toxic sludge production limits the widespread use of these methods. Therefore, the need for environmentally friendly, cost-effective and clean technologies to remove toxic metal ions from contaminated waters is rapidly increasing (Akar et al., 2017; Azimi et al., 2017). Biosorption process in this field provides potential alternative overcome the disadvantages of conventional methods (Bulgariu and Bulgariu, 2014) In the literature, a large number of biomass are presented as promising candidates for the biosorption of various metal species. For example, fungal cultures that can capture metal ions due to the diversity of functional groups present in cell walls, such as carboxylic groups, hydroxyls, amines, phosphates (Nascimento et al., 2019). Using fungal cultures as biosorbents for heavy metals offers a potential alternative to available methods for detoxification and recovery of pollutants from industrial wastewaters (Aksu, 2001). Different fungal cultures used for the removal of Cd<sup>□□</sup> in the literature are *Rhizopus cohnii* (Luo et al., 2010), *Aspergillus niger* (Kapoor et al., 1999), *Trametes versicolor* (Lorenzo et al., 2006), *Rhizopus arrhizus* (Fourest et al., 1994, Ahmad et al., 2005), *Trichoderma atroviride* (Mohsenzadeh and Shahrokh, 2014), *Absidia cylindrospora* (Albert et al., 2018) and *Phanerochaete chrysosporium* (Lorenzo et al., 2006).

The objective of the present study was to investigate the Cd<sup>2+</sup> biosorption characteristics of biomass produced from *Neurospora sitophila* cells in batch mode. Experiments were carried out to determine the effect of pH, biomass dosage, contact time and initial Cd<sup>2+</sup> concentration on the biosorption process. Equilibrium data were evaluated by different isotherm models.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of the biomass

*N. sitophila* (ATCC 36 935) was routinely maintained at 4 °C on potato dextrose agar (PDA) solid medium. Fungal cells were first grown on PDA slants for 7 days at 26 °C. A medium for growing *N. sitophila* was prepared by mixing glucose (10 g), yeast extract (2 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.47 g), urea (0.86), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.714 g), MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0.2 g), CaCl<sub>2</sub> (0.2 g), FeCl<sub>3</sub> (3.2 mg), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (4.4 mg), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.78 mg) and MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0.144 mg) (Shojaosadati et al., 1999). The pH of the growth medium was adjusted to 5.5 by the addition of 1 M HCl before autoclaving at 121 °C for at least 20 min. Erlenmeyer flasks containing the above media (100 mL) were inoculated with spore suspension (1 mL) obtained shaking sterile water (10 mL) with a mature slope of *N. sitophila*, under sterile conditions. Growth was allowed to proceed for 7 days at 25 °C on a rotary shaker operating at 120 rpm. After the fungal growth, the biomass and the culture medium were separated by filtration, and the resulting biomass was washed several times thoroughly with distilled water. The biomass was dried at 80 °C for 24h. The dried biomass was ground and sieved to obtain uniform particle sizes of less than 150 µm. The resulting biosorbent material was stored in glass bottles.

### Preparation of Cd(II) stock solutions

Stock solution of 1000 mg L<sup>-1</sup> of Cd<sup>2+</sup> used in this study was prepared from cadmium nitrate [Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O], using deionized water. Other concentrations were obtained from this stock solution by dilution. Before mixing the biosorbent, the pH of each test solution was adjusted to the required value with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl.

### Batch biosorption studies

Batch mode equilibrium biosorption experiments were performed in a series of 100 mL beakers with a sample volume of 50 mL. The biosorption mixture was stirred using a magnetic stirrer at 200 rpm.

At the end of each work, biosorbent samples were separated from the biosorption medium by centrifugation at 4500 rpm for 5 min and supernatant was analyzed for the residual Cd<sup>2+</sup> concentration. The following equations were used for calculating the biosorption capacity and yield;

$$q_e = \frac{V(C_i - C_e)}{m} \quad (1)$$

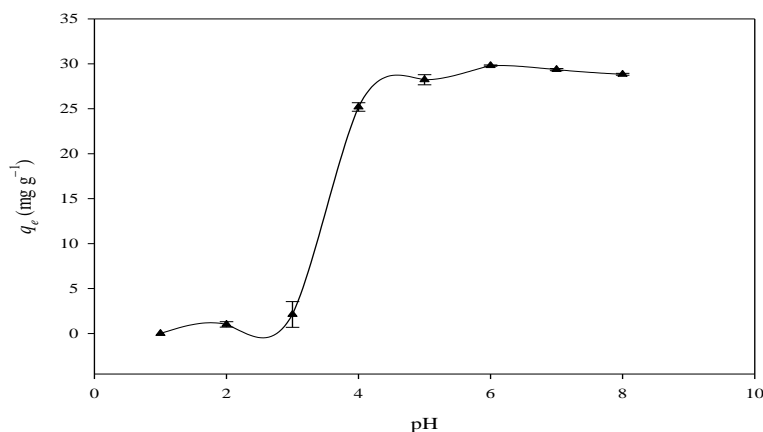
$$w(\%) = \frac{(C_i - C_e)}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

where  $C_i$  and  $C_e$  are the initial and the equilibrium concentrations of Cd<sup>2+</sup> ion in the solutions (mg L<sup>-1</sup>), respectively.  $V$  is the solution volume (L) and  $m$  is the amount of the biosorbent sample (g).

## RESULTS and DISCUSSION

### Effect of pH on Cd<sup>2+</sup> biosorption

The initial pH of the biosorption medium has been identified as the most important parameter governing Cd<sup>2+</sup> biosorption onto the surface of biosorbent materials. The changes in biosorption capacity of the biosorbent material as a function of initial pH are plotted in Fig. 1.

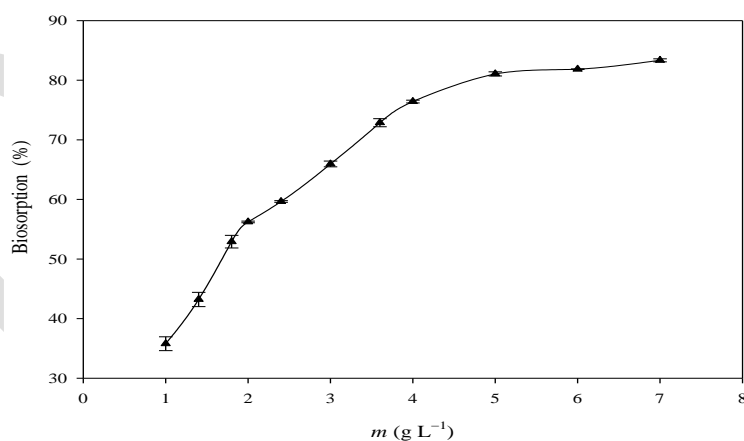


**Figure 1.** Effect of solution pH on the biosorption capacity of Cd<sup>2+</sup> by *N. sitophila*

As shown in this figure biosorption capacity of *N. sitophila* for Cd<sup>2+</sup> ions increased with increasing pH from 2.0 to 5.0. There is no further increase in the biosorption capacity of biomass was observed from this point. The biosorption capacities of biosorbents depend on the available binding sites provided by the functional groups existing on the surface of the biosorbents. Such sites were protonated at highly acidic conditions and lower biosorption capacities were observed as a result of electrostatic repulsive forces between metal cations. With the acidity decreasing in the solution, attraction forces between negative charge on biomass and positive metal cations are increased due to deprotonation of functional groups. These attraction forces facilitate the biosorption of metal cations on to binding sites of biosorbent.

#### Effect of initial biomass dosage on Cd<sup>2+</sup> biosorption

Biosorbent dose is considered as another important parameter affecting the biosorptive removal process since it determines the removal capacity of a biomaterial at a given pollutant concentration. The lower biomass dosage was more feasible it would be to use. The dependence of Cd<sup>2+</sup> sorption on sorbent material dose was studied by varying the amount of *N. sitophila* sorbent sample from 1.0 to 7.0 g L<sup>-1</sup> (Fig. 2).



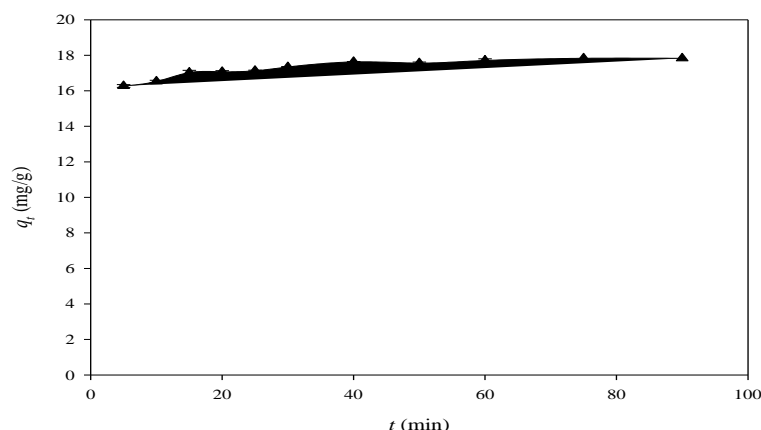
**Figure 2.** Effect of biosorbent dosage on the biosorption of Cd<sup>2+</sup>.

Fig. 2 showed that Cd<sup>2+</sup> removal yields of *N. sitophila* were increased with elevated amounts of the sorbent dose and almost became constant at 5.0 g L<sup>-1</sup>. The stable biosorption observed after a certain amount of biosorbent is related to the absence of free contaminant to be bound to the functional groups of the biosorbent in the studied constant concentration. The biosorption yield of biomass in this point was higher than 80%.



### Effect of contact time on Cd<sup>2+</sup> biosorption

The effect of contact time on the Cd<sup>2+</sup> biosorption of *N. sitophila* is given Fig. 3.



**Figure 3.** Effect of contact time on the biosorption of Cd<sup>2+</sup> by of *N. Sitophila*

The biosorption of Cd<sup>2+</sup> ion increased considerably until the equilibrium time (15 min). Further increase in contact time did not change the biosorption capacity of biomass. So, the optimum contact time was selected as 15 min for further experiments. This short equilibrium time observed in the biosorption process is an important advantage for the wide scale application of the proposed biosorbent.

### Biosorption isotherms

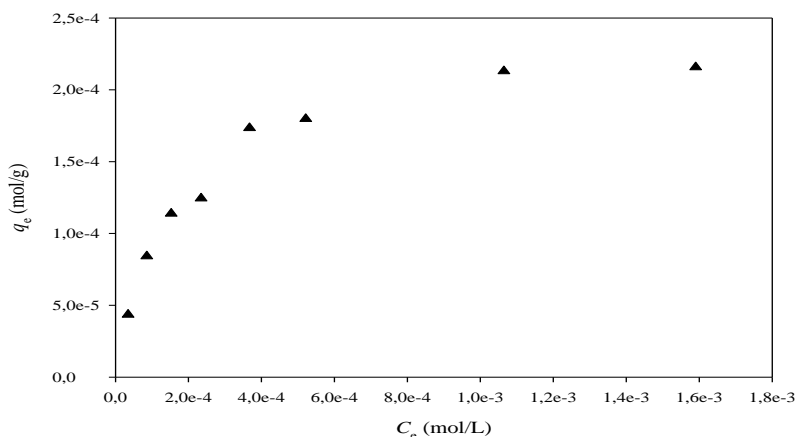
Equilibrium isotherms provide important parameters for the design and analysis of biosorption systems. In this study, experimental data were analyzed using Freundlich (Freundlich, 1906), Langmuir (Langmuir, 1916) and D-R (Dubinin and Radushkevich, 1947) isotherm models to determine the applicability of Cd<sup>2+</sup> biosorption. Freundlich, Langmuir and D-R isotherm models equations can be expressed in the following linear forms;

$$\text{Freundlich} \quad \ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad (3)$$

$$\text{Langmuir} \quad \frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\max}} + \left( \frac{1}{q_{\max} K_L} \right) \frac{1}{C_e} \quad (4)$$

$$\text{D-R} \quad \ln q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad (5)$$

Where  $q_e$  is the equilibrium biosorption capacity (mol g<sup>-1</sup>) and  $C_e$  is the residual Cd<sup>2+</sup> concentration in solution (mol L<sup>-1</sup>),  $q_{\max}$  is the maximum monolayer biosorption capacity (mol g<sup>-1</sup>),  $K_L$  is the Langmuir constant (L mg<sup>-1</sup>).  $K_F$  (L g<sup>-1</sup>) and  $n$  (dimensionless) are the Freundlich constants, respectively.  $\varepsilon$  (Polanyi potential) is determined by  $\varepsilon = RT(1+1/C_e) \cdot \beta$  (mol<sup>2</sup> kJ<sup>-1</sup>) is a constant and used for the calculation of mean biosorption energy (E) ( $E = 1/(2\beta)^{1/2}$ ). Fig. 4 shows the general equilibrium isotherm plot for the biosorption of Cd<sup>2+</sup> onto *Neurospora sitophila*. The calculated parameters for these models are presented in Table 1.



**Figure 4.** General isotherm plot for the biosorption Cd<sup>2+</sup> ions on to *N. sitophila* biomass

The  $R^2$  values in Table 1 equilibrium showed that the data for the biosorption of Cd<sup>2+</sup> on to *N. sitophila* were better suited to the Langmuir model.

**Table 1.** Isotherm parameters of Cd<sup>2+</sup> biosorption on *N. sitophila*

Langmuir			Freundlich			Dubinin-Radushkevich (D-R)			
$q_{max}$ (mol g <sup>-1</sup> )	$K_L$ (L mol <sup>-1</sup> )	$r_L^2$	$n$	KF (L g <sup>-n</sup> )	$r_F^2$	$q_{max}$ (mol g <sup>-1</sup> )	$\beta$ (mol <sup>2</sup> kJ <sup>-1</sup> )	$r_{D-R}^2$	E (kJ mol <sup>-1</sup> )
2.27x10 <sup>3</sup>	6.84x10 <sup>3</sup>	0.996	2.43	3.75x10 <sup>3</sup>	0.927	7.19x10 <sup>3</sup>	2.02x10 <sup>3</sup>	0.958	15.73

The fact that the Langmuir isotherm fits the experimental data very well may be due to homogeneous distribution of active sites onto biosorbent surface, since the Langmuir equation assumes that the surface is homogeneous. Accordingly, the biosorption capacity of Cd<sup>2+</sup> ions on the *N. sitophila* biosorbent was found to be 2.27x10<sup>3</sup> mol g<sup>-1</sup>.

## CONCLUSION

This study showed that *N. sitophila* can be used effectively as a biosorbent for the removal of Cd<sup>2+</sup> from aqueous solutions. The pH, biomass dose and contact time significantly affected the biosorption performance of *N. sitophila*. Biosorption equilibrium was established within 15 minutes. The appropriateness of the Langmuir model to the equilibrium data suggest the monolayer coverage of the Cd<sup>2+</sup> ions on to surfaces of *N. sitophila*.

## Acknowledgement

This study was financially supported by the commission of Scientific Research Projects of Eskisehir Osmangazi University with the project number 200819007.

## REFERENCES

- Akar ST, Şölener M, Akar T, Çelik S 2017. Anionically reinforced hydrogel network entrapped fungal cells for retention of cadmium in the contaminated aquatic media. *Journal of Environmental Management*, 204(1): 583-593.
- Aksu Z, 2001. Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature. *Separation and Purification Technology*, 21(3): 285-294.
- Albert Q, Leleyter L, Lemoine M, Heutte N, Rioult JP, Sage L, Baraud F, Garon D 2018. Comparison of tolerance and biosorption of three trace metals (Cd, Cu, Pb) by the soil fungus *Absidia cylindrospora*. *Chemosphere*, 196: 386-392.

- Azimi A, Azari A, Rezakazemi M, Ansarpour M 2017. Removal of heavy metals from industrial wastewaters: a review. *Chem Bio Eng Reviews*, 4: 37–59.
- Bulgariu L, Bulgariu D 2014. Enhancing biosorption characteristics of marine green algae (*Ulva lactuca*) for heavy metals removal by alkaline treatment. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4: 1–8.
- Butter TJ, Evison LM, Hancock IC, Holland FS, Matis KA, Philipson A, Sheikh AI, Zouboulis AI 1998. The removal and recovery of cadmium from dilute aqueous solutions by biosorption and electrolysis at laboratory scale. *Water Research*, 32(2): 400-406.
- Chen Z, Zhang J, Huang L, Yuan Z, Li Z, Liu M 2019. Removal of Cd and Pb with biochar made from dairy manure at low temperature. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(1): 201-210.
- Dubin M, Radushkevich L 1947. Equation of the characteristic curve of activated charcoal. *Chem. Zentr*, 1(1):, 875.
- Dujaili AH, Awwad AM, Salem NM 2012. Biosorption of cadmium (II) onto loquat leaves (*Eriobotrya japonica*) and their ash from aqueous solution, equilibrium, kinetics, and thermodynamic studies. *International Journal of Industrial Chemistry*, 3(1):1-7.
- Freundlich H 1906. Over the adsorption in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 57, 385-471.
- Fourest E, Canal C, Roux JC 1994. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4): 325-332.
- Kapoor A, Viraraghavan T, Cullimore DR 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 70(1): 5-104.
- Langmuir I 1916. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11): 2221–2295.
- Lorenzo M, Moldes D, Sanromán 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*, 63(6): 912-917.
- Luo J, Xiao X, Luo S, 2010. Biosorption of cadmium(II) from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 20(6): 1104-1111.
- Mohsenzadeh F, Shahrokhi F 2014. Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12:102.
- Nascimento JM, Oliveria JD, Rizzo ACL, Leite SGF 2019. Biosorption Cu (II) by the yeast *Saccharomyces cerevisia*. *Biotechnology Reports*, 21: 00315.
- Ossman ME, Mansour MS 2013. Removal of Cd(II) ion from wastewater by adsorption onto treated old newspaper: kinetic modeling and isotherm studies. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(13): 1-7.
- Patterson JW 1997. *Industrial waste water treatment technology*. Science Publishers, New York.
- Shojaosadati SA, Faraidouni R, Madadi-Nouei AM, Mohamadpour I 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Resources, Conservation and Recycling*, 27(1-2): 73-87.
- Zhao M, Zhang C, Zeng G, Cheng M, Liu Y 2016. A combined biological removal of Cd<sup>2+</sup> from aqueous solutions using *Phanerochaete chrysosporium* and rice straw. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130: 87-92.

## Kayın-kestane karışık ormanlarında yaprak ayrışmasının uzun süreli değişimi

Şule Temür\*, Murat Sargıncı

Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Düzce, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: muratsarginci@duzce.edu.tr

### Özet

Bu çalışmanın amacı Batı Karadeniz Düzce-Akçakoca bölgesi kayın ve kestane ormanlarındaki yaprak ölü-örtüsünün ayrışmasının uzun vadeli (4 yıl) değişiminin belirlenmesidir. İklimsel olarak Batı Karadeniz kıyı kesimini temsil eden sahada farklı yükselti ve bakıdaki kayın ve kestane ormanlarında yaprak ölü-örtüsü ayrışmasına ilişkin veriler toplanarak, bu parametrelerin açıklanmasında etkili olan değişkenler belirlenmiştir. Örnekleme alanları doğu ve batı olmak üzere iki farklı bakıda 420-1050m yükselti arasında 4 farklı yükselti basamağında seçilmiştir. Bu sahalarda toprak pH'ı 4,5-6,5 arasında değişmekte olup, ağırlıklı olarak balçık ve killi balçık özellikleri göstermekte ve USDA toprak sınıflandırma sistemine göre Inceptisol topraklar arasında yer almaktadır. Ormanlarda tepe tacı kapallığı %75 ve üzerindedir. Her yükselti basamağında 3 örnekleme noktası seçilmiştir. Her bir meşçerede 20\*20= 400 m<sup>2</sup>'lik bir alanda ölü-örtü ayrışma oranının belirlenebilmesi amacıyla mineral toprak üzerine yerleştirilen kapaklarla toplanmış ölü-örtü örneklerini içeren keseler toplanarak laboratuara getirilip kütle kaybı hesaplanmıştır. Buna göre 4. yılsonunda kestane sahalarda toplam kütlenin %30'unun, kayın sahalarda ise %40'ının geriye kaldığı bulunmuştur. Aynı periyotta bakılar arasında sadece kayın sahalarda doğu ve batı bakı arasında farklılık görülürken, kestane sahalarda doğu ve batı bakı arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Kayında dördüncü yılsonundaki yüzde kalan kütle miktarları yükselti basamakları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterirken, kestanede böyle bir durum oluşmamıştır. Dördüncü yılsonu karbon ve azot oranları türler arası farklılıklar göstermemiştir. Bütün bu veriler ayrışmanın türler arasında farklılık gösterdiği gibi, farklı yükselti ve bakılarda aynı tür içerisinde de farklılıklar oluşabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla ayrışmanın hem organik materyalin kimyasal özelliklerine bağlı olarak hem de çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlikler gösterebileceği ortaya çıkmaktadır. Bu durum benzer ekosistemlerin yönetim süreçlerinde alınacak olan uzun vadeli kararlarda etkili bir karar destek mekanizması olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kayın, Kestane, Ayrışma, Karadeniz.

### Long-term Changes of leaf Litter Decomposition in Beech-Chestnut Mixed Forests

#### Abstract

The aim of this study is to determine the long-term (4-year) change of the decomposition of leaf litter in beech and chestnut forests of Düzce-Akçakoca region of Western Black Sea Region. Data about leaf litter decomposition from different elevations and aspects in beech and chestnut forests where represents the coastal part of the Black Sea, were collected in order to define the parameters explain these variations. The sampling areas were chosen in 4 different elevations between 420-1050m within two aspects, east and west. The soil pH varies among 4.5-6.5 and shows predominantly loam and clay loam properties and is among the Inceptisol soils according to the USDA soil classification system. The crown cover in the forests is 75% and above. Three sampling plots at each elevation stage were selected. In order to determine the leaf-litter decomposition rate, litterbags containing leaf-litter samples collected with litter-traps placed on mineral soil were collected in an area of 20x20=400m<sup>2</sup> and carried to laboratory to calculate mass loss. According to this, 30% 33% of the total mass of chestnut and beech leaves were found to be left behind at the end of 4th year, respectively. In the same period, there was a difference between eastern and western aspects only in beech stands, while there was no for chestnut stands. The percentage of mass remaining at the end of the fourth year for the beech leaves showed a statistically significant difference between the elevation stages, while there were for chestnut leaves. At the end of the fourth year, the carbon and nitrogen ratios did not differ between species. All these data show that decomposition can vary between species and also among different aspects and elevations. Therefore, it can be seen that the decomposition can vary depending on the chemical properties of the organic material and also depending on the environmental conditions. This can be used as an effective decision support mechanism in long-term decisions to be taken in the management processes of similar ecosystems.

**Keywords:** Beech, Chestnut, Decomposition, Blacksea.

## GİRİŞ

Ormanlar iklim değişikliğiyle mücadelede önemli bir karbon havuzu oluşturmanın yanı sıra, toplumun orman ürünlerine olan ihtiyacını karşılama, toprağın korunması, su rejiminin düzenlenmesi, iklim, halk sağlığı, rekreasyon, yaban hayatı, yurt savunması gibi sosyo-kültürel nitelikte olması sebebiyle de farklı sektörlerce yerine getirilmesi mümkün olmayan bunun yanı sıra kendi içinde bir bütünü teşkil eden faaliyetler bütünü de oluşturmaktadır.

Ormandaki organik maddenin büyük bir kısmı toprak yüzeyinde bulunur ve bu yüzey orman ekosistemlerinde genellikle kozalak, ince dal, kabuk, yaprak ve organizma artıkları ile örtülmüş durumdadır. Ölmüş bitki artıkları, toprak organizmaları ve bitki kökleri vb. materyaller ölü örtüsü olarak adlandırılmaktadır (Kasırga, 2015). Ekosistemin en önemli besin maddesi kaynağı olan ölü örtünün ayrışmasıyla; bitkiler tarafından topraktan alınan besin maddeleri yaprak dökülmesiyle tekrar toprağa ulaşır (Tolunay vd. 2012). Ölü-örtü mikroorganizmalar tarafından ayrıştırılarak humusa dönüştürülüp suyu tutar ve toprağa gözeneklilik sağlar. Ayrıca ölü-örtü organik karbonun tutulduğu en önemli havuzlardandır [10]. Ölü örtü ayrışması, karasal ekosistemlerde besin döngüsünün başladığı ve bittiği yer olarak kabul edilir bununla birlikte karbon ve besin döngüsünde anahtar rol oynamaktadır (Çakır, 2013). Bitki artıkları toprak hayvanlarının ve mikroorganizmaların besin kaynağını sağlarlarken bir yandan da ayrıştırılır. Ayrışma oksidatif ayrışma (minerilizasyon) ve humuslaşma evresi olmak üzere 2 aşamada gerçekleşir (Dündar, 1987).

Ölü-örtü ayrışmasının takip edilmesi ve ayrışma sonucu meydana gelen kütle kaybının hesaplanabilmesi için birçok yöntem kullanılmış ancak bu yöntemler içerisinde en yaygın olarak kullanılan ölü-örtü kesesi yöntemi olmuştur. Bu yöntem ilk kez İngiltere’de yaprak döken ormanların ölü-örtü ayrışmasını takip etmek için yapılan çalışmada kullanılmış ve daha sonraki yıllarda da karasal ekosistemlerdeki ölü-örtü ayrışmasını hesaplamak için öne çıkmış en etkin yöntem olarak kabul edilmiştir (Bocock ve Gilbert, 1957).

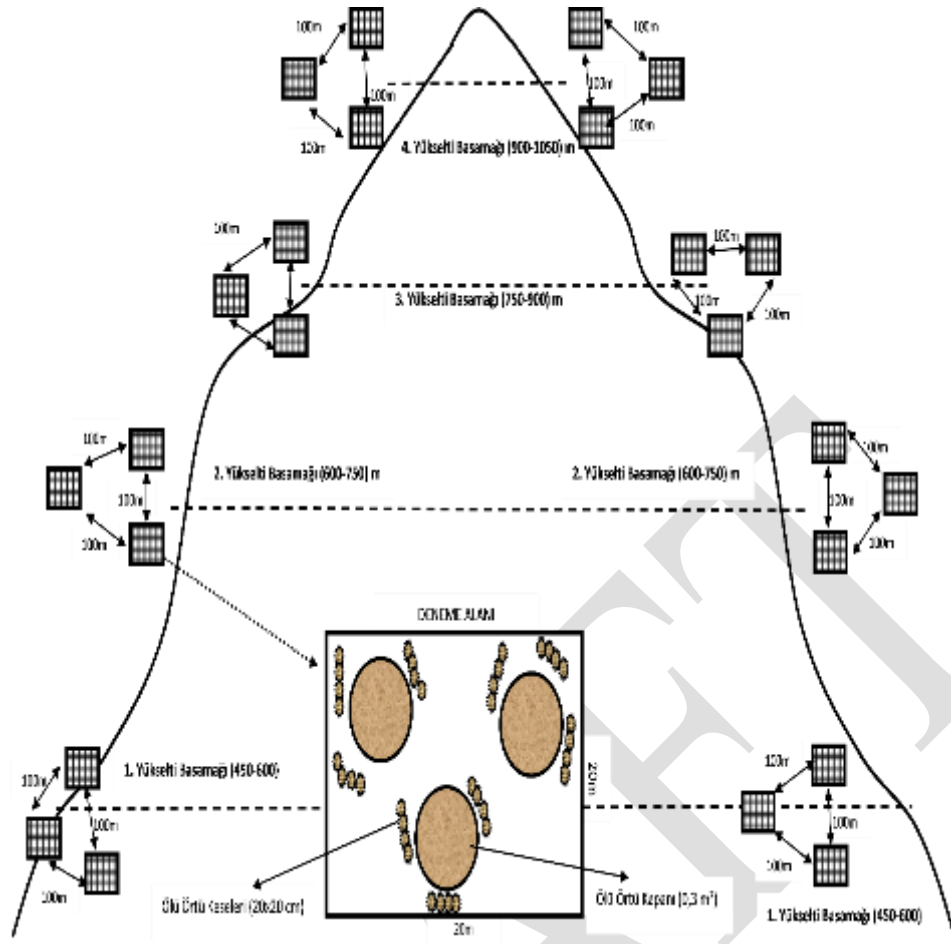
Karadeniz Bölgesi iklim bakımından Doğu-, Orta- ve Batı Karadeniz iklim tipi olarak üç ana iklim tipine ayrılmaktadır (Özyuvacı 1999). Bu çalışmada, Batı Karadeniz iklim tipinde yer alan Düzce kıyı bölgesinde yayılış gösteren doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky) ve Anadolu kestanesi (*Castanea sativa* Mill.) orman alanlarındaki ölü örtü ayrışması incelenmiştir. Dolayısıyla çalışmanın amacı, Batı Karadeniz iklim tipi içerisinde Düzce-kıyı kesiminde farklı yükselti ve bakıldaki kayın ve kestane orman alanlarında bulunan ölü örtü ayrışmasının uzun süreli değişimini belirlemektir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma sahaları Batı Karadeniz iklim tipi içerisinde yer alan sahil kesimini temsilen doğu kayını ve Anadolu kestanesinin yayılış gösterdiği Bolu Orman Bölge Müdürlüğüne Bağlı Akçakoca İşletme Müdürlüğü, Deredibi Orman İşletme Şefliği’ndeki Kaplandede dağ kesitinden seçilmiştir. Ormanlar yaklaşık 150 metre yükseltiden başlayıp 1100 metreye kadar çıkabilmektedir. Amenajman planlarından yararlanılarak oluşturulan verilere göre doğu kayını Anadolu kestanesi karışık ormanında kestane karışıma %25 ile %35 arasında katılmaktadır. Sargıncı (2014) doktora tezi kapsamında yapılan analizler neticesinde bölge topraklarının balçık toprak özelliği gösterdiği ve yine yapılan fiziksel analiz sonuçlarına göre toprağın reaksiyonu (pH) 4,5-6,5 arasında değişiklik gösterdiği ve toprağın asidik toprak özelliğinde olduğunu bildirmiştir. Devamında yapılan bir diğer analiz olan Toprağın Katyon Değişim Kapasitesi (KDK) üst toprakta (0-20 cm) yaklaşık 30 Cmolc kg<sup>-1</sup>, alt toprakta (20-50 cm) ise 15-20 Cmolc kg<sup>-1</sup> olarak ölçülmüştür. Çalışma sahası toprakları USDA toprak sınıflandırma sistemine göre Inceptisol toprak sırasının Typic Haplumbrepts alt sınıfında sınıflandırılırken, eski Avrupa ve Amerika sınıflandırmasına göre asit kahverengi orman toprakları olarak adlandırılmaktadır (Sargıncı, 2014).

Araştırma sahaları Avrupa-Sibirya (Euro-Siberian) flora bölgesinin Öksin (Euxin) kuşağında yer almaktadır (Anşin, 1983; Atalay, 1994). Bölge içerisinde bulunan 5283,3 ha ormanlık alanın %40’a yakını doğu kayını (*Fagus orientalis* Lipsky) ve %60’ı ise doğu kayını-Anadolu kestanesi (*Castanea sativa* Mill.) ve diğer yapraklı türlerin karışımı oluşturmaktadır.

Çalışma alanı Batı Karadeniz iklim tipi içerisinde yer alan sahil kesimini temsilen Akçakoca-Kaplandede dağ kesitinden seçilmiştir. Çalışma sahalarından alınan örnekler tam kapalı (% 71-100 kapalılığa sahip) “c (Ø= 20-35,9 cm)” ve “d (Ø= 36-51,9 cm)” çağlarından oluşan kayın kestane karışık ormanlarından (KnKscd3) seçilmiştir. Örnekleme alanı olarak seçilen 20 x 20 = 400 m<sup>2</sup> büyüklüğündeki çalışma sahası 2010 yılı eylül ayı başlarında, iki bakı ve dört yükselti basamağında kayın ve kestanenin yayılış gösterdiği yerlerde oluşturulmuştur (Çizelge 2.1). Örnekleme alanları her bir yükselti basamağında kayın sahalarını temsilen kayının yoğun olduğu ve kestane sahalarını temsilen de kestanenin yoğun olduğu (grup oluşturduğu) yerlerden 3’er tekrarlı alınarak ve örnekleme alanları araları en az 100 m mesafe olacak şekilde doğu ve batı bakıları doğrultusunda 4 yükselti basamağında kurulmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Akçakoca Deredibi Orman İşletme Şefliği'ndeki Kaplandede dağ kesitinde iki farklı bakı (doğu, batı) ve dört yükselti basamağına kurulan örnek alanları [29].

Ayrışma deneylerinin yapılabilmesi için, 1 mm'lik gözenekleri olan fiberglas sinek telleri kullanılarak hazırlanan, 20 x 25 cm boyutlarında ölü örtü keselerinin içine hava kurusu hale getirilen ölü örtü yaprak örneklerinden 5'er gram yerleştirilmiştir. Hazırlanan keseler 2011 Nisan ayı içerisinde, 5 zaman periyodunda (3. ay sonu, 6. ay sonu, 1. yılsonu, 2. yılsonu ve 4. yılsonu) toplanmak ve 3 tekrarlı olmak üzere, sahada orman zemininde ölü örtü ve mineral toprak arasına yerleştirilmiştir. Temmuz 2015 toplanan örneklerin laboratuvara taşınması sırasında ufalanmış ölü örtü örneklerinin keselerin gözeneklerinden düşerek kaybolmasını önlemek amacıyla toplanan örnekler kilitli naylon poşetler içerisine yerleştirilerek taşınmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler kilitli poşetlerden çıkarılarak keselerin dış yüzeyine yapışmış toprak, yosun vb. materyaller yumuşak uçlu fırça yardımıyla temizlenmiş ve hava kurusu hale sağlanmıştır.

Hava kurusu hale gelmiş olan örnekler kese kâğıtlarına konarak kurutma fırınında 65 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulup ve tartılarak kuru madde oranları belirlenmiştir. Kuruyan örnekler daha sonra kahve öğütücülerinde öğütülüp toz halinde analizlere hazır hale getirilmiştir. Öğütülen ölü örtü örneklerinden alt örnekler alınarak kül fırınında 550 °C de 3 saat yakılarak kül miktarları belirlenmiş ardından bütün kütle hesapları kül dışı ağırlık olarak belirlenmiştir [56]. Ölü örtüde gerçekleşen kütle kaybı oranları her bir dönem sonunda kalan kütle başlangıçtaki kütleyle bölünmesi ile bulunmuş ve daha sonra basit üssel ayrışma modeli için kullanılan denklemler (denklem 1, denklem 2)'de bu oranlar kullanılarak ölü örtü ayrışma katsayısı olan "k" değerleri hesaplanmıştır [57], [58].

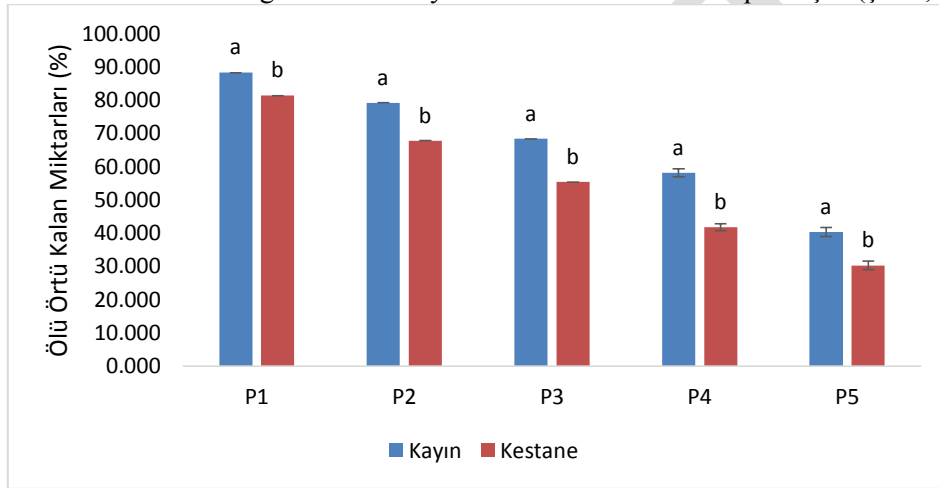
$$Mt = Moe^{-kt} \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{Mt}{Mo}\right) = -k \quad (2)$$

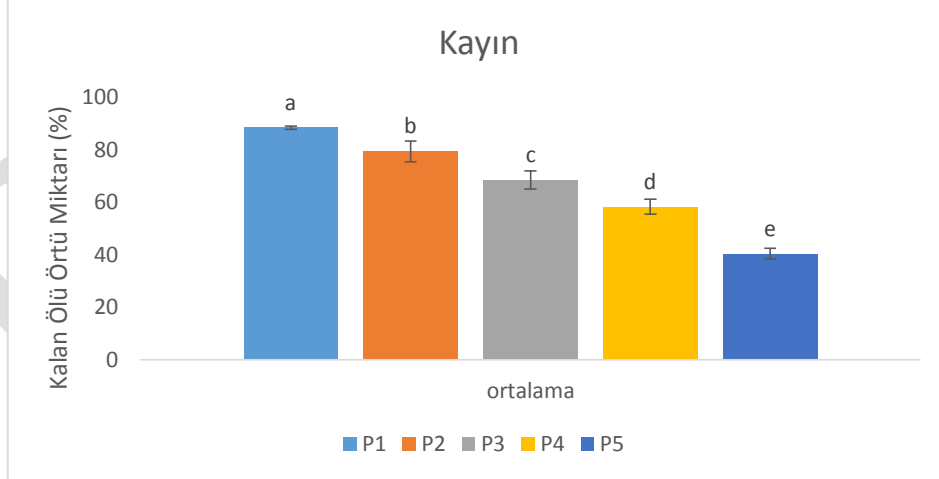
Değişkenler arasındaki ilişkilere örnekleme desenine uygun olarak varyans analizi (ANOVA) uygulanarak bakılmıştır. Ayrışma deneylerinde regresyon analizleriyle hesaplanan ayrışma katsayısı sabiti "k" değerleri periyodlar arasındaki ilişkileri tekrarlı ölçüm analizi kullanılarak incelenmiştir. İstatistiki olarak önemli farklılıklar bulunan değişkenler için ortalamaları ayırma işlemi olarak Tukey'in HSD testi  $\alpha = 0.05$  güven düzeyinde uygulanmıştır. Bütün istatistiki analizler için SAS [65] programını uygulanmış ve sonuçların  $P < 0,05$  güven düzeyinde istatistiki olarak önemli olduğu kabul edilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

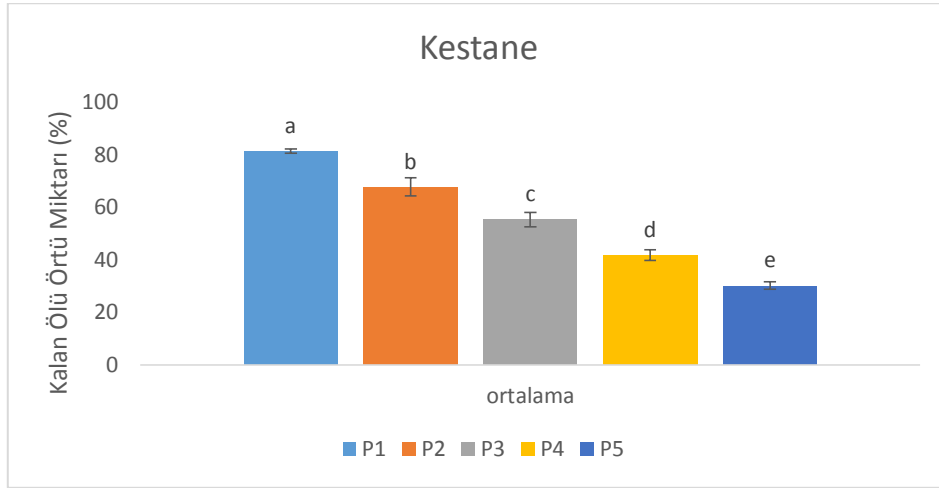
Yapılan istatistiki analiz sonucu ayrışmadan geriye kalan kütlenin yüzde miktarlarının türler arasında farklılık gösterdiği görülmüştür ( $P < 0,0001$ ). 4. yılsonu için kestane sahalarında toplam kütlenin %30'unun, kayın sahalarında ise %40'ının geriye kaldığı bulunmuştur. Kayın sahalarında 4. yılsonunda yüzde kalan kütle miktarının kestane sahalarından yaklaşık olarak 1,3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Kestane yapraklarındaki kütle kaybının kayın yapraklarından daha hızlı olduğu bu da kestane yapraklarında ayrışmanın daha hızlı gerçekleştiğini göstermiştir. Sargıncı (2014) aynı türlerde 2 yıl boyunca ayrışmayı takip etmiş ve bu çalışmaya paralel bir sonuç bularak kestane yapraklarının daha hızlı ayrıştığını belirlemiştir. Avusturya'nın kuzeyinde (Hochschwab Alplerinde) kayın ve karaçam türlerinde yapılan araştırmalarda iki yıllık ayrışmanın sonucunda, ortalama kalan kütle kayın da %54 ve karaçam da %50 olarak bulunmuştur (Berger vd., 2005). Arıt yöresinde (Bartın ili) kayın, göknar, göknar-kayın meşcerelerinde yapılan çalışmada, kalan kütle miktarlarını sırasıyla %75, %64 ve %73 olarak hesaplamıştır (Çakıroğlu, 2011). Eldivan'da yapılan çalışmada karaçam türü için 12 ayın sonunda kalan ölü örtü kütlesi %58 dolaylarında iken bu değer ikinci yılın sonunda % 44,47 olarak bulmuştur (Çakır, 2017). Yine Belgrad Ormanı içerisinde yapılan araştırmada, meşede kalan kütle miktarını % 65 bulurken bir diğer tür olan kayında ise % 68 olarak hesaplamıştır (çakır, 2013).



Not: Aynı zaman periyodunda ortak harflerle takip edilen ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde istatistiki olarak birbirlerinden farklı değildir.



Not: Aynı türde ortak harflerle takip edilen ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde istatistiki olarak birbirlerinden farklı değildir.



Not: Aynı türde ortak harflerle takip edilen ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde istatistiki olarak birbirlerinden farklı değildir.

Şekil 0.12. Düzce Akçakoca bölgesi kayın ve kestane meşcerelerinde beş farklı zaman periyodu sonunda (P1: 3 ay, P2: 6 ay, P3: 1,25 yıl, P4: 2,25 yıl ve P5: 4,23 yıl) ölü örtü ayrışmasından arta kalan kütle miktarı ortalamaları (%)  $\pm$  standart hataları.

Analiz sonuçları her bir dönemde iki tür için hesaplanan “k” değerlerinin istatistiki olarak farklı olduğunu göstermiştir (bütün P-değerleri  $<0,0001$ ; Tablo 1). Genel olarak kestane sahalarında her bir zaman periyodu için hesaplanan “k” değerlerinin, aynı zaman periyotlarında kayın için hesaplanarlardan yaklaşık 1,5-2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sargıncı (2014) aynı türler için yaptığı 2 yıllık çalışmada her bir dönemde (P1, P2, P3 ve P4) iki tür için hesaplanan “k” değerlerinin istatistiki olarak farklı olduğunu bulmuştur (bütün P-değerleri  $<0,0001$ ) ve kestane sahalarında her bir zaman periyodu için hesaplanan “k” değerlerinin, aynı zaman periyotlarındaki kayın için hesaplanarlardan yaklaşık 1,5-2 kat daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Bu çalışmada ise 4. yılsonu analiz sonuçlarında da her iki tür içinde hesaplanan “k” değerlerinin istatistiki olarak farklı olduğu bulunmuştur (bütün P-değerleri  $<0,0001$ ; Çizelge 3.1). Kestane sahalarında her bir zaman periyodu için hesaplanan “k” değerlerinin, aynı zaman periyotlarındaki kayın türü için hesaplanan “k” değerlerinden fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Kuzey Almanya da yapılan incelemelerde; ladin ibrelerinin kayın yapraklarından daha hızlı ayrıştığını belirtmişler ve ladinin ayrışma sabitini 0,25 kayının ise 0,18 olarak bulmuşlardır. Ladin ve kayının % 95’inin ayrışması için gereken sürenin sırasıyla 12 yıl ve 16 yıl olarak belirtmişlerdir (Albers vd, 2003). Karaçam türünde birinci yılın sonunda ayrışma sabitini 0,53 ve % 95’inin ayrışması için gerekli sürenin 8,5 yıl olduğunu belirlenmiştir. İkinci yılın sonunda ise ayrışma sabitini 0,48 olarak bulurken %95’inin ayrışması için gerekli sürenin 6,25 yıl olduğunu belirlenmiştir (çakır, 2017).

**Tablo 1.** Düzce Akçakoca bölgesi kayın ve kestane meşcerelerinde dört farklı zaman periyodu (0,25 Yıl, 0,50 Yıl, 1,25 Yıl ve 2,25 Yıl) sonunda hesaplanan “k” değerleri ortalaması  $\pm$  standart hataları.

Tür	Süre (Yıl)	Ortalama k değerleri $\pm$ standart hata			R <sup>2</sup>
Kayın	0,25	0,508	$\pm$ 0,026	b	0,7215
Kestane	0,25	0,843	$\pm$ 0,04	a	0,7596
Kayın	0,5	0,471	$\pm$ 0,018	b	0,8308
Kestane	0,5	0,788	$\pm$ 0,026	a	0,8696
Kayın	1,25	0,307	$\pm$ 0,008	b	0,9084
Kestane	1,25	0,478	$\pm$ 0,011	a	0,9311
Kayın	2,25	0,248	$\pm$ 0,009	b	0,83
Kestane	2,25	0,398	$\pm$ 0,012	a	0,8875
Kayın	4,23	0,232	$\pm$ 0,013	b	0,6871
Kestane	4,23	0,307	$\pm$ 0,015	a	0,7515

Not: Aynı süre içerisinde aynı sütunda ortak harflerle takip edilen ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde istatistiki olarak birbirlerinden farklı değildir.

## SONUÇ

Yapılan çalışmada kayın ve kestane yapraklarının ayrışmasının incelendiği 4. yılsonu için yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre her bir periyotta ayrışmadan kalan kütle miktarının türler arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur. Kestane sahalarında 4. yılsonu yaprakların toplam külesinin %30’nun, kayın sahalarında ise %40’nun geriye kaldığı belirlenmiştir. Kayın sahalarında 4. yılsonunda yüzde kalan kütle miktarının kestane



sahalarından yaklaşık olarak 1,3 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Her iki tür ayrı ayrı incelendiğinde kalan kütle miktarlarının periyotlar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar gösterdiği ve kestane yapraklarındaki kütle kaybının kayın yapraklarından daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Bu da kestane yapraklarında ayrışmanın daha hızlı gerçekleştiğini göstermiştir. 4. Yılsunu analiz sonuçlarında her iki tür içinde hesaplanan “k” değerlerinin istatistiki olarak farklı olduğu bulunmuştur (P-değerleri <0,0001). Kestane sahalarında her bir zaman periyodu için hesaplanan “k” değerlerinin, aynı zaman periyotlarındaki kayın türü için hesaplanan “k” değerlerinden fazla olduğu görülmüştür. Her iki türde (Kayın ve kestane) de en düşük “k” değeri dördüncü yıl da hesaplanmış bu değerler kayında 0,232 ve kestanede 0,307 olarak bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2017. 02. 02. 586 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir

## KAYNAKLAR

- Albers, Derk, Sonja Migge, Matthias Schaefer, and Stefan Scheu. "Decomposition of beech leaves (*Fagus sylvatica*) and spruce needles (*Picea abies*) in pure and mixed stands of beech and spruce." *Soil Biology and Biochemistry* 36, no. 1 (2004): 155-164.
- Anşin, R., "Türkiye'nin Flora Bölgeleri ve Bu Bölgelerde Yayılan Asal Vejetasyon Tipleri", *İ. Ü. Orman Fak. Derg.*, -İstanbul, c. 6, sayı 2, ss. 318-339, 1983.
- Atalay, I., "Vegetation Geography of Turkey", Ege University Press. Bornova, İzmir, Türkiye., 1994.
- Berger, Torsten W., et al. "Decomposition of beech (*Fagus sylvatica*) and pine (*Pinus nigra*) litter along an Alpine elevation gradient: decay and nutrient release." *Geoderma* 251 (2015): 92-104.
- Bocock, K. L. ve Gilbert, O. J. W., "The Disappearance of Leaf Litter Under Different Woodland Conditions", *Plant Soil*, c. 9, ss. 179-185, 1957.
- Çakır, M., "Toprak Eklem Bacaklılarının, Kayın Ve Meşe Ekosistemindeki Mevsimsel Değişimi Ve Ölü Örtü Ayrışmasına Etkileri", 2013.
- Çakır, M., "Litter Decomposition of *Pinus nigra* in Semi-Arid Region", Kayseri, 2017.
- Çakıroğlu, Kamil. Bartın ili Arıt yöresindeki kayın, göknar, göknar-kayın meşcerelerindeki ölü örtü ayrışması ve yıllık yaprak dökülmesinin araştırılması. MS thesis. Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- Dündar, M., "Toprak Organik Maddesi Ve Ekolojik Yönden Önemi", İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, c. 37, sayı 1, s. 17, 1987.
- Kasırğa, Z., "Farklı Yaşlara Sahip Ormanlaştırma Alanlarında Organik Karbon Fraksiyonundaki Zamansal Değişim", s. 40, 2015.
- Sarginci, M., "Batı Karadeniz Orman Ekosistemlerinde Ölü Örtü Dinamiği / Litter dynamics in Western Blacksea forest ecosystems", *Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi*, sayı April 2014, s. 157, 2014.
- Tolunay, D., Öztürk, S., Gürlevik, Y. D. D. N., Karakaş, A., Akkaş, M. E., Adıgüzel, U., & Taşdemir, C., *Türkiye Ormanlarının Sağlık Durumu (2008-2012)*. Ankara: Orman Ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Orman Zararlılarıyla Mücadele Dairesi Başkanlığı, 2012.
- Özyuvacı, N., *Meteoroloji ve Klimatoloji*, İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, Fakülte Yayın No: 460, İstanbul (1999).

## Nitrate prediction of groundwater and surface water using artificial neural networks: Eskişehir Example

Semra Benzer<sup>1\*</sup>. Recep Benzer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gazi University. Education Faculty. Science Education. Ankara. Turkey.

<sup>2</sup>Ostim Technical University. Information Security Technology. Ankara. Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [sbenzer@gazi.edu.tr](mailto:sbenzer@gazi.edu.tr)

### Abstract

In this study, changes in the amount of nitrate in Eskişehir using surface water in the basin of the nitrate content determined by the Provincial Directorate of Agriculture modeling was presented with an approach based on Artificial Neural Networks (ANNs). Our country is in a critical region in terms of water resources, the determination of the status of water resources, it is important to conduct a lot of research for the development and preservation. For this purpose, quality monitoring stations in the measured parameters, be managed in a common database, the creation of a national water quality monitoring network, making long-term data collection is required. Regulations under the protection of waters against pollution by nitrates from agricultural sources; Provincial Directorate of Agriculture designated 32 stations in (13 surface and 19 underground water) surface and underground waters at 2015, 2016 and 2017 of the years serves nitrate analysis. The results of the current study show that ANNs can be a superior estimation tool. In the designed ANNs model, MSE and R values related to training, validation, testing and all data were 0.50446 and 2.90611e-3; 0.80044 and 5.87755e-3; 0.74144 and 7.29039e-3; 0.46694 and 2.20739e-3 respectively. All data are calculated with MATLAB (neural fitting) coding. ANNs modeled and estimated data Eskişehir province of nitrate in surface and ground water in future will be determined.

**Keywords:** Artificial Neural Networks, Nitrate, Eskişehir, surface water, ground water.

### INTRODUCTION

The total amount of water in the world is 1.4 billion km<sup>3</sup>, while the amount of salty water in the oceans and seas constitutes 97.5 % of this amount and the fresh water in rivers and lakes constitutes 2.5 %. Due to the fact that 90 % of the fresh water resources are in the poles and underground waters the amount of water that people can easily reach is very limited. Turkey's total annual underground water resources are approximately 14 billion m<sup>3</sup> and total available surface water and groundwater resources are around 112 billion m<sup>3</sup> (DSİ, 2019). Underground waters are used as a source of drinking water with the beginning of the reduction of surface water resources. Groundwater is used as a drinking water source for many years because it is relatively safe and clean compared to other water sources. Over time, due to excessive use, there has been an organic and inorganic pollution input into the groundwater and the quality of the water has decreased (Majumdar, 2000).

Nitrate pollution in groundwater shows a global increase. In many countries, the amount of nitrate in drinking water sources is constantly increasing. Turkish Drinking Water Standard The limit value for nitrate concentration in TS 266 is 50 mg NO<sub>3</sub>/L (On, 2005). The nitrate limit value in drinking water by the Environmental Protection Agency (EPA) is 45 mg NO<sub>3</sub>/L in the United States (WHO, 1984; Ecetoc, 1988). There are a number of studies into the prediction and modelling of nitrate in various water reservoirs, such as Şengörür and Öz (2002) in Mahmudiye Stream; Garcet et al. (2006), Yesilnacar et al. (2008) in Harran Plain, Aguilera et al. (2001) in coastal waters in a Spanish tourist area, Benzer and Benzer (2018) in Kütahya' underground and surface waters, Benzer and Benzer (2018) in groundwater, surface water and 3 closed water source in Yeşilirmak Watershed.

This study aims to estimate the changes in the amount of nitrate in Eskişehir using surface water in the basin of the nitrate content determined by the Provincial Directorate of Agriculture modeling was presented with an approach based on Artificial Neural Networks (ANNs).

### MATERIALS AND METHODS

ANNs are an information processing paradigm that is inspired by biological nervous systems, such as the brain process information (Sivanondom et al., 2006). It is composed of a large number of highly interconnected processing elements (neurons) working in unison to solve specific problems (Huang et al., 2006). The basic

element of an ANNs is Artificial Neurons. These neurons multiple their inputs ( $x_i$ ) with variable weights and values obtained from this process transform with an activation function ( $f(n)$ ) to output value ( $y_i$ ). These formulas (Krenker et al., 2011) can be seen in its mathematical description (1).

$$y(k) = F \cdot \left( \sum_{i=0}^m w_i(k) \cdot x_i(k) \right) \quad (1)$$

Where:

- $w_i(k)$  is weight value in discrete time  $k$  where  $i$  goes from 0 to  $m$ .
- $x_i(k)$  is input value in discrete time  $k$  where  $i$  goes from 0 to  $m$ .
- $F$  is a transfer function.
- $y_i(k)$  is output value in discrete time  $k$ .

As seen from a model of an artificial neuron and its equation (1) the major unknown variable of our model is its transfer function. Transfer function defines the properties of artificial neuron and can be any mathematical function.

The supervised learning method trained with the network structure (Back-propagation Networks) will be used to solve problems in this study. The transfer function (2). ( $V_N$  is normalized data.  $V_N$  is data to be normalized.  $V_{min}$  is the minimum value of the data.  $V_{max}$  is the maximum value of the data) mostly used a sigmoid or a logistic function. gives values in the range of [0.1] and can be described as (normalization):

$$V_N = 0.8 \times \left( \frac{V_R - V_{min}}{V_{max} - V_{min}} \right) + 0.1 \quad (2)$$

Neural Network Toolbox of MATLAB was used for the ANNs calculations. The data were divided into three equal parts: training, validation and test sets. The Matlab functions were used for “training”, “testing”, and “validation”. They were used randomly; 70% in training, 15% in testing, and 15% in the validation of the data. Mean Squared Error (MSE) were used as a performance criteria. MSE was used as convergence criteria during the training of the network. The smaller the values of MAPE, the closer are the forecasted values to the actual values. MSE was described by equations 3.

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_{ip} - Y_{io})^2 \quad (3)$$

where  $Y_{io}$  is the actual observation value,  $Y_{ip}$  is the prediction value, and  $n$  is the number of total observations.

## RESULTS

Provincial Directorates of Agriculture carry out nitrate analyzes in surface and groundwater within the scope of Protection of Waters Against Nitrate Pollution from Agricultural Sources Regulation. 32 stations data in (13 surface and 19 underground water) surface and underground waters at 2015, 2016 and 2017 of the years serves nitrate analysis were used for modelling (Table 1). The results of the data on Eskişehir are illustrated in Figure 1.

Table 1. Nitrate analyzes results for surface and underground water stations (Eskişehir/Turkey).

Water Source	Station Name	Years		
		2017	2015	2016
Surface	Sakarya Nehri Sarıcakaya	6.31	8.4094	10.42
Surface	Porsuk Çayı Yunus Emre	11.83	11.3128	10.81
Surface	Porsuk Çayı Beylikova	9.96	11.242	7.22
Surface	Sakaryabaşı Çifteler	10.54	8.015	5.70
Surface	Seydisuyu Hamidiye	11.76	5.005	7.24
Surface	Balıkdamı Sivrihisar	3.96	0.0091	6.07
Surface	Seydisuyu Seyitgazi	5.48	4.3477	5.32
Surface	Çatören Barajı	1.63	1.855	10.82
Surface	Sarısungur Göleti	2.41	5.8583	10.82
Surface	Bardakçı Deresi	12.59	12.7102	11.26

Surface	Sarısu Deresi Turgutlar	6.98	8.095	7.77
Surface	Porsuk Çayı Kızılınler	2.83	3.8247	3.86
Surface	Musaözü Göleti	0.16	4.0397	4.15
Underground	İnönü Kümbet Kuyu	18.95	75.8435	18.90
Underground	Sivrihisar Aşağıkepen Kuyu	77.95	35.7165	56.70
Underground	Tepebaşı Gündüzler kuyu	1.33	98.9767	0
Underground	Beylikova Rahmiye Kuyu	22.14	26.4085	12
Underground	Günyüzü Hamamkarahisar Kuyu	161.07	103.4717	143.70
Underground	Mahmudiye Aydın Engin At Çiftliği	51.99	56.0622	59.60
Underground	Kızılınler Musaözü tulumba	14.84	17.3247	44.90
Underground	Şahintepe kuyu	172.55	9.5342	0
Underground	Beylikova Akköprü Kuyu	27.78	25.8915	28.50
Underground	Kalkanlı Köyçeşmesi	31.51	27.0285	27.90
Underground	Han Gökçekuyu	30.76	31.4655	18.10
Underground	Karacahöyük Tulumba	54.44	26.92	26.40
Underground	Doğançayır Seyitgazi	21.99	14.152	14.20
Underground	Mahmudiye Fahriye	60.03	36.8695	67.40
Underground	Seyitgazi Kuyu	10.87	12.2217	15.80
Underground	Alpu Bahçecik Kuyu	2.27	3.1352	8.10
Underground	Sivrihisar Ertuğrul	26.93	3.4358	9.70
Underground	Tepebaşı Yıldırım Çiftliği	7.35	12.172	0
Underground	Seyitgazi Kırka Kuyu	2.69	19.6765	15.30

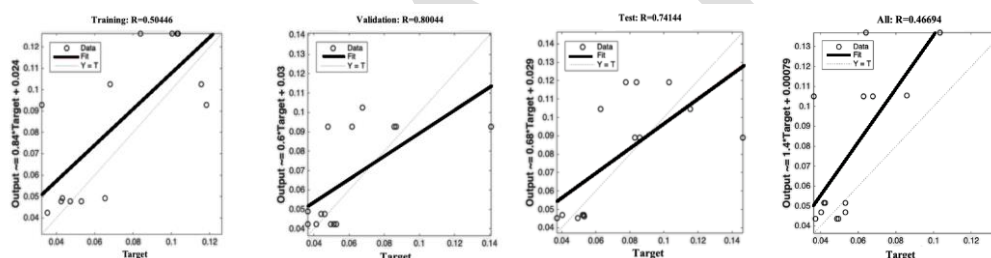


Figure 1. Results (training, validation, test and all) by ANNs

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The results of the current study show that ANNs can be a superior estimation tool. In the designed ANNs model. MSE and R values related to training, validation, testing and all data were 0.50446 and 2.90611e-3; 0.80044 and 5.87755e-3; 0.74144 and 7.29039e-3; 0.46694 and 2.20739e-3 respectively. All data are calculated with MATLAB (neural fitting) coding. ANNs modeled and estimated data Eskişehir province of nitrate in surface and ground water in future will be determined.

It is understood that the model developed by ANNs has a positive effect on the solution of the problem connected with many variables without linear relationship between them (Türelı et al., 2011; Benzer, 2015; Benzer et al., 2015; Benzer and Benzer, 2016; Benzer et al., 2016; Benzer et al., 2017; Benzer and Benzer, 2017; Benzer and Benzer, 2018a; Benzer and Benzer, 2018b; Benzer and Benzer, 2019).

The designed, trained, validated neural network model is powerful enough to predict nitrate. It would be better to compare the data obtained with the longer-term data by increasing the number of stations and the estimation methods (ANNs, ARIMA Model and Multi-Layer Perceptron (MLP) Model for time series forecasting). Thus, with the proposed ANNs application in the current study, surface water and groundwater resources can be managed in a more cost-effective and easy way.

In this study, we described the application of Artificial Neural Networks to the task of nitrate values prediction. We described the theory behind ANNs and our Neural Network model.

## REFERENCES

- Aguilera P.A., Frenich A.G., Torres J.A., Castro H., Vidal J.M. and Canton M., 2001. Application of the Kohonen neural network in coastal water management: methodological development for the assessment and prediction of water quality. *Water Research*. 35(17): 4053-4062.
- Benzer R. 2015. Population dynamics forecasting using artificial neural networks. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24(2): 460-466
- Benzer S. Karasu Benli Ç. Benzer R. 2015. The comparison of growth with length-weight relation and artificial neural networks of crayfish. *Astacus leptodactylus*. in Mogan Lake. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*. 21(2): 208-223.
- Benzer S. Benzer R. 2016. Evaluation of growth in pike (*Esox lucius* L., 1758) using traditional methods and artificial neural networks. *Applied Ecology and Environmental Research*. 14(2): 543-554
- Benzer S. Benzer R. Gül A. 2016. Artificial Neural Networks Application for Biological Systems: The Case Study of *Pseudorasbora parva*. In: *Developments in Science and Engineering*. St. Kliment Ohridski University Press Sofia, Turkey
- Benzer. S. and Benzer. R., 2017. Comparative growth models of big-scale sand smelt (*Atherina boyeri* Risso, 1810) sampled from Hirfanlı Dam Lake. Kırşehir, Ankara, Turkey. *Computational Ecology and Software* 7(2): 82-90.
- Benzer. R., and Benzer. S. (2018a). Forecasting the Nitrate Pollution of Groundwater and Surface Waters: Kütahya Example. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.* 8(1):279-287.
- Benzer. S., and Benzer. R. (2018b). Modelling Nitrate Prediction of Groundwater and Surface Water Using Artificial Neural Networks. *Politeknik Dergisi*. 21(2). 321-325.
- Benzer. R., and Benzer. S., 2019. Growth and length-weight relationships of *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) in Hirfanlı Dam Lake: Comparison with traditional and artificial neural networks approaches. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. DOI:10.22092/ijfs.2018.119889.
- DSİ. 2019. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü Toprak Su Kaynakları. <http://www.dsi.gov.tr/toprak-ve-su-kaynaklari> (January 2019).
- Ecetoc. (1988). Nitrate and drinking water. Brussels. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 27).
- Garcet J.P., Ordonez A., Roosen J. and Vanclooster M., (2006). Metamodelling: Theory, concepts and application to nitrate leaching modelling. *Ecological Modelling*. 193(3): 629-644.
- Huang GB, Zhu QY, Siew CK. 2006. Extreme learning machine: theory and applications. *Neurocomputing*. 70(1): 489-501
- Krenker A, Beşter J, Kos A. 2011. Introduction to the Artificial Neural Networks. In: *Artificial Neural Networks - Methodological Advances and Biomedical Applications* (Kenji Suzuki, ed). InTech, USA
- Majumdar, D.G.N. (2000). Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders. *Indian Journal of Environmental Health* 42(1):28- 39.
- Official Newspaper (ON) Law 25730 (2005). İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.aspx?MevzuatKod=7.5.7510&MevzuatIliski=0&sourceXmlSearch=insani>
- Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ. 1986. Learning internal representations by error propagation in Parallel Distributed Processing. *Explorations in the Microstructure of Cognition*. MIT Press. 1: 318-362
- Sivanondom SN, Sumathi S, Deapa SN. 2006. Introduction to neural networks using Matlab 6.0. Tat McGrawHill Publishing Company Limited, New Delhi, India
- Şengörür B, and Öz C., (2002). Determination of the effects of water pollution of aquacultures using neural networks". *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*. 26(2): 95-106.
- WHO. (1984). Health hazards from nitrate in drinking-water. Report on a WHO meeting, Copenhagen, 5-9 March 1984. Copenhagen. WHO Regional Office for Europe (Environmental Health Series No. 1).
- Yesilnacar M.I., Sahinkaya E., Naz M. and Ozkaya B., (2008). Neural network prediction of nitrate in groundwater of Harran Plain, Turkey". *Environmental Geology*. 56(1): 19-25.

## Parkinson Hastalığı Histopatolojisi

Başak Büyük<sup>1\*</sup>, Hüseyin Avni Eroğlu<sup>2</sup>, Cemre Aydeğer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

<sup>3</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji AD, Çanakkale, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: drbasakbuyuk@hotmail.com

### Özet

Parkinson hastalığı ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından “titrek felç” olarak tanımlanmıştır. Genel olarak bakıldığında Parkinson hastalığı yaygın ve karmaşık bir nörolojik hastalıktır. Parkinsonizm tek bir hastalıktan ziyade substantia nigrayı bazal ganglionla birleştiren dopaminerjik yolların bozukluğunun klinik belirtisidir. Böyle bozukluklar bir çok dejeneratif hastalıkta bulunduğu gibi travma, muayen toksik ajanlar, vasküler hastalıklar, ansefalitler ve birçok diğer şartlar nedeniyle de olabilir.

Belki parkinsonizmin en iyi bilinen formu Parkinson hastalığına eşlik edenidir. Bu idiyopatik parkinsonizm ve paraliji ajitans olarak da bilinir. Parkinson hastalığı locus ceruleus ve substantia nigranın dopamin sekrete eden nöronlarına tutan dejeneratif bir hastalıktır. Erişkinlerin bir hastalığıdır.

Dört temel motor bulgusu vardır: dinlenme anında tremor, rijidite, akinezi (veya bradikinezi) ve postüral instabilite. Bunlara ek olarak fleksiyon postürü ve donma fenomeni en sık görülen motor bulgulardır.

Bradikinezi hareketlerin yavaşlamasıdır. En sık görülen klinik semptom olmasına rağmen depresyon dahil diğer hastalıklarda da görülebilir. Bradikinezi, bazal ganglion hastalıklarının ayırt edici özelliğidir ve hareketi planlama, başlatma ve yürütme ve sıralı ve eşzamanlı görevler gerçekleştirme konusundaki zorlukları kapsar. Tremor en kolay tanımlanan Parkinson hastalığı semptomudur. Tremor unilateraldir, frekansı 4–6 Hz’dir ve genellikle ekstremitelerin distal kısımlarında görülür. Karakteristik olarak istirahat tremoru eylemle ve uyku sırasında kaybolur.

Rijidite artan dirençle karakterizedir. Genellikle “dişli çark“ şeklinde görülür. Boyun, omuz, kalça gibi proksimalde veya el bileği, ayak bileği gibi distalde görülebilir. Postüral instabilite, postüral refleks kaybına bağlı olarak ortaya çıkar. Genellikle Parkinson hastalığının geç evrelerinde ve diğer klinik özelliklerin başlamasından sonra ortaya çıkar.

Postüral instabilite (yürüyüşün donması ile birlikte) düşmelerin en sık nedenidir. Bu semptomlar beynin farklı bölgelerindeki değişikliklerden kaynaklanır.

Bu çalışmanın amacı, Parkinson hastalığının histopatolojik bulgularının ortaya konması ve klinik semptomların bu bulgularla ilişkisini tartışmaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Parkinson Hastalığı, histopatoloji, bradikinezi, tremor

### Abstract

Parkinson's disease was first described by James Parkinson in 1817 as “shaky paralysis”. In general, Parkinson's disease is a common and complex neurological disorder. Parkinsonism is a clinical manifestation of a disorder of dopaminergic pathways that connect the substantia nigra to the basal ganglia rather than a single disease.

Such disorders may be present in many degenerative diseases, as well as trauma, examination of toxic agents, vascular diseases, encephalitis and many other conditions. Perhaps the best-known form of parkinsonism is associated with Parkinson's disease. It is known as idiopathic parkinsonism and paralytic agitation. Parkinson's disease is a degenerative disease involving the dopamine secreting neurons of the locus ceruleus and substantia nigra. It is a disease of adults.

There are four main motor signs: tremor at rest, rigidity, akinesia (or bradykinesia) and postural instability. In addition, flexion posture and freezing phenomena are the most common motor findings.

Bradykinesia is the slowing of movements. Although it is the most common clinical symptom, it can be seen in other diseases including depression. Bradykinesia is a distinctive feature of basal ganglion diseases and includes difficulties in planning, initiating and executing movement and performing sequential and simultaneous tasks. Tremor is the most easily described symptom of Parkinson's disease. Tremor is unilateral, with a frequency of 4–6 Hz and is usually seen in the distal parts of the extremities. Characteristically, resting tremor disappears by action and during sleep.

Rigidity is characterized by increased resistance. It is usually seen as a “gear wheel”. It can be seen proximally like neck, shoulder, hip or distal like wrist and ankle. Postural instability occurs due to loss of postural reflex. It usually occurs in the late stages of Parkinson's disease and after the onset of other clinical features. Postural instability (with freezing gait) is the most common cause of falls. These symptoms are caused by changes in different parts of the brain.

The aim of this study was to investigate the histopathological findings of Parkinson's disease and to discuss the relationship between clinical symptoms and these symptoms.

**Keywords:** Parkinson's disease, histopathology, bradykinesia, tremor

## GİRİŞ

Parkinson hastalığı ilk olarak 1817 yılında James Parkinson tarafından “titrek felç” olarak tanımlanmıştır. Bu tanımından 100 yıl kadar sonra Parkinson hastalığı görülen kişilerde substantia nigradaki hücre ölümleri belirlenmiş, yaklaşık 140 yıl sonra ise dopamin nörotransmitteri keşfedilmesiyle hastalığın anlaşılma süreci hızlanmıştır (Jankovic, 2008).

Parkinson hastalığı 55-65 yaş aralığında gelişir. 60 yaş üstü kişilerde % 1-2 oranında görülürken 85-89 yaş aralığında ise bu oran % 3 daha fazladır. Genel popülasyonun yaklaşık % 0.3'ü etkiler ve prevalansı erkeklerde kadınlara göre 1-1.5 kat daha fazladır (Rizek ve ark., 2016).

## PARKİNSON ETİYOLOJİSİ VE KLİNİK SEMPTOMLARI

Genel olarak bakıldığında Parkinson hastalığı yaygın ve karmaşık bir nörolojik hastalıktır (Jankovic, 2008). Parkinsonizm; tek bir hastalıktan ziyade substantia nigrayı bazal gangliona birleştiren dopaminerjik yolların bozukluğunun klinik belirtisidir. Böyle bozukluklar birçok dejeneratif hastalıkta bulunduğu gibi travma, muayyen toksin ajanlar, vasküler hastalıklar, ensefalitler ve birçok diğer şartlar nedeniyle de olabilir. Belki parkinsonizmin en iyi bilinen formu Parkinson hastalığına eşlik edenidir. Bu idiopatik parkinsonizm ve paralizajitans olarak da bilinir.

Parkinson hastalığı lokus ceruleus ve substantia nigranın dopamin sekrete eden nöronlarını tutan dejeneratif bir hastalıktır. Erişkinlerde görülen bir hastalıktır. Vakaların çoğu altıncı dekatta ortaya çıkar. Hastalık genellikle sporadiktir (Robbins 2013). Dört temel motor bulgusu vardır: dinlenme anında tremor, rijidite, akinezi (veya bradikinezi) ve postüral instabilite. Bunlara ek olarak fleksiyon postürü ve donma fenomeni en sık görülen motor bulgulardır.

Bradikinezi hareketlerin yavaşlamasıdır. En sık görülen klinik semptom olmasına rağmen depresyon dahil diğer hastalıklarda da görülebilir. Bradikinezi, bazal ganglion hastalıklarının ayırt edici özelliğidir ve hareketi planlama, başlatma ve yürütme ve sıralı ve eşzamanlı görevler gerçekleştirme konusundaki zorlukları kapsar. Genellikle günlük yaşam aktivitelerinin gerçekleştirilmesinde yavaşlık, yavaş hareket ve reaksiyon süreleridir. Düğmelere basılması, mutfak eşyaları kullanılması gibi ince motor kontrolü gerektiren görevlerde zorluklar içerir.

Tremor en kolay tanımlanan Parkinson hastalığı semptomudur. Tremor unilateraldir, frekansı 4 – 6 Hz' dir ve genellikle ekstremitelerin distal kısımlarında görülür. Karakteristik olarak istirahat tremoru eylemle ve uyku sırasında kaybolur. Yapılan klinik-patolojik çalışmalar, Parkinson hastalığı ve belirgin tremorlu hastaların, bir orta beyin (A8) nöron alt grubunun dejenerasyonuna sahip olduğunu, oysa bu alanın, tremorsuz Parkinson hastalarında korunduğunu göstermiştir.

Rijidite artan dirençle karakterizedir. Genellikle “dişli çark “ şeklinde görülür. Boyun, omuz, kalça gibi proksimalde veya el bileği, ayak bileği gibi distalde görülebilir (Jankovic, 2008) Genel olarak klinisyenler tarafından erken Parkinson semptomu olarak belirlenmiştir. İstemli hareketle ortaya çıkar ve göz hareketleri de dahil hareket boyunca devam eder. Rijiditenin etiyojisi ise oldukça karmaşıktır. Klinik gözlemlerde uzun geçikmeli refleks özellikleriyle korele olduğu gösterilmiş ve sadece gevşeme başarısızlıklarından, gerilme reflekslerindeki anormalliklerden ve kasın mekanik özelliklerin katkısından değil, aynı zamanda spinal refleksler üzerine anormal bazal ganglion aktivitesinin potansiyel katkılarından oluştuğu ileri sürülmüştür (Hess ve Hallett, 2017).

Postüral instabilite, postüral refleks kaybına bağlı olarak ortaya çıkar. Genellikle Parkinson hastalığının geç evrelerinde ve diğer klinik özelliklerin başlamasından sonra ortaya çıkar. Postural instabilite (yürüyüşün donması ile birlikte) düşmelerin en sık nedenidir (Jankovic, 2008).

Bu motor fonksiyonların kaybıyla birlikte daha az ele alınan depresyon, konstipasyon, ağrı, genitoüriner problemler, uyku bozukluklarını da içeren nonmotor semptomlar Parkinson hastalığında görülmektedir. Hastalığın motor semptomları daha sık tedavi edilirken nonmotor semptomlar daha az tanımlanmakta ve daha

az tedavi edilmektedir. Nonmotor semptomların nöroanatomik ve nörokimyasal substratları bilinmemekte ve patofizyolojisi hakkında spekülasyonlar devam etmektedir (Chaudhuri ve ark., 2006).

## PARKINSON HİSTOPATOLOJİSİ

Parkinson hastalığında görülen semptomlar beynin farklı bölgelerindeki değişikliklerden kaynaklanır. Temel patolojik değişiklik, substantia nigra pars kompakta bölümündeki dejeneratif nöron kaybıdır. Bu nöronlar, diğer bazal ganglionlar ve striatuma dopamin salgırlarlar. Dejenerasyonları motor korteks alanları ve bazal ganglionların da dahil olduğu nöronal döngüde disfonksiyona neden olur (Lotankar ve ark., 2017).

Beynin bu bölgesi etkilenmemiş bireylerle kıyaslandığında Parkinson hastalığı olan bireylerde nöronların % 50-70'ini kaybeder. Parkinson hastalığında belgelenen en erken patolojik değişiklikler medulla oblongata/pontin tegmentum ve olfaktör bulbusda gözlenir (Kalia ve Lang, 2016). Beyin dıştan normal veya hafif atrofik olabilir. Vakaların çoğunda substantia nigra ve locus ceruleus; vagus sinirinin dorsal motor nöronları, locus ceruleus ve substantia nigradaki nöromelanin bulunduran nöronların kaybının sonucu pigmentsizdir. Mikroskopik incelemede bu bölgelerde pigmentli, katekolaminerjik nöronların kaybına gliosis eşlik eder, Lewy cisimcikleri geride kalan bazı nöronlarda görülebilir. Bunlar, sitoplazma içinde tek ya da birden fazla sayıda, eozinofilik, yuvarlak ya da uzamış inklüzyonlardır ve sıklıkla soluk bir alanın çevrelediği koyu bir merkez vardır. Elektron mikroskopunda Lewy cisimcikleri ince filamanlardan oluşmuştur. Bu filamanlar merkezde yoğun şekilde sarmallaşmış, kenarlarda ise gevşek olup, a-sinüklein'den ve nörofilaman ile ubiquitini de kapsayan diğer proteinlerden oluşmaktadır. Diğer bir major histolojik bulgu anormal a-sinüklein agregatları içeren distrofik nöritler olan Lewy nöritleridir.

Parkinson hastalığında geniş bir dizi nörolojik defisit ortaya çıkışından anlaşıldığı üzere, immünohistokimyasal olarak a-sinükleinin boyanması substantia nigra dışındaki birçok beyin bölgesinde ve nondopaminerjik nöronlardaki az miktardaki Lewy cisimciklerini ve Lewy nöritlerini ortaya koyar. Bu lezyonlar substantia nigrayı tutmadan önce ilk olarak medullada, daha sonra ponsta ortaya çıkar. Demansın işaret ettiği gibi, Lewy cisimcikleri ve Lewy nöritleri en son olarak serebral kodekste ve Meynert bazal nükleusu ve amigdalanın kolinergic hücrelerini de kapsayan subkortikal alanlarda ortaya çıkarlar.

Patolojik işaretler Lewy cisimciklerinin dağılımına dayanır. Çapı 15 µm'den fazla olan berrak bir halo ile çevrili yoğun bir hiyalin çekirdeği içeren organize bir yapıya sahip Lewy cisimleri Parkinson hastalığının patolojik işaretidir (Davie, 2008, Dauer ve Przedborski, 2003). Hücre gövdesinde Lewy cisimcikleri adını alırken bu süreçteki nöronlar Lewy nöritleri adını alır (Kalia ve Lang, 2016). Bunlar, proteolizden sorumlu proteinlerle birlikte bir dizi nörofilaman proteininden oluşan α-sinüklein-immünoreaktif inklüzyonlardır (Davie, 2008).

Bu inklüzyonlar yanlış katlanmış α-sinükleinlerin çözünmez hale gelmesi sonucu oluşur. Son zamanlardaki çalışmalarda α-sinükleinin çözünmeyen fibril formundan ziyade çözünen oligomerik formunun Parkinson hastalığı patolojisi olduğu öne sürülmektedir. Bu çözünen oligomerik form hücre mebranın bozulmasına ve hücre ölümüne neden olduğu in vitro çalışmalar ve hayvan çalışmalarıyla da kanıtlanmaktadır.

Son araştırmaların özel bir odak noktası, sayısız hücrel işlemi bozarak nöronal toksisiteye neden olduğu gösterilen küçük α-sinüklein agregatları veya düzenekleri (örneğin oligomerler, şeritler ve fibriller) olmuştur. Laboratuvar çalışmaları, küçük α-sinüklein agregatlarının nöronlar tarafından salınabileceğini, komşu hücreler tarafından alınabileceğini ve daha sonra endojen konakçı α-sinüklein alımı yoluyla Lewy benzeri patolojiyi indükleyebileceğini ve böylece beynin içinde prion benzeri bir şekilde patolojinin yayıldığını göstermiştir (Kalia ve Lang, 2016).

Ubiquitin-proteasom sistemi (UPS) ve otofajik-lizozomal yolak (ALP) dahil olmak üzere birçok proteolitik sistem, α-sinükleinin bozulmasına katılır. Otofajik-lizozomal yolak uzun ömürlü makromoleküller, sitozolik kompanetler ve organel disfonksiyonlarını indirgerken, UPS temel olarak kısa ömürlü çözünebilir proteinleri indirger. İşlevsel olarak birbiriyle bağlantılı bu proteolitik sistemlerin bozulması α-sinüklein agregatlarının yığılmasını beraberinde getirir. Bu yığılma sonucunda uygun hücrel fonksiyonları engellenir ve Parkinson hastalığı patogeneze katkıda bulunur.

Mitokondriyal füzyon, fisyon, taşıma, otofajik parçalanma (mitofaji), ve biyogenezisi de içeren mitokondriyal dinamikler hücre sağlığının temelidir. Mitokondriyal dinamiklerin disfonksiyonu nöral disfonksiyon ve Parkinson hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. α-sinükleinin özellikle füzyon sürecini ile mitokondriyal disfonksiyonu etkilediğini destekleyen artan kanıtlar mevcuttur.

Bütün bunlarla birlikte yüksek seviyede çoklu doymamış yağlar ve nispeten düşük antioksidan aktivite sebebiyle beyin periferik organlarla kıyaslandığında oksidatif stres daha çabuk etkilenir. Önemli kanıtlar α-sinüklein oligomerizasyonu ile ROS üretimi arasında iki yönlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. α-sinüklein birikiminden oksidatif stres oluştuğundan dolayı mikrogial hücrelerin aktivasyonuna olur. α-sinüklein bu



mikroglial kaynaklı aktivasyon sonunda nörotoksik olan ROS arttıranlar da dahil olarak çoklu proinflamatuvar salınımına yol açar. Böylece protein birikimi, inflamatuvar mikroglia ve nöronal hasar döngüsü Parkinson hastalığının ilerleyici sürecine katkıda bulunur (Rocha ve ark., 2018).

Parkinson hastalığında substantia nigradaki dejenerasyonu başlatan patofizyolojik süreç ile alakalı yaygın görüş ise süreçleri altı patolojik evreye ayıran Braak ve arkadaşları (2003) tarafından öne sürülmüştür. Braak evre 1 olfaktör disfonksiyonla klinik olarak belirlenir, olfaktör bulbus ve anterior olfaktör nükleusta dejenerasyon vardır. Braak evre 2 alt beyin sapında patofizyolojik süreçlerin ilerlemesiyle karakterizedir. Evre 1 ve 2 'de Parkinson hastalığı prelinik süreçtedir ve olfaksiyon, uyku homeostazisi ve diğer otonomik özellikleri içeren nonmotor semptomlarla karakterizedir. Tipik motor üçlü olan tremor, rijidite ve bradikinezi Braak evre 3 ve 4 de substantia nigra ile orta ve ön beyindeki diğer nükleusların topografik olarak etkilenmesiyle açığa çıkar. Bu aşama, Parkinson hastalığının bir premotor bozukluktan motor bozukluğa eşiği geçtiği ve klinik olarak tanı konduğu zamandır. Son iki aşama, Braak aşama 5 ve 6, limbik yapılarda ve olgun neokortekste Lewy cisimlerinin varlığı ile ilişkilidir. Hastalarda depresyon, bilişsel bozukluk ve görsel halüsinasyonlar gibi nöropsikiyatrik belirtiler olabilir. Ancak, Braak evreleme Lewy cisimcikleri dağılımına dayanırken nöronal dejenerasyona dayanmaz. Ayrıca, önerilen Braak evrelerinin geçerliliği (örneğin evreler 1 ve 2) onaylanmaya devam etmektedir. Bu hipotez, parkinsonizmin Lewy cisimcikleri ile halisülasyonlar ve demansı içeren kognitif özellikleri ile klinik halini açıklamasına veya prelinik özellikler olan huzursuz bacak sendromu veya konstipasyonu açıklamamasına rağmen Braak evresi kabul görmektedir (Chaudhuri ve ark., 2006).

## SONUÇ

Parkinson hastalığı birçok klinik semptom ve patolojik bulgularla seyreden komplike bir hastalıktır. Yapılan araştırmalarla bu bulgular ile patolojisi arasında bağlantılar ortaya çıkarılmakla beraber halen bu konuda eksiklikler mevcuttur. Bu çalışmanın amacı da bu histopatolojik bulgularının ortaya konması ve klinik semptomların bu bulgularla ilişkisini tartışılması olmuştur. Sonuç olarak bu konuda açığa çıkarılmamış noktaların araştırılmasının histopatolojik açıdan önemli olduğunu düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RA, Steur ENJ, Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197-211.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, 5(3), 235-245.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *neuron*, 39(6), 889-909.
- Davie C.A. 2008. A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*, 86(1), 109-127.
- Hess CW, Hallett M. 2017. The Phenomenology of Parkinson's Disease. In *Seminars in neurology* (Vol. 37, No. 02, pp. 109-117). Thieme Medical Publishers.
- Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry*, 79(4), 368-376.
- Kalia LV, Lang, AE. 2016. Parkinson disease in 2015: evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. *Nature reviews Neurology*, 12(2), 65.
- Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. 2017. Biomarkers for Parkinson's disease: recent advancement. *Neuroscience bulletin*, 33(5), 585-597.
- Rizek P, Kumar N, Jog MS. 2016. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Cmaj*, 188(16), 1157-1165.
- Robbins CK. 2013. "Temel Patoloji", Dokuzuncu Baskı, İstanbul.
- Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. 2018. Alpha-synuclein: pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 109, 249-257.

## Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of raw honey in Central Asia

Mehmet Rüştü Karaman

Afyon Kocatepe University, Department of Medical and Aromatic Plants, Afyon, Turkey

Corresponding author e-mail: [rkaraman2000@hotmail.com](mailto:rkaraman2000@hotmail.com)

### Abstract

Especially, carbohydrates are the most essential nutrient as a natural performance-energy source for humans. It is believed that bee products such as honey are the best supplements for human nutrition and health, but there is limited information on the ergogenic effects of bee products on body performance. The main target of this study was to analyse some energy components together with physicochemical and antioxidant properties of raw honey and to determine their potential as a performance-enhancing energy source for humans. For this aim, some physicochemical and biological values together with antioxidant capacity of raw honey were analysed. The findings have revealed that raw honey has an abundance of phenolic compounds and antioxidants, which are all important in achieving optimal health and body performance. Furthermore, honey can be an effective carbohydrate source and a better substitute to glucose for natural energy performance of human body, due to its constituent of various classes of sugars. However, evaluation and standardisation of quality properties of the bee products will be valuable for their potential nutritional and performance effects for humans.

**Keywords:** Bee products, raw honey, antioxidant, phenolics

### 1. INTRODUCTION

Minerals and nutrients are essential for a wide variety of metabolic and physiologic processes in the human body. Some of the physiologic roles of minerals are their involvement in: muscle contraction, normal heart rhythm, nerve impulse conduction, oxygen transport, oxidative phosphorylation, enzyme activation, immune functions, antioxidant activity, bone health, and acid-base balance of the blood (Speich et al., 2001; Melvin, 2005). Especially, carbohydrates are the most essential nutrient in an athlete's diet because they are the only fuel that can sustain intense exercise for extended durations.

The energy requirements of training vary according to the type and duration of sessions which in turn change across training cycles. Bee products include honey, propolis, royal jelly, bee pollen and bee bread consists mainly of carbohydrates (CHO), minerals, and vitamins which are properties that are believed able to improve exercise performance and general health. It is believed that bee products are the best supplements for human nutrition and health, but there is limited information on the ergogenic effects of bee products on sports performance. Honey consists mainly of carbohydrates (CHO), minerals, and vitamins which are properties that are believed able to improve exercise performance and general health.

The consumption of energy giving substances before, during and after any form of physical exercise improves the individual's performance and increases the rejuvenation of muscles. This is also associated with dietary supplementation with NH, which provides up to 17 g of carbohydrates for every tablespoon consumed and gives the much needed energy, thus serving as an inexpensive substitute to commercially available sporting activities enhancers (Ajibola et al., 2012). The data obtained from the Sports Nutrition and Exercise Laboratory of one University show that honey can be used effectively instead of glucose for energy replenishment during physical exercise (Kreider et al., 2002). A very recent review of the hypoglycaemic effect of honey by some workers also conclude that, the synergistic effect of fructose and glucose constituents of honey might contribute to the low glycaemic response after a honey meal (Erejuwa et al., 2012).

Hence, reviewing of the scientific reports on bee products could help us to reach two main conclusions in terms of nutritional properties and the usage of these mixtures in sport performance. Still there is a tremendous need for advanced good quality experimental and clinical studies. On the other hand; there is obviously an urgent need to find out the best reliable and standardized mixture, which have been approved for health and sport-beneficial effects.

### 2. MATERIALS AND METHODS

The main target of this study was to analyse some energy components, minerals, vitamins etc. of bee products such as raw honey to determine their potential as a performance-enhancing energy sources for healthy life. For this aim, a total of 20 honey samples were collected directly from honey beekeepers in different geographic

regions of Kyrgyzstan and Turkey. The botanical origin of unifloral and multifloral honey samples were presented in Table 1.

Table 1. Botanical origin of honey samples.

Bee Products	Number of Samples	Province
Honey Type		
Multifloral	20	Kyrgyzstan
Multifloral	20	Turkey

Energy values (kcal per 100g<sup>-1</sup>) together with some physicochemical and biological properties such as protein (%), oil (%), carbohydrates (%), total sugar (%), sucrose (%), glucose + fructose (%), total phenolics (mg 100g<sup>-1</sup>), antioxidants (mg 100g<sup>-1</sup>), moisture (%) of the raw honey were analysed according to the routine methods (Anonymous, 2005). All bee products and mixtures were prepared for analysis in the laboratory of Ankara University Technopark Region. For all quality analysis were made by using routine methods. The values obtained from analysis were compared to the limit values reported by Agricultural Ministry.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Some quality properties of raw honey samples collected from Turkey and Kyrgyzstan were presented in Table 2. The average moisture contents of honey samples were varied 16.50 and 16.90 % depending on region. The monosaccharides glucose and fructose are also major constituents of honey. Fructose is always the most important sugar quantitatively followed by glucose. In this study, sucrose contents of raw honey samples were varied from 0.92 to 1.33% in Turkey, from 0.83 to 1.26% in Kyrgyzstan. The fructose + glucose contents of honey samples are ranged from 51.42 to 71.74% in Turkey, it ranged from 49.55 to 67.42 % in Kyrgyzstan, respectively.

Average phenolics and antioxidant capacity were found 10.56 mg 100g<sup>-1</sup> and 79.48 mg 100g<sup>-1</sup> for Turkey, 12.73 mg 100g<sup>-1</sup> and 81.49 mg 100g<sup>-1</sup> for Kyrgyzstan. The findings have revealed that bee products have an abundance of phenolic substances and antioxidants, which are all important in achieving optimal health and performance. Many authors have studied phenolic and flavonoid contents of honey to determine their beneficial effect in human health and whether a correlation exists with floral origins (Macdermid and Stannard, 2006; Dubtsova et al., 2007; Yakusheva, 2010; Ping et al., 2018). It has also been concluded that total flavonoid and total phenolic contents varied between different honey samples depending on the geographical location of the different floral sources.

The average HMF and the diastase activity were found 4.22 mg kg<sup>-1</sup> and 17.1 for Turkey, and 2.43 mg kg<sup>-1</sup> and 23.6 for Kyrgyzstan respectively, which are parameters widely recognized for the evaluation of honey freshness and/or overheating. The HMF and the diastase activity are parameters widely recognized for the evaluation of honey freshness and/or overheating (Terrab et al., 2002). Furthermore, honey can be an effective carbohydrate source and a better substitute to glucose for exercise and athletic performance, due to its constituent of various classes of sugars (Markiewicz-Żukowska, et al., 2013). Although honey is a high carbohydrate food, its glycemic index varies within a wide range from 32 to 85, depending on the botanical source, which make it an excellent energy source especially for children and sportsmen (Stanciu et al., 2009; Yusof et al., 2018).

On the other hand, as it is seen from quality parameters detected in honey samples, no naphthalene levels were found in the samples collected from Turkey or Kyrgyzstan. The proline levels are also ranged from 291 to 405 mg kg<sup>-1</sup> in Turkey, it ranged from 316 to 388 mg kg<sup>-1</sup> in Kyrgyzstan, respectively. The extensive use of insecticides and fungicides in agricultural practice and acaricides inside beehives to control pests and bee diseases raises the possibility of indirect or direct pollution of honey. Naphthalene is a polycyclic aromatic hydrocarbon that is widely used commercially in agricultural chemicals (Germansky and Jamall, 1998). Thus, the naphthalene and proline levels are parameters widely recognized for the indicator of residue problems in the honey samples.

Table 2. Some quality properties of honey samples

Parameters	Minimum	Maximum	Mean $\pm$ SD
<b>Turkey</b>			
Moisture, %	16.03	17.98	16.90 $\pm$ 9.1
Free Acidity, meq kg <sup>-1</sup>	23.17	32.68	28.68 $\pm$ 6.2
EC, mS cm <sup>-1</sup>	0.47	0.79	0.63 $\pm$ 0.3
Total Sugar, %	65.64	98.25	81.47 $\pm$ 22.8
Sucrose, %	0.92	1.33	1.17 $\pm$ 0.24
Fructose + Glucose, %	51.42	71.74	66.9 $\pm$ 11.64
Diastase Activity	11.64	25.02	17.1 $\pm$ 3.75
HMF, mg kg <sup>-1</sup>	2.58	5.97	4.22 $\pm$ 1.64
C4 Sugar, %	4.00	8.19	5.75 $\pm$ 0.82
Naphthalene, $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Proline, mg kg <sup>-1</sup>	291	405	352 $\pm$ 69
Antioxidant, mg 100g <sup>-1</sup>	69.42	89.06	79.48 $\pm$ 6.78
Total Phenolics, mg 100g <sup>-1</sup>	7.34	14.11	10.56 $\pm$ 1.57
Energy, kcal 100g <sup>-1</sup>	329	394	364 $\pm$ 38.41
Oil, %	0.22	0.46	0.33 $\pm$ 0.12
Protein, %	1.86	2.43	2.15 $\pm$ 0.39
Carbohydrate, %	77.34	86.75	81.64 $\pm$ 9.42
<b>Kyrgyzstan</b>			
Moisture, %	14.71	18.73	16.50 $\pm$ 3.70
Free Acidity, meq kg <sup>-1</sup>	21.22	34.09	27.39 $\pm$ 5.64
EC, mS cm <sup>-1</sup>	0.36	0.83	0.67 $\pm$ 0.29
Total Sugar, %	61.53	88.25	76.55 $\pm$ 3.57
Sucrose, %	0.83	1.26	1.14 $\pm$ 0.72
Fructose + Glucose, %	49.55	67.42	64.15 $\pm$ 17.68
Diastase Activity	10.08	32.74	23.6 $\pm$ 2.44
HMF, mg kg <sup>-1</sup>	2.40	3.63	2.43 $\pm$ 0.75
C4 Sugar, %	3.92	6.84	5.08 $\pm$ 1.11
Naphthalene, $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	<1 ppb	<1 ppb	<1 ppb
Proline, mg kg <sup>-1</sup>	316	388	346 $\pm$ 32.40
Antioxidant, mg 100g <sup>-1</sup>	72.59	94.53	81.49 $\pm$ 9.24
Total Phenolics, mg 100g <sup>-1</sup>	8.06	17.73	12.73 $\pm$ 3.61
Energy, kcal/kJ 100g <sup>-1</sup>	347	413	352 $\pm$ 18.56
Oil, %	0.19	0.52	0.31 $\pm$ 0.09
Protein, %	1.92	2.60	2.17 $\pm$ 1.12
Carbohydrate, %	71.34	92.75	80.02 $\pm$ 6.84

#### 4. CONCLUSION

As a result, bee products have been used thousands of years ago as a natural supplement and as a form of traditional medicine. However, there are many bee-products on the market, many of which are very poor quality with very suspect ingredients that is also contaminated with antibiotics, heavy metals and other impurities. Standardisation of quality properties of the bee products will be valuable for their optimal performance effects for humans. The main target of this study was to analyse some energy components together with physicochemical and antioxidant properties of raw honey and to determine their potential as a performance-enhancing energy source for humans. For this aim, some physicochemical and biological values together with antioxidant capacity of raw honey were analysed. The findings have revealed that raw honey has an abundance of fenolic compounds and antioxidants, which are all important in achieving optimal health and body performance. Furthermore, honey can be an effective carbohydrate source and a better substitute to glucose for natural enerhy performance of human body, due to its constituent of various classes of sugars. However, in this study, considerable differences in the physicochemical parameters, sugar composition and palynological parameters between honey samples collected different region were observed. evaluation and

standardisation of quality properties of the bee products will be valuable for their potential nutritional and performance effects for humans.

## References

- Ajibola, A., Joseph, P.C., Erlwanger, K.H. 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth Ajibola et al. *Nutrition & Metabolism*, 9:61.
- Anonymous, 2005. Turkish Food Codex - Honey Notification (Number: 2005/49) - Official Newspaper, Ankara, Turkey.
- Bobis, O., Marghitas, L.A., Dezmirean, D., Morar, O., Bonta, V., Chirila, F. 2010. Quality parameters and nutritional value of different commercial bee products. *Bulletin of University of agricultural sciences and veterinary medicine Cluj–Napoca. Animal science and biotechnologies*, Vol. 67:1-2.
- Bruno, G. 2005. Bee Pollen, Propolis & Royal Jelly. Literature Education Series On Dietary Supplements. ©2005 Huntington College of Health Sciences.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S. 2012. Fructose might contribute to the hypoglycemic effect of honey. *Molecules*, 17:1900-1915.
- Germansky, M., Jamall, S. 1998. Organ-specific effects of naphthalene on tissue peroxidation, glutathione peroxidases, and super oxide dismutase in the rat. *Arch. Toxicol.* 61:480-483.
- Habryka, C., Kruczek, M., Drygas, B. 2016. **Bee products used in apitherapy**. *World Scientific News*, 48, pp. 254-258.
- Kreider, R.B., Rasmussen, C.J., Lancaster, S.L., Kerksick, C., Greenwood, M. 2002. Honey: An alternative sports gel. *Strength Conditioning J.* 24:50–51.
- Markiewicz-Żukowska, R., Naliwajko, S.K., Bartosiuk, E., Moskwa, J., Isidorov, V., Soroczyńska, J., Borawska, M.H. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). *Journal of Apicultural Sci.* 57(2):147-157.
- Macdermid P.W., Stannard S.R. 2006. A whey-supplemented, high-protein diet versus a high-carbohydrate diet: effects on endurance cycling performance. *Int J Sport. Nutr. Exerc. Metab.* 16(1):65-73.
- Melvin, H.W. 2005. Dietary Supplements and Sports Performance: Minerals. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2(1):43-49.
- Stanciu O, Marghitas L, Dezmirean D. Macro-and Oligo-Mineral Elements from Honeybee-Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *J AnimSciBiotechnol.* 2009;66:1-6.
- Speich, M., et al. 2001. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clinical Chimica Acta*, V. 312, p. 1-11.
- Stanciu, O, Marghitas, L, Dezmirean, D. 2009. Macro- Oligo-Mineral Elements from Honeybee-Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *J Anim. Sci. Biotechnol.* 66:1-6.
- Terrab, A., Diez, M.J., Heredia, F.J. 2002. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem* 79:373-379.
- Yusof, A., Ahmad, N.S., Hamid, A., Khong, T.K. 2018. Effects of honey on exercise performance and health components: A systematic review. *Sci. & Sports.* Doi:10.1016/j.scispo.2018.02.007.

## Growth properties of Sand Smelt (*Atherina boyeri* (Risso 1880)) in İznik Lake, Turkey: Different Approaches

Semra Benzer<sup>1\*</sup>, Recep Benzer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gazi University, Education Faculty, Science, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Ostim Technical University, Information Security Technology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [sbenzer@gazi.edu.tr](mailto:sbenzer@gazi.edu.tr)

### Abstract

This study is about using Artificial Neural Networks (ANNs) and Length-Weight Relationships (LWR) for population growth forecasting of the sand smelt, *Atherina boyeri* (Risso 1880) in İznik Lake. The samples (*Atherina boyeri*) were collected from İznik Lake. During the study, 195 fish specimens were caught in 2018. The LWR were estimated from the formula  $W = a L^b$ , where W is total body weight (g), L is the total length (mm), and a and b are the coefficients of the functional regression between W and L (Standart length SL, Fork Length FL and Total Length TL). ANNs are computational systems that simulate biological neural networks and can be defined as a specific type of parallel processing system based on distributional or connectionist methods. The Mean squared error (MSE) and Regression coefficient (R) were used in the study as the two performance criteria by MATLAB. The pilot error histogram of the data was also examined. The length and weight (min-max) of the fish were 40 – 88 mm (SL), 42-96 (FL), 44-104 (TL) and 0.77 – 7.50 g, respectively. There were 38.46 % females, 61.54 % males. LWR and ANNs models was found for females, males and all individual. The relationship was  $W = 0.0000926 L^{2.4121}$  ( $R^2 = 0.974$ ) for females,  $W = 0.00004966 L^{2.5572}$  ( $R^2 = 0.961$ ) for males and  $W = 0.00006184 L^{2.5054}$  ( $R^2 = 0.966$ ) for all individual. The results obtained by ANNs and LWR equation are compared to those obtained by the growth rate of the fish caught from İznik Lake. ANNs can be alternative as a evaluated for growth estimation.

**Keywords:** Artificial Neural Networks, Length-Weight Relationships, sand smelt, İznik Lake.

### INTRODUCTION

The Big-scale sand smelt, *Atherina boyeri* Risso, 1810 is a commercially important fish found throughout the Mediterranean and adjacent seas. It is euryhaline, mostly inhabiting coastal and shallow brackish waters including coastal lagoons, salt marshes and inland waters (Leonardo and Sinis, 2000; Pallaoro et al., 2002; Andreu-Soler et al., 2003; Bartulovic et al., 2006). This species inhabits the coasts of the northern Atlantic Ocean and basins of the Mediterranean Sea, Black Sea, and Caspian Sea (Kottelat and Freyhof, 2007).

Several studies on the age and growth of Big-scale sand smelt have been reported in the literature, only a few have focused on populations inhabiting aquatic system (Mantilacci et al., 1990; Altun, 1999; Tarkan et al., 2007; Özeren, 2009; ApaydinYağcı et al., 2015; İlhan and Sarı, 2015; Gençoğlu and Ekmekçi, 2016; Erhan et al., 2016; Boundinar et al., 2016; Benzer and Benzer, 2017).

Artificial neural networks (ANNs) are information processing systems that consist of many interconnected processors, called neurons, resembling the elementary principles of the nervous system (Ramos-Nino et al., 1997; Zhang, 2010, 2011; Zhang and Zhang, 2008). ANNs have been employed in recent years as an alternative to conventional regression models, due to their ability to describe highly complex and non-linear problems in many fields of science. They normally have no restriction on the type of relationship between the growth parameters. ANNs directly explore the knowledge contained input-output patterns by adjusting the parameters of the non-linear. The neural network, with the error backpropagation procedure, is the basis of an interesting methodology that could be used in the same field as regression analysis, particularly with the non-linear relations (Rumelhart et al., 1986).

Much research has been performed on growth calculating using ANNs because they exhibit better results than traditional methods found in the literature (Suryanarayana et al., 2008; Türeli Bilen et al. 2011; Christiansen et al., 2015; Benzer, 2015, Benzer et al., 2015; Benzer and Benzer, 2016; Benzer et al., 2016; Benzer and Benzer, 2017; Benzer and Benzer, 2019). These studies showed that neural network models are significantly better than length-weight relationships (LWR).

In this paper, the use of the neural networks approach was examined for regression problem with the aim of analyzing the level of relationships between lengths (SL, FL and TL) and weight variables in İznik Lake by using the big-scale sand smelt.

## MATERIALS AND METHODS

Iznik Lake in the southeast of the Sea of Marmara is located within the boundaries of Bursa province (40°23'–40°30' N; 29°20' – 29°42' E). Turkey's 5th largest lake in the Marmara Region feature. Iznik Lake, 302 km<sup>2</sup> cover the area. The 1246 km<sup>2</sup> water collection area of the lake is surrounded by high mountains in north and south directions (Meriç et al., 2009).

The samples (*Atherina boyeri* Risso, 1810) were collected from İznik Lake by the fishermen. During the study, 195 fish specimens were caught in 2018. The fish obtained from the lake were transported to the laboratory to record lengths (Standart length SL, Fork Length FL and Total Length TL) to the nearest 0.1 cm and body weight (W) to the nearest 0.01 g. The sexes of each specimen were determined by microscopic examination of the gonads.

### Growth Models

#### Length Weight Relation (LWR)

LWR Equation is a traditional method used for the determination of the growth features of populations. Lengths (SL, FL and TL) was measured to the nearest 0.1 mm and analytical balances with a precision of 0.01 g were used to record weight (W). The length - weight (log-transformed) relationships were determined by linear regression analysis and scatter diagrams of length and weight were plotted (Le Cren, 1951).

$$W = aL^b \quad (1)$$

where W is the body weight of fish (in g), SL/FL/TL is the length (in cm) and 'a' (regression intercept) and 'b' (regression slope) are constants. The parameter 'b' (also known as the allometry coefficient) has an important biological meaning, indicating the rate of weight gain relative to growth in length or the rate at which weight increases for a given increase in length (Ricker, 1975). The logarithmic transformation of the formula above is;

$$\ln W = \ln a + b \cdot \ln L \quad (2)$$

$$\text{Log } W = \text{Log } a + b \cdot \text{Log } L \quad (3)$$

This equation is equivalent the regression equation:

$$y = a + b \cdot x \quad (4)$$

This mean that; y is equivalent to ln W, a which represents the y-intercept (the point where the line crosses the y axis) of the regression line is equivalent to ln a, b is the slope of the line, and x is equivalent to ln L.

#### Artificial Neural Networks (ANNs)

ANNs are an information processing paradigm that is inspired by biological nervous systems, such as the brain process information (Sivanondom et al., 2006). It is composed of a large number of highly interconnected processing elements (neurons) working in unison to solve specific problems (Huang et al., 2006). The basic element of an ANN is Artificial Neurons. These neurons multiple their inputs (xi) with variable weights and values obtained from this process transform with an activation function (f(n)) to output value (yi). These formulas (Krenker et al., 2011) can be seen in its mathematical description (5).

$$y(k) = F \cdot \left( \sum_{i=0}^m w_i(k) \cdot x_i(k) \right) \quad (5)$$

Where:

- $w_i(k)$  is weight value in discrete time k where i goes from 0 to m,
- $x_i(k)$  is input value in discrete time k where i goes from 0 to m,
- F is a transfer function,
- $y_i(k)$  is output value in discrete time k.

As seen from a model of an artificial neuron and its equation (5) the major unknown variable of our model is its transfer function. Transfer function defines the properties of artificial neuron and can be any mathematical function.

The supervised learning method trained with the network structure (Back-propagation Networks) will be used to solve problems in this study. The transfer function (6), ( $V_N$  is normalized data,  $V_N$  is data to be normalized,  $V_{min}$  is the minimum value of the data,  $V_{max}$  is the maximum value of the data) mostly used a sigmoid or a logistic function, gives values in the range of [0,1] and can be described as (normalization):

$$V_N = 0.8 \times \left( \frac{V_R - V_{min}}{V_{max} - V_{min}} \right) + 0.1 \quad (6)$$

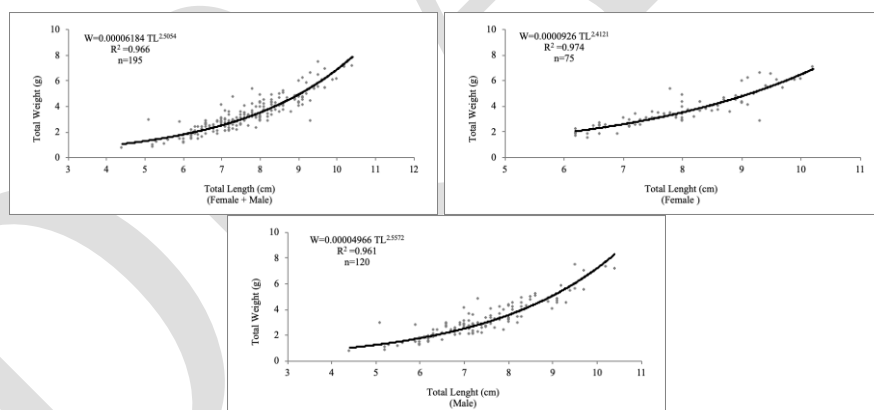
Neural Network Toolbox of MATLAB was used for the ANNs calculations. The data were divided into three equal parts: training, validation and test sets. The Matlab functions were used for “training”, “testing”, and “validation”. They were used randomly; 70% in training, 15% in testing, and 15% in the validation of the fish. Mean Squared Error (MSE) were used as a performance criteria. MSE was used as convergence criteria during the training of the network. The smaller the values of MAPE, the closer are the forecasted values to the actual values. MSE was described by equations 7.

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_{ip} - Y_{io})^2 \quad (7)$$

where  $Y_{io}$  is the actual observation value,  $Y_{ip}$  is the prediction value, and  $n$  is the number of total observations.

## RESULTS and DISCUSSION

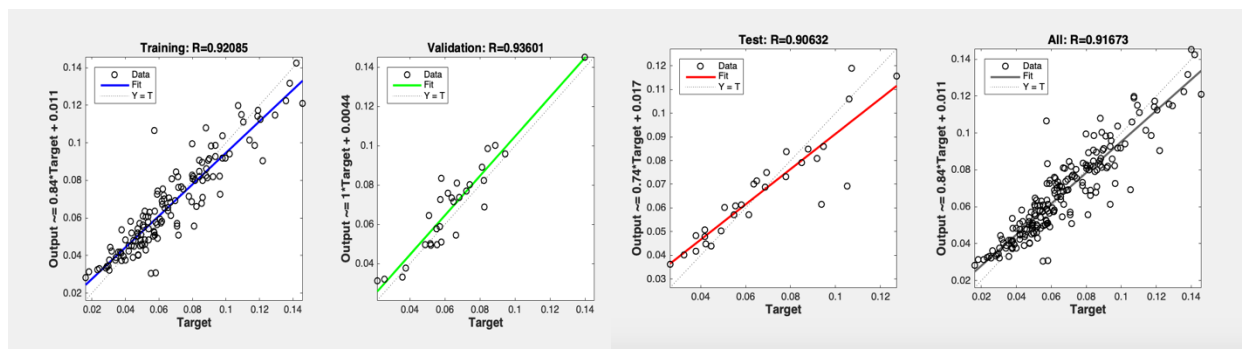
The length and weight (min-max) of the fish were 40 – 88 mm (SL), 42-96 (FL), 44-104 (TL) and 0.77 – 7.50 g, respectively. There were 38.46 % females, 61.54 % males. LWR and ANNs models was found for females, males and all individual. The relationship was  $W = 0.0000926 TL^{2.4121}$  ( $R^2 = 0.974$ ) for females,  $W = 0.00004966 TL^{2.5572}$  ( $R^2 = 0.961$ ) for males and  $W = 0.00006184 TL^{2.5054}$  ( $R^2 = 0.966$ ) for all individual (Figure 1).



**Figure 1.** LWR of *Atherina boyeri* in İznik Lake.

A total of 195 length, weight data were used for ANNs calculating. 137 of the obtained data were used in the learning process and 29 were used in the validation and 29 were used in test verification process. Prediction performances of artificial neural networks trained and tested with data length and weight variables in İznik Lake by using the big-scale sand smelt were shown in Figure 2.





**Figure 2.** Relationships with ANNs for training, validation, test and all.

The Mean Squared Error (MSE) and The coefficient correlation (R) used in both training, validation and test data are calculated with MATLAB coding. In the training, validation and the test data, was found to be MSE  $1.136 \times 10^{-4}$ , R 0.92085; MSE  $9.369 \times 10^{-5}$ , R 0.93601 and MSE  $1.235 \times 10^{-4}$ , R 0.90632, respectively. According to all data for ANNs was found to be MSE  $1.121 \times 10^{-4}$ , R 0.9167.

## CONCLUSION

LWR have been used frequently to estimate weight from lengths (SL, FL and TL). The results of the study were examined by adding the ANNs approach to the traditional estimation method (LWR). This research also provides growth information by LWR and ANNs approach that would be useful for sustainable management of fisheries in İznik Lake.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was financed by Gazi University (GAZİ-BAP) under Grant No. BAP-04/2018-05

## REFERENCES

- Altun Ö. 1999. Morphological Variations Observed on the Sand Smelt (*Atherina boyeri* Risso, 1810) Populations, Turkish Journal of Zoology, 23: 911-918
- Andreu-Soler A, Oliva-Paterna FJ, Fernández-Delgado C, et al. 2003. Age and growth of the sand smelt, *Atherina boyeri* Risso, 1810, in the Mar Menor coastal lagoon (SE Iberian Peninsula). Journal of Applied Ichthyology, 19: 202-208
- Apaydın Yağcı M, Alp A, Yağcı A, Cesur M, et al. 2015. Growth and reproduction of sand smelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 in Lake Eğirdir, Isparta, Turkey. Indian Journal of Fisheries Sciences, 6(1): 1-5
- Bartulović V, Glamuzina B, Conides A, et al. 2006. Maturation, reproduction and recruitment of the sand smelt, *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Pisces: Atherinidae) in the estuary of Mala Neretva River (southeastern Adriatic, Croatia). Acta Adriat, 47: 5-11
- Benzer R. 2015. Population dynamics forecasting using artificial neural networks. Fresenius Environmental Bulletin, 24(2): 460-466
- Benzer S, Benzer R, Gül A. 2016. Artificial Neural Networks Application for Biological Systems: The Case Study of *Pseudorasbora parva*. In: Developments in Science and Engineering. St. Kliment Ohridski University Press Sofia, Turkey
- Benzer S, Benzer R. 2016. Evaluation of growth in pike (*Esox lucius* L., 1758) using traditional methods and artificial neural networks. Applied Ecology and Environmental Research, 14(2): 543-554
- Benzer S, Karasu Benli Ç, Benzer R. 2015. The comparison of growth with length-weight relation and artificial neural networks of crayfish, *Astacus leptodactylus*, in Mogan Lake. Journal of Black Sea/Mediterranean Environment, 21(2): 208-223.
- Benzer, R., and Benzer, S., 2019. Growth and length–weight relationships of *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) in Hirfanlı Dam Lake: Comparison with traditional and artificial neural networks approaches. Iranian Journal of Fisheries Sciences. DOI:10.22092/ijfs.2018.119889.
- Benzer, S. and Benzer, R., 2017. Comparative growth models of big-scale sand smelt (*Atherina boyeri* Risso, 1810) sampled from Hirfanlı Dam Lake, Kırşehir, Ankara, Turkey. Computational Ecology and Software 7(2): 82-90.

- Boudinar AS, Chaoui L, Kara MH. 2016. Age, growth and reproduction of the sand smelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 in Mellah Lagoon (Eastern Algeria). *Journal of Applied Ichthyology*, 32(2): 302
- Christiansen F, Bertulli CG, Rasmussen MH, et al. 2015. Estimating cumulative exposure of wildlife to nonlethal disturbance using spatially explicit capture–recapture models. *The Journal of Wildlife Management*, 79(2): 311-324
- Erhan Ü, Gaygusuz Ö, Çiçek T, et al. 2016. New record and range extension of the big-scale sand smelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Atherinidae) in the Devegeçidi Dam Lake, Tigris River basin, Turkey
- Gençoğlu L, Ekmekçi FG. 2016. Growth and reproduction of a marine fish, *Atherina boyeri* Risso 1810, in a freshwater ecosystem. *Turkish Journal of Zoology*, 40: 534-542
- Huang GB, Zhu QY, Siew CK. 2006. Extreme learning machine: theory and applications. *Neurocomputing*, 70(1): 489-501
- İlhan A, Sarı HM 2015. Length-weight relationships of fish species in Marmara Lake, West Anatolia, Turkey. *Croatian Journal of Fisheries*, 73(1): 30-32
- Kottelat M, Freyhoff J. 2007. Handbook of European Freshwater Fishes. Steven Simpson, Norwich, UK
- Krenker A, BešTer J, Kos A. 2011. Introduction to the Artificial Neural Networks. In: *Artificial Neural Networks - Methodological Advances and Biomedical Applications* (Kenji Suzuki, ed). InTech, USA
- Le Cren ED. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition of Perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20: 201-219.
- Leonardos I, Sinis A. 2000. Age, growth and mortality of *Atherina boyeri* Risso, 1810 (Pisces: Atherinidae) in the Mesolongi and Elotikon lagoons (W. Greece). *Fisheries Research*, 45: 81-91
- Mantilacci L, Mearelli M, Giovinazzo G, et al. 1990. Accrescimento e alimentazione del latterino (*Atherina boyerii* Risso) del lago Trasimeno. *Rivista d'Idrobiologia*, 29: 30-327
- Meriç E, Nazik A, Avşar N, Alpar B, Ünlü S, Gökasan E. 2009. Evidences of a possible Marmara Sea-Iznik Lake connection in Quaternary: Determination of ostracods and foraminifers in the recent sediments of the Iznik Lake (Bursa-NW TURKEY). *İstanbul Yerbilimleri Dergisi*, 22, 1-19.
- Özeren SC. 2009. Age, Growth and Reproductive Biology of the Sand Smelt *Atherina boyeri*, Risso 1810 (Pisces: Atherinidae) in Lake İznik, Turkey. *Journal of International Fisheries*, 4: 34-39
- Pallaoro A, Franicevic M, Matic S. 2002. Age, growth and mortality of big scale sand smelt, *Atherina* (Hepsetia) *boyeri* Risso, 1810 in the Pantana Lagoon, Croatia. *Periodicum Biologorum*, 104(2): 175-183
- Ramos-Nino ME, Ramirez-Rodriguez CA, Clifford MN, et al. 1997. A comparison of quantitative structureactivity relationships for the effect of benzoic and cinnamic acids on *Listeria monocytogenes* using multiple linear regression, artificial neural network and fuzzy systems. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 168-176
- Ricker WE. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 191: 1-382
- Rumelhart DE, Hinton GE, Williams RJ. 1986. Learning internal representations by error propagation in Parallel Distributed Processing. *Explorations in the Microstructure of Cognition*, MIT Press, 1: 318-362
- Sivanondom SN, Sumathi S, Deapa SN. 2006. Introduction to neural networks using Matlab 6.0. Tat McGrawHill Publishing Company Limited, New Delhi, India
- Suryanarayana I, Braibanti A, Rao RS, et al. 2008. Neural networks in fisheries research. *Fisheries Research*, 92: 115-139
- Tarkan S, Bilge G, Sezen B, et al. 2007. Variations in growth and life history traits of sand smelt, *Atherina boyeri*, populations from different water bodies of Turkey: influence of environmental factors. *Rapp Comm Int Mer Médit*, 38: 611
- Tureli Bilen C, Kokcu P, Ibriki T. 2011. Application of Artificial Neural Networks (ANNs) for weight predictions of blue crabs (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) using predictor variables. *Mediterranean Marine Science*, 12(2): 439-446
- Zhang WJ, Zhang XY. 2008. Neural network modeling of survival dynamics of holometabolous insects: a case study. *Ecological Modelling*, 211: 433-443
- Zhang WJ. 2010. *Computational Ecology: Artificial Neural Networks and Their Applications*. World Scientific, Singapore
- Zhang WJ. 2011. Simulation of arthropod abundance from plant composition. *Computational Ecology and Software*, 1(1): 37-48

## Tek hücre jel elektroforezi/alkali komet testi ve uygulamaları

Hilal Çavuş<sup>1</sup>, Müge Gidiş<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya, Kütahya, Türkiye

<sup>2</sup>Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya, Kütahya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: muge.gidis@dpu.edu.tr

### Özet

Komet testi, canlılarda üzerinde, tek bir hücredeki DNA hasarlarını tespit edilmesini sağlayan sitogenetik bir tekniktir. Tek hücre jel elektroforezi ya da mikrojel elektroforezi de denilen yöntem, 1970'lerden bu yana teknik olarak bazı gelişmeler göstermiştir. Bu işlemde dokudan ya da hücreden izole edilen DNA, fikse edildikten sonra elektroforetik ortamda yürütülür ve uzunlukları farklı DNA parçalarının (kometler) DNA spesifik ve floresan boya ile boyanması ve çeşitli programlar aracılığıyla görüntülenmesi esasına dayanır. Kometlerin görüntüleri, gözle de değerlendirilebileceği gibi görüntüleme sistemleriyle de analiz edilebilmektedir. Bakterilerden funguslara yüksek bitkilerden omurgalı hayvanlara kadar çok sayıda hücre ve doku üzerinde uygulanabilmektedir. Güvenirliği, hassas olması ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle öncelikli alanı genetik toksikoloji olmak üzere, klinik araştırmalar, çevre kirliliğinin biyolojik olarak izlenmesinde, DNA hasarı ve onarım çalışmalarında, apoptozis araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, komet analizi hakkındaki metodolojik olarak gelişen koşulları ve kullanım alanları ile ilgili bilgi vermektir.

**Anahtar Kelimeler:** Tek hücre jel elektroforezi, alkali komet testi, DNA hasarı,

### Abstract

Komet test is a cytogenetic technique that enables the detection of DNA damages in a single cell on living organisms. The method is also called single cell gel electrophoresis or microgel electrophoresis, has technically improved since the 1970s. In this process, the DNA isolated from the tissue or cell is carried out after fixation in an electrophoretic medium and is based on the staining of DNA fragments (sets) of different lengths (sets) with DNA specific and fluorescent dyes and visualization by various programs. The images of comets can be analyzed by visual systems as well as by visual evaluation. It can be applied on a large number of cells and tissues, from bacteria to fungi, from high plants to vertebrate animals. Due to its reliability, sensitivity and ease of application, it is used in clinical research, primarily in the field of genetic toxicology, in biological monitoring of environmental pollution, in DNA damage and repair studies, in apoptosis research. The aim of this study is to inform about the methodologically developing conditions and usage areas of comet analysis.

**Keywords:** Single cell gel electrophoresis, alkali comet test, DNA damage

### GİRİŞ

Tek hücre jel elektroforezi veya mikrojel elektroforezi olarak da bilinen komet testi, günümüzde çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Endojen ve/veya ekzojen kaynaklı kirlenmelerden dolayı hasarlanan DNA'nın, hücre seviyesinde görüntülenmesi tekniği ile DNA'daki hasarlar tespit edilir. Tek hücre jel elektroforezi ilk defa Rydberg ve Johanson tarafından lenfosit hücre kültürü hücrelerini kullanarak hücre içerisindeki DNA'nın akrinin oranla boyayıp, hasarlı DNA'nın göçünü fotometre aracılığıyla görüntülenmesinde kullanılmıştır. Daha sonra 1984'te Ostland ve Johanson mikrojel elektroforez yöntemini geliştirmişlerdir. Komet testi, hızlı, güvenilir ve görüntülenmesi kolay bir test olmasından dolayı DNA hasarının tespit edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılan yöntemdir (Fairbairn ve ark., 1995; Ostling ve Johanson 1984; Kumarel ve ark., 2009; Rojas ve ark., 1999).

Alkali komet testinin temel prensibi dokudan izole edilen DNA'nın, mikroskop lamı üzerinde ince agaroz gömülerek, lizis uygulamasından sonra hücre içindeki DNA moleküllerinin elektroforetik ortamda yürütülmesiyle farklı uzunluklarda kometlerin (comet: kuyruklu yıldız) oluşturduğu kuyrukların belirlenmesine dayanır. DNA molekülleri, DNA spesifik boya ile boyanarak ve floresan boyası yoğunluğuna bağlı olarak kometlerin uzunlukları tespit edilir. Günümüzde komet testi nötral pH (pH>7-8) ve alkali pH (pH>13) olarak iki farklı şekilde yapılmaktadır, işlemler temelde aynıdır fakat lizis ve elektroforez

tamponunun pH'ı kullanılmaktadır. Nötr pH'da çift zincir kırıklarını tespit etmek sınırlı olduğundan, alkali koşullarda yapılan komet testi daha kullanışlıdır (Dikilitaş ve Koçyiğit., 2010; Tice ve ark., 2000).

DNA hasarının belirlenmesinde, sadece genotoksik ya da mutajenik maddeler değil, DNA üzerinde hasar oluşturan oksidatif stres veya radikal türlerin etkileşiminde, tek ve çift zincir kırıkları, bakteri onarım enzimlerin (endonükleaz III, urasil-DNA glikozilaz) önemini anlaşılması, apoptosisin ya da nekrosisin indüklenmesinde, sperm kalitesinin belirlenmesinde klinik araştırmalardan genetik toksikoloji alanında yapılan çalışmalara kadar geniş ölçüde kullanılmaktadır (Kumarel ve ark., 2009; Dinçer ve Kankaya, 2010; Atkaya, 2014).

*In vitro*, *in vivo*, *ex vivo* olarak da yapılabilen bu metod, bakteriler, funguslar, algler, yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler, omurgalılar ve omurgasız hayvanlar üzerinde uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından izlemede hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir metoddur (Çok ve ark., 2011; Önen ve ark., 2017).

## MATERYAL VE METOT

Singh ve ark. (1988) tarafından geliştirilen bu teknik alkali koşullarda (pH>13) elektroforez içeren mikrojel ortamında yapılmaktadır. Hücrelerin hazırlanması, lamların agaroz jel ile kaplanması, lizis, alkali ortamda DNA sarmalının açılması, elektroforez, nötralizasyon, boyama ve görüntüleme olmak üzere toplamda sekiz temel aşamadan oluşmaktadır. Örneklerle birlikte pozitif kontrollerinde yapılması deneyin güvenilirliği açısından önemlidir. Kontrol hücrelerde DNA hasarını oluşturmak için, iyonize radyasyon, hidrojen peroksit, bleomisin, metilmetansülfonat (MMS) (Cotelle ve Féard, 1997) gibi ajanlar direk olarak DNA'daki fosfodiester bağlarını koparırlar (Green ve ark., 1996).

**Hücrelerin hazırlanması:** Kültüre edilmiş hücreler, tam kan hücreleri, primer insan fibroblastları, doku örnekleri materyal olarak kullanılabilir. Bu hücrelerin hazırlanmasında farklı işlemler uygulanmaktadır (Atkaya, 2014). Tek hücre jel elektroforezi için genellikle sucül vertebrat ve invertebratlarda yapılır, bunlar vertebratlardan balıklar, amfibiler ve kuşlar ile invertebratlardan krustes ve mollusklardır. Tam kan ise lenfosit ve eritrositleri içermesinden dolayı PBS ile seyreltilerek kullanılır (Lee ve Steinert, 2003). Diğer canlılardan alınan tam kan örnekleri heparinize kan kültürüne alınır ve düşük erime noktalı agarozla karıştırılarak, lenfosit ve mononükleer hücreler histopak ile izole edilerek kullanılır (Dinçer ve Kankaya, 2010). Dokularda ise örneğin balıklarda birçok doku kullanılabilir ancak dokunun mitotik olarak aktif olmayan canlı hücreler olması önemlidir. Balıklarda karaciğer dokusu, sperm, solungaç dokusu ve böbrek dokuları komet analizi için kullanılabilir. Solungaç dokusu için iki defa PBS ile yıkanır. Soğuk EDTA, %10 dimetil sülfoksit (DMSO), homojenizasyon tamponu (pH 7.0-7.5) eklenir. Doku makasla küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar, homojenize edilir ve tampon içinde santrifüj edilir (Güner ve Muranlı, 2013). İnsan fibroblastları Dulbecco mediumu ile tek tabakalı yetişmiş hücreler, FBS ile desteklenerek ve diğer ek maddeler eklenerek kullanılabilir (Klaude ve ark., 1996). Murin lökemik lenfoblastları LY-R ve LY-S süspansiyon kültürü için Fischer's medium ve %8 bovin serum kullanılarak asenkronize hücreler yetişir (Kruszewski ve ark., 1994).

**Lamların agaroz jel ile kaplanması:** Mikroskop lamına %0.5'lik düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile kaplanarak bir gecede donması sağlanır. Buna ön kaplama denir. Daha sonra %0.5'lik normal erime noktalı agaroz (NMA) ile hazırlanan hücreler karıştırılır ve lam üzerine yayılır. Böylece iki katman arasında olan hücreler sandviç yapısını oluşturur. Kullanılan iki tip jel katmanları vardır; bunlar tek katmanlı ve sandviç jel katmanıdır. Sandviç jel üç katmanlıdır. Agaroz konsantrasyonu hücrelerin görüntülenmesinde çok önemlidir (McKelvey-Martin, 1993; Green ve ark., 1996; Rojas ve ark., 1996).

Bu aşamadaki amaç deney bitimine kadar jelin bozulmadan kalabilmesi ve mikroskop incelemesinde net bir görüntü verebilmesini sağlamaktır (Green ve ark., 1996).

**Lizis aşaması:** Bu aşamada lamlar tamamen donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat boyunca bekletilir. Lizis çözeltisi ile hücre membranı parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılmış olur. DNA az miktarda bulunan non-histon proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapıda kalır. Lamlar bu çözeltide birkaç kez yıkanarak hücre artıkları ve kalan tuz, deterjan uzaklaştırılır (Rojas ve ark., 1996). Nötral lizis solüsyonuyla çift zincir kırıklarını, alkali lizis solüsyonu ise tek zincir kırıklarını tespit eder. En çok kullanılan nötral lizis solüsyonudur (Rojas ve ark., 1999). Mc Kelvey - Martin ve ark. (1996), lizis solüsyonuna N-laurilsarkosin eklenmesiyle sonuçta bir değişiklik olmadığını tespit etmişlerdir (1993). Rojas ve arkadaşları(1996), protein kalıntılarının uzaklaştırılması için proteinaz K eklemişlerdir.

**Alkali ortamda DNA çift sarmalının açılması:** Bu aşamaya kadar ki işlemleri tamamlanan lamlar elektroforez tamponunda DNA çift sarmalının açılması için 20 dakika bekletilir ve Pre-elektroforez aşaması olarak adlandırılır. Bu elektroforez tamponu deterjan içermeyen, tuz konsantrasyonu düşük, pH'ı (pH<12.3)

yüksek özelliklere sahiptir. Bu dengeleme için uygun bir tampondur. Sıcaklığın 15 °C olması maksimum ayrımın sağlanması için gerekir. Bu aşamada yapılacak değişiklikler önemlidir. Elektroforez süresinin uzatılması ya da voltajın yükseltilmesi kuyruk uzunluğuna etki eder. Dengeleme süresi uzadıkça duyarlılık artar, kontrol grubunda da dengeleme ve elektroforez sıcaklığının artması duyarlılığı artırır (Rojas ve ark., 1996; Şekeroğlu ve ark., 2011).

**Elektroforez:** Jel içinde oluşan tek zincirli DNA, alkali koşullarda komet oluşturulması sağlanır. Elektrik akımı uygulandığında anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü (comet) oluşturur. Hasarlı DNA ise hücre çekirdeğinin içinden çıkamamaktadır. DNA'nın sağlam kalan kısmı yıldızın başını, kırık zincirler kuyruğunu oluşturur. Elektroforez işlemi 25V, 300mA akımda ve 25 dakika süreyle uygulanır (Tice ve ark., 2000; McKelvey-Martin, 1993). Deneyin bu aşaması deneyin amacına göre ve hücre tipine göre farklı sıcaklıklarda yapılabilir (Hartmann ve ark., 2003; Singh ve ark., 1988).

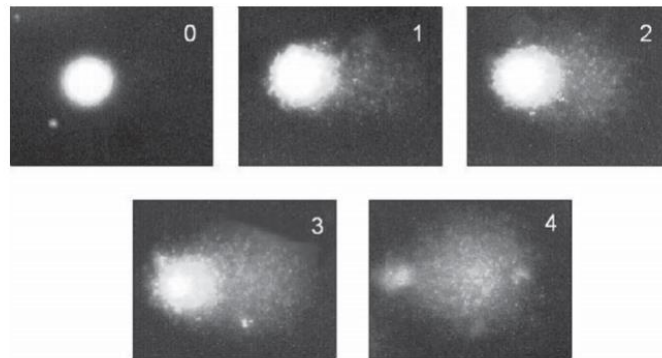
**Nötralizasyon:** Elektroforezden sonra yapılan bu işlemde lamalar kuru, temiz bir zemin üzerine alınır. Kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamalar nötralizasyon tamponuyla (Trisma base pH 7.5) yıkanır. Bu işlem 5'er dakika 3 kez yapılır (Green ve ark., 1996; Şekeroğlu ve ark., 2011; Hartmann ve ark., 2003; Singh ve ark., 1988).

**DNA'nın Boyaması:** Her preparat üzerine floresan renk vermesi için etidyum bromür gibi DNA spesifik boya ile boyandıktan sonra lamelle kapatılır. Bu işlem DNA'nın hasar görmesini engellemek için sarı ışıkta yapılmalıdır. Kuruduktan sonra kometler görüntülenmeye hazır hale gelir. DNA parçaları kuyruklu yıldız, hasarsız DNA ise spot görünümü verir (Green ve ark., 1996; Hartmann ve ark., 2003).

Etidyum bromür dışında komet görüntülemeye kullanılan boyalar, DAPI (diamidino-2-phenylindole), SYBR Green I ve YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer), non-floresans boyama olan gümüş boyama da kullanılır (3; Green ve ark., 1996; Singh ve ark., 1988).

**Cometlerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi:** Lamalar boyandıktan sonra rastgele seçilen 100 kadar hücrenin mikroskop altında sayımı yapılır. Ostling ve Johanson (1984)'a göre kometlerin görüntülenmesi için, floresan işaretli hücreleri otoradyografiyi kullanılabilir. Günümüzde ise kometlerin sayılması için görsel analiz veya bilgisayarlı görüntü analizi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Görsel analizde insan gözüyle farklı hasar derecelerindeki kometler kolayca ayırt edilebilir (Lee ve Steinert, 2003). Buna göre kometler 5 kategoriye ayrılır; 0 ile 4 arası kategori kuyuksuz olan spotlar yani hasarsız DNA'yı gösterir, 2, 3, ve 4. kategoriye kadar yavaş yavaş komet kuyukları artmaya başlar (Şekil 1). 5. kategori ise komet uzunluğu en fazla olan yani hasarlı DNA'yı gösterir (Collins 2004; Meşe ve ark., 2017).

Floresan mikroskobu üzerine yerleştirilen kapalı sistem dijital kamera ile bağlanarak kometlerin görüntüleri analiz edilir (Akkaya, 2018). Alkali Komet testi bilgisayarlı analizinde, çeşitli software ve hardware programları kullanılmaktadır (Lee ve Steinert, 2003). Bazı şirketler mikroskoba bağlı, otomatik olarak analiz programları ile analiz yapmaktadır, örneğin Comet IV ve Casplab programları gibi. Bunun dışında kullanılan diğer programlar ise Fenestra Comet Software (Hughes ve ark., 1997), Image Analyser Colormorph (Roser ve ark., 2001), Lucia 4.11 image analysis system (Güner ve Muranlı, 2013), Comet Assay III image analysis system (Çok ve ark., 2011), image analysis CASSy software (Pastor ve ark., 2001), Comet Analysis Software Version 2.2, Kinetic Imaging Ltd. (Collins ve ark., 1995)'dir. Kometler bilgisayarlı görüntü analizinde kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti, kuyruk yoğunluğu kafa DNA yüzdesi gibi parametreleri hesaplayarak ölçüm tamamlanmaktadır (Akkaya, 2018).



**Şekil 1.** DAPI ile boyanan lenfosit hücrelerinin komet görüntüleri. DNA hasarının 0-4 arası kategorileri.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Genetik toksikoloji

Genetik toksikoloji, ksenobiyotiklerin DNA üzerinde meydana getirdiği mutasyonlar, kromozomlarda oluşturdukları aberasyon ve kırılmalara bağlı olarak gerçekleştirilen araştırmaları kapsamaktadır (Önen ve ark., 2017; Vural, 2005). Dahası DNA üzerindeki bu değişiklikler, nükleus, kromozom ve DNA yapısında oluşan eklentiler, gen mutasyonları, kromozom anormalileri, DNA kırıkları, anoploidi gibi bozuklukları kapsayan bir terimdir (Bedir ve ark., 2004). Geçmişten günümüze sanayi ve endüstrideki ilerlemeler ile beraber; kimyasal kullanımı artmış, genotoksik ve karsijenik bileşiklerin birikmesine neden olmuştur. Genetik toksikolojide alkali komet analizini önemi büyük olup, erken uyarı sistemi olarak görev yapar (Bedir ve ark., 2004; Güner ve Muranlı, 2013). 1970'li yıllardan itibaren yapılan komet testi, aslında öncelikli araştırma alanı olan kanser araştırmaları için yapılmaktaydı. Bugün ise daha çok bazı ekosistemlerde bulunan canlı organizmaların DNA seviyesinde hasarını tespit etmektedir (Bedir ve ark., 2004). Bakterilerde yapılan ilk genetik hasarın belirlenmesi alkali komet analizi ile *Escherichia coli* JM101'de X-ray ışınları kullanılarak DNA zincir kırıkları belirlenmiştir (Güner ve Muranlı, 2013). Bitkilerde daha çok *Vicia faba* ve *Allium cepa* kökünden veya yaprak, sürgün kısımları kullanılarak genotoksik etkileri tek hücre jel elektroforezi ile belirlenebilmektedir (Dhawan ve Bajpayee, 2009). Örneğin Angelis ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *Vicia faba* kökü kullanarak alkali komet analizi ile meristematik çekirdekte zincir kırıklarını ve abazik bölgelerin MMS ve MNU adaptasyonu araştırılmıştır. Bir alg olan *Chlamydomonas reinhardtii* komet testi yapılarak DNA hasarına neden olan genotoksik kimyasalların oksidatif strese neden olduğunu bir çalışma yapılmıştır (Erbes ve ark., 1997). İnsanlarda komet analizi, çevre kirliliği meydana getiren genotoksikantların riskinin belirlenmesinde iyi bir metottur. Kaynak işçilerinde metal birikimi maruziyetine bağlı olarak komet testi ile DNA hasarı tespit edilmiştir (Aksu, 2018). Birçok tatlı su ve tuzlu sularda yaşayan balık türünde komet testi *in vivo*, *in vitro* DNA hasarı çalışmaları yaygın olarak yapılmaktadır. Çünkü DNA hasarı, sucul hayvanlarda büyümede gerileme, abnormal gelişme, embriyo, larva ve yetişkinlerin hayatta kalmasında azalma bununla ilişkilidir (Lee ve Steinert, 2003). Mogan Gölü'nde *C. carpio* üzerinde yapılan genotoksik deneylerde sucul ekosistemin bu canlılar üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Çok ve ark., 2011). Ve daha birçok balık türü üzerinde genotoksik çalışmalar Frenzilli ve ark., (2009) tarafından yapılmıştır.

### Klinik Araştırmalar

Alkali komet analizi birçok memeli hücresinde olduğu gibi insan hücrelerinde de çeşitli ajanların tetiklediği DNA hasarını ve onarımını izlediği çalışmalarda kullanılmaktadır. Klinik araştırmalarda bazı hastalıkların patolojik mekanizmalarını anlamada önemli bilgiler kazandırmaktadır (Dinçer ve Kankaya, 2010; Şekeroğlu ve ark., 2011). Bazı genetik hastalıkların prenatal tanısında (Alapetite ve ark., 1997), kanser hastalarının DNA hasarını, onarım seviyelerini tespit etmede ve kansere duyarlılığının belirlenmesinde (Rajeswari ve ARK., 2000; Brozoviç ve ark., 2009), Alzheimer, Parkinson (Akkaya, 2018; Alam ve Jones, 2014), katarakt (Osnes-Ringen ve ark., 2013; Sorte ve ark., 2011), romatoid artrit-sistemik lupus eritematozus (McCurdy ve ark., 1997; Altındağ ve ark., 2007), polikistik over sendromu (Dinçer ve ark., 2005), osteoartrit (Altındağ ve ark., 2007), diabetes mellitus (Şardaş ve ark., 2001; Dinçer ve ark., 2003), sigara tiryakilerinin DNA hasarı çalışmaları (Betti ve ark., 1994; Dinçer ve ark., 2003), kadınlarda postmenopozal hormon replasman tedavisi (Ozcagli ve ark., 2005), reproduktif tedavide erkek infertilitesinde sperm DNA kalitesi gibi birçok hastalıkta kullanılmaktadır (Evenson ve ark., 2002). Oksidatif stresin bir sonucu olarak, diabetik hastalarda hiperglisemia, lokal doku hasarı ve değişmiş antioksidan durumu DNA hasarına neden olur (Baynes, 1991). Bunun dışında üriner mesane kanseri (McKelvey-Martin ve ark., 1997), parazitik enfeksiyonla birlikte oluşan besin eksikliği (Betancourt ve ark., 1995), hücredeki oksidatif stresi saptamada (Duthie ve ark., 1996; Collins, 2009), antioksidan araştırmaları (Green ve ark., 1994) ve ilaçların potansiyel genotoksik etkilerini piyasaya verilmeden önce belirlenmesine (Atkaya, 2014; Sorte ve ark., 2011; Çobanoğlu ve ark., 2017) kadar geniş ölçüde yer kaplamaktadır. Sitogenetik bir teknik olan tek hücre jel elektroforezi, DNA hasarını hassas bir şekilde sağladığından dolayı bu alanda da kullanılmaktadır (Kassie ve ark., 2000).

### Çevre Kirliliğinin Biyogöstergesi/Ekotoksikolojik Çalışmalar

Dünyanın birçok şehrinde başlayan hızlı kentleşme, trafik, hava kirliliği, fabrika atıkları ve daha birçok kirleticinin moleküler düzeyde sebep olduğu DNA hasarının, analiz edilmesi gerekir. Bu yüzden organizmada kalıcı hücre hasarlanmasının önlenmesi için genetik materyalin durumu hakkında bilgi veren bir test yapılmalıdır ki bu da alkali komet testidir (Sriussadaporn ve ark., 2003). Hem insan popülasyonunun sağlığı hem de sucul ekosistem üzerinde çevredeki genotoksik ajanların belirlenmesinde bir biyoizlem testi olarak sıkça kullanılmaktadır (Frenzilli ve ark., 2009).

Ekotoksikolojik parametreler, canlıların popülasyon seviyelerine etkileri, üreme, gelişimsel, fizyolojik, biyokimyasal ve hormonal toksikoloji çalışmalarını kapsar. Ekotoksikolojide komet testi, çevre kirliliğinin biyomarkır olarak otoriteler tarafından önerilmektedir (Jha, 2008). Su ekosisteminde balık türlerinde kimyasalların ve çevresel kontaminantları komet analizi ile alkali işaretli bölgeler, DNA tek zincir kırıkları, DNA çapraz bağlantıların neden olduğu DNA hasarı tespit edilebilmektedir (Sriussadaporn ve ark., 2003). Alkali komet testinin yapılmasıyla kimyasal ya da metabolitlerin, proteinlerin ya da DNA kalıntılarının DNA'da getirebileceği muhtemel hasarın düzeyi belirlenebilmektedir (Møller, 2006). Steinert ve ark.'nın (1998) San Diego Körfezi'ndeki midyeler üzerinde alkali komet testi ile DNA hasarını ve ağır metallerin birikimini yaparak körfezdeki kirlilik düzeyini saptamışlardır. Çavaş ve Könen (2007), *C. auratus*'u *in vivo* ortamda glifosata maruz bırakarak DNA hasarını komet analizi ve mikronükleus analizi yaparak belirlemişlerdir. Genellikle bu alanda bir maddeye maruz kalan canlı organizmanın genetik materyaline etkisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Frenzilli ve ark., 2004; Nagpure ve ark., 2015).

#### **DNA Hasarı ve Onarım Çalışmaları**

Alkali komet analizi ekzisyon DNA onarımında biyokimyasal inceleme için kullanılır. İyonize radyasyon, hidrojen peroksit, ultraviyole radyasyon gibi ajanlar DNA kırıklarını indüklerler. Bu şekilde DNA onarım aktivitesinin ölçülmesi sağlanır. İlk aşamada ekzisyon onarımında spesifik enzimlerle (örneğin endonükleazlar) keserek zincir kırığı oluşturur, ancak bu şekilde olan kesikler geçicidir bunun nedeni ise kesiklerin hız sınırlayıcı bir basamak olmasıdır, onarım ve ligasyona ara verildikten sonra hızlı bir şekilde gerçekleşir. Sonrasında ortama deoksiribotriofosfatlar eklenip inkübe edilir, kırıklar birleştirilir ve onarım gerçekleştirilir (McKelvey-Martin, 1993; Nagpure ve ark., 2015). Xeroderma pigmentosum hastalığında ekzisyon onarımında donör lenfositlerinde normal lenfositlere göre eksik olduğunu göstermişlerdir, bunun sonucu olarak Xeroderma pigmentosum ve benzer diğer sendromların hastalık tanısında bir araç olabileceğini önerilmiştir (Green ve ark., 1992). Gedik ve ark.'nın çalışmalarında HeLa hücrelerinde UV radyasyonla DNA hasarı oluşturulmuş, aphidicolin ile inhibe edilip edilmeyeceği tek hücre jel elektoroforeziyle araştırmışlardır (Gedik ve ark., 1992). Alkali komet testi, özellikle bakteriyel enzimleri kullanarak DNA kırıklarının hasarı ve geri dönüşümünün ölçülmesini sağlar (Møller, 2006). Bu yüzden oksidatif hasarın büyük bir sınıfını, alkilasyon ve UV ışını ile indüklenen fotoürünlerini belirlemektedir. Okside pirimidinler endonükleaz III enzimi ile, pürinler formamidopirimidin DNA glikozilaz (FPG) enzimi ile kullanılarak tespit edilmektedir. Bunların dışında çift ve tek zincir kırıkları farklı protokoller uygulanarak tespit edilebilir (Singh, 2000).

#### **Apoptozis**

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, DNA'daki çift zincir kırıklarını elektroforez ile belirlemede iyi bir yöntemdir. Alkali veya nötral komet ile apoptozis ve nekrozu birbirinden ayırt edilmesine yardım eder (Dinçer ve Kankaya, 2010; Marks ve ark., 1991; Elia ve ark., 1994). Her iki durum da hücre ölümünü nitelese de apoptoz nekroza daha geç DNA degradasyonuna uğrar (Singh, 2000). Kizilain ve ark.'larına göre, apoptoz için kometlerin baş kısmı küçük, kuyruk kısmı geniştir, nekroza kometlerin yapısı ise ince ve uzamış bir kuyruk vardır, rastgele DNA degradasyonu görülür (Kizilian ve ark., 1999). İmmun sistem çalışmalarında sıkça kullanılan apoptozis, kendi kendine reaksiyon gösteren lenfosit delesyonu ve sitotoksik T lenfositlerinde rolü büyüktür. Ayrıca NK hücreleri ve sitotoksik T hücrelerini apoptozu indüklemeye gösterilmektedir. Gopalakrishna ve Khar (1995) tarafından yapılan araştırmalar ile AK-5 tümör hücrelerini, NK hücrelerindeki indüklenen ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) ile komet analizi kullanılarak, hücre ölümünü kontrol hücrelere göre daha fazla komet uzunluğu olduğunu göstermişlerdir. Komet analizi ve flow sitometri ile apoptotik TK6 insan lenfosit hücrelerinin apoptozun belirlenmesi kıyaslanmıştır. Sonuç olarak apoptozun ölçülmesinde komet, daha hassas bir metod olarak tanımlanmıştır (Olive ve ark., 1993). Tek hücre jel elektroforezi, bazı insan hastalıklarının apoptotik mekanizmalarının anlaşılması, klinikte, tek hücreli jel elektroforezi, çoğu apoptoz indüksiyonu ile öldürülen bazı tümör tiplerinin radyo veya kemoterapilerle tedavisini yönetmede faydalı olabilir (Fairbairn ve ark., 1995).

#### **SONUÇ**

Komet analizi yöntemi bilimsel alanda çok sık kullanılan ve gün geçtikçe kullanım alanı genişleyen DNA hasarını tespit etmeye yarayan bir testtir. Komet analiz ile ilgili yapılan çalışmaların bilim dünyasına duyurulmasıyla ilgili çok fazla akademik yayın yapılmıştır. Komet analizi ComNet (Comet Network) projesi ile network sağlamak, komet analizinin sık kullanılan güvenilir bir biyomarkır olmasını ve insan popülasyonlarının sağlığı için uluslararası toplantılar düzenlenmektedir (Collins ve ark., 2012). Benzer şekilde, International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) *in vivo* comet assay çalışma grubu da komet

analizindeki protokolünü geliştirmek ve altın standartlara ulaştırmak için uğraşan, düzenli olarak toplanan uluslararası bir ajanstır (Burlinson ve ark., 2007; Hartmann ve ark., 2003).

Sonuç olarak komet testi, DNA hasarını ölçmede, basit, hızlı ve güvenilir bir test olduğundan dolayı bu testin geliştirilmesiyle başta genotoksikoloji, klinik araştırmalar ve biyoizleme çalışmalarında sıkça seçilip kullanılmasına ilişkin akademik çalışmalar hızla devam etmektedir.

## Kaynaklar

- Akkaya, Ç. 2018. Alzheimer hastalarında oksidatif DNA hasarı ve redoks statüsünün değerlendirilmesi/ İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, İstanbul, 54203.
- Aksu, İ., 2018. Kaynak İşçilerinde Mesleki Maruziyete Bağlı Olası Toksik Etkilerin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Ankara, 108s.
- Alam, G., Jones, B. C. 2014. Toxicogenetics: in search of host susceptibility to environmental toxicants. *Front. Genet.* 5.
- Alapetite, C., Benoit, A., Moustacchi, E., Sarasin, A. 1997. The Comet Assay as a Repair Test for Prenatal Diagnosis of Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy. *Journal of Investigative Dermatology* 108: 154–159.
- Altındağ, Ö., Koçyiğit, A., Çelik, N., Çelik, H., Soran, N. 2007. DNA Damage and Oxidative Stress in Patients with Osteoarthritis: a Pilot Study. *Romatizma/Rheumatism* 22.
- Altındağ, O., Karakoc, M., Kocyiğit, A., Celik, H., Soran, N. 2007. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* 40: 167–171.
- Angelis, K. J., McGuffie, M., Menke, M., Schubert, I. 2000. Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36: 146–150.
- Atkaya, D. H. Ç. 2014. Yeni Depresyon ve/veya Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu Tanısı Almış Erişkinlerde Psikotrop İlaçların (Psikosültan, Antipsikomatik, Antidepresan İlaçların) Periferik Lökositlerde Erken DNA Hasarına Etkisinin Comet Analizi Kullanılarak İncelenmesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Denizli, 148.
- Baynes, J. W. 1991. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes* 40: 405–412.
- Bedir A., B. Bilgici, Z. Yurdakul, B.Ş. Gürsel, M. Alvir, 2004. DNA hasarı analizinde  $\mu$ -FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3): 97-103.
- Betancourt, M. *et al.* 1995. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 331: 65–77.
- Betti, C., Davini, T., Giannessi, L., Loprieno, N., Barale, R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307: 323–333.
- Brozovic, G. *et al.* 2009. Genotoxicity and Cytotoxicity of Cisplatin Treatment Combined with Anaesthetics on EAT Cells In Vivo. *ORT* 32: 337–343.
- Burlinson, B. *et al.* 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 627: 31–35.
- Collins, A. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681: 24–32.
- Collins, A. *et al.* 2012. Launch of the ComNet (comet network) project on the comet assay in human population studies during the International Comet Assay Workshop meeting in Kusadasi, Turkey (September 13–16, 2011). *Mutagenesis* 27: 385–386.
- Collins, A. R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 26: 249–252.
- Collins, A. R., Ai-guo, M., Duthie, S. J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair* 336: 69–77.
- Cotelle, S., Féraud, J. F. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246–255.
- Çavaş, T., Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22: 263–268.
- Çobanoğlu, H., Coşkun, M., Coşkun, M., Çayır, A. 2017. Evaluation of genotoxic potential of pemetrexed by using in vitro alkaline comet assay. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21: 544–544.



- Çok, İ., Ulutas, O. K., Okusluk, Ö., Durmaz, E., Demir, N. 2011. Evaluation of DNA Damage in Common Carp (*Cyprinus carpio L.*) by Comet Assay for Determination of Possible Pollution in Lake Mogan (Ankara) *The Scientific World Journal* 11: 1455–1461.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25: 5–32.
- Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi ile DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* 14: 77–89
- Dincer, Y., Akcay, T., Erdem, T., Saygili, E. I., Gundogdu, S. 2005. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 65: 721–728.
- Diñçer, Y., Akçay, T., İlkova, H., Alademir, Z., Özbay, G. 2003. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 527: 49–55.
- Diñçer, Y., Kankaya, S. 2010. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 30: 1365–1373.
- Diñçer, Y., Saygili, E. İ., Akçay, T. 2003. Sigaranın DNA Hasarı ve Kan Glutasyon Düzeyi Üzerine Etkisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 23: 108–111.
- Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A., Collins, A. R. 1996. Antioxidant Supplementation Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *Cancer Res* 56: 1291–1295.
- Elia, M. C. *et al.* 1994. Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: Analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 24: 181–191.
- Erbes, M., Weßler, A., Obst, U., Wild, A. 1997. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 448–458.
- Evenson, D. P., Larson, K. L., Jost, L. K. 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology* 23: 25–43.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O’Neill, K. L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1): 37–59.
- Frenzilli, G. *et al.* 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552: 187–195.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681: 80–92.
- Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., Collins, A. R. 1992. Single-cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UV-C Damage and Its Repair in Human Cells. *International Journal of Radiation Biology* 62: 313–320.
- Gopalakrishna, P., Khar, A. 1995. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 30: 69–73.
- Green, M. H. L. *et al.* 1992. UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique. *Mutation Research/DNA Repair* 273: 137–144.
- Green, M. H. L. *et al.* 1994. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutation Research/DNA Repair* 316: 91–102.
- Green, M. H. L., Lowe, J. E., Delaney, C. A., Green, I. C. 1996. [23] Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods in Enzymology* 269: 243–266.
- Güner, U., Muranlı, F. D. G. 2013. Balıklarda Tek Hücre Jel Elektroforezi (Comet Assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 3: 103–114.
- Hartmann, A. *et al.* 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45–51.
- Hughes, C. M., Lewis, S. E. M., McKelvey-Martin, V. J., Thompson, W. 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 374: 261–268;13.
- Jha, A. N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 207–221.
- Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463: 13–31.
- Kizilian, N. *et al.* 1999. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques* 27: 926–930.

- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair* 363: 89–96.
- Kruszewski, M., Green, M. H. L., Lowe, J. E., Szumiel, I. 1994. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 308: 233–241.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., Jha, A. N. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25: 53–64.
- Lee, R. F., Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544: 43–64.
- Marks, D. I., Fox, R. M. 1991. DNA damage, poly (ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as a potential common pathway of cytotoxic drug action. *Biochemical Pharmacology* 42: 1859–1867.
- McCurdy, D., Frias, S., Wang, Z. 1997. Delayed Repair of DNA Damage by Ionizing Radiation in Cells from Patients with Juvenile Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *Radiation Research* 147: 48–54.
- McKelvey-Martin, V. J. *et al.* 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 288: 47–63.
- McKelvey-Martin, V. J. *et al.* 1997. Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2) human sperm and male infertility. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375: 93–104.
- Meşe, A. K., Erdamar, A., Iseri, O. D. 2017. Image analysis for single cell gel electrophoresis. in 2017 25th Signal Processing and Communications Applications Conference (SIU) 1–4 (IEEE).
- Møller, P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98: 336–345.
- Nagpure, N. S. *et al.* 2015. Assessment of genotoxic and mutagenic potential of hexavalent chromium in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Drug and Chemical Toxicology* 38: 9–15.
- Olive, P. L., Frazer, G., Banáth, J. P. 1993. Radiation-Induced Apoptosis Measured in TK6 Human B Lymphoblast Cells Using the Comet Assay. *Radiation Research* 136: 130–136.
- Osnes-Ringen, Ø. *et al.* 2013. DNA damage in lens epithelium of cataract patients in vivo and ex vivo. *Acta Ophthalmologica* 91: 652–656.
- Ostling, O., Johanson, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291–298.
- Ozcagli, E., Sardas, S., Biri, A. 2005. Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Maturitas* 51: 280–285.
- Önen, Ö., Kiliçle, P. A., Doğan, A. N. C. 2017. Baharat Olarak Kullanılan Bazı Bitki Ekstraktlarının Memeliler Üzerindeki Genotoksik-Antigenotoksik Etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 10: 103–115.
- Pastor, N. *et al.* 2001. Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis* 16: 219–223.
- Rajeswari, N. *et al.* 2000. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis* 21: 557–561.
- Rojas, E., Lopez, M. C., Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722: 225–254.
- Rojas, E., Valverde, M., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 370: 115–120.
- Roser, S., Pool-Zobel, B.-L., Rechkemmer, G. 2001. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 497: 169–175.
- Singh, N. P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455: 111–127.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184–191.
- Sorte, K. *et al.* 2011. Quantitative assessment of DNA damage directly in lens epithelial cells from senile cataract patients. *Mol Vis* 17: 1–6.

- Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K., Simazaki, D. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 541: 31–44.
- Steinert, S. A., Streib-Montee, R., Leather, J. M., Chadwick, D. B. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399: 65–85.
- Şardaş, S., Yilmaz, M., Öztok, U., Çakir, N., Karakaya, A. E. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 490: 123–129.
- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V., Kolören, Z. 2011. The In Vitro Alkaline Comet Assay in Genetic Toxicology. *TUBAV Bilim Dergisi* 3: 221-229.
- Tice, R. R. *et al.* 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206–221.
- Vural N. 2005. Genetik Toksikoloji. In: Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73. Ankara, pp 115- 128.

## The effect of 24-epibrassinolide on the development of spinach (*Spinacia oleracea* L. var. Matador) seedlings

S. Seven<sup>a</sup>, S. Sağlam-Çağ<sup>b</sup> and H. Özel<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Istanbul Medeniyet University, Göztepe Education and Research Hospital, Microsurgery Education and Research Laboratory, Istanbul, Turkey

<sup>b</sup>Department of Botany, Faculty of Science, Istanbul University, Süleymaniye, Istanbul, Turkey

\*e-mail: humeyra.ozel@ogr.iu.edu.tr

### Abstract

Apart from auxin, gibberellin, cytokine, abscisic acid and ethylene, which are known to regulate plant growth and development, strong evidence has been obtained to add brassinosteroids to this group in recent years. Brassinosteroids affect different processes such as plant growth and development, seed germination, rhizogenesis, flowering, senescence, abscission and ripening.

In this study, the effect of epibrassinolid, which is an active form of brassinosteroid, on growth and development of spinach seedlings was investigated. For this purpose, 15-day spinach seedlings (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) were taken into Hoagland solution and divided into 2 groups. First group as a control group (Hoagland) and second group as an experimental (treated) group (Hoagland +24 EBL) was called.  $10^{-9}$  M 24-eBL was applied to the treated group seedlings until 45th days (for 30 days) by spraying method (all leaves except root). The control group was sprayed with distilled water only. In the following period, biochemical analyzes were performed on the leaves of the seedlings harvested on the 45th day.

As a result of the analysis, the eBL applied experimental group compared to the untreated control group; fresh weight, total soluble protein and total chlorophyll content decreased in the treated seedlings. Peroxidase and superoxide dismutase enzyme activities increased, and membrane permeability changes were observed.

This study was designed to investigate the effect of epibrassinolidine on the development of seedlings.

**Keywords:** Spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador), Hoagland, 24-Epibrassinolide, Antioxidative enzyme.

### INTRODUCTION

Plant growth is usually expressed as weight gain (fresh or dry weight), which varies with photosynthesis and respiration rate. It also depends on obtaining mineral elements by absorption and assimilation. In the vegetative period, the irreversible growth process continues by adding new substances to the structures of the plant or plant organs. In the generative period, flower, fruit and seed production takes place.

Senescence is programmed cell death, which is based on the loss of vitality during the plant growth process. Materials taken from the leaves are used for flower and fruit growth. Thus, the plant's life process is supported under difficult conditions. There are internal (hormones) and external factors (biotic and abiotic) that affect the growth of the plant. The main hormones that affect growth are auxins, gibberellins, cytokinins, ethylene, abscisic acid and brassinosteroids which have been discovered in recent years.

A new class of plant hormones, brassinosteroids (BRs) are common in plants and play a role in regulating growth (Clouse S. et al. 1999; Haubrick LL et al. 2006) The researchers found that an oily extract from rapeseed (*Brassica napus*) pollen caused an excessive extension of bean internodes (Mitchell, J.W et al. 1970). Since these growth-promoting compounds were extracted from the genus *Brassica*, these compounds were termed "brassins". As a result of the studies carried out in 1979, active compound brassinolide (BL) was isolated (Grove, M.D.S et al. 1979). The acceptance of brassinosteroids as hormones began in the 1990s with genetic studies at *Arabidopsis thaliana* (Savaldi-Goldstein, S. et al. 2006). Brassinosteroids have physiological effects on various plant activities such as cell division, cell growth, vascular differentiation, pollen tube growth, ethylene production, senescence, enzyme activation, gene regulation, protein and nucleic acid biosynthesis, photosynthesis in addition to promoting growth (Clouse, S.D. et al. 1998; J.M. Sasse et al. 2003; Michelini FM et al. 2004). BRs promote growth by affecting both cell division and cell extension (Müssig C. et al. 2005) They increase fruit set in tomatoes (Kamuro Y. et al. 1999), delay leaf absorption (Iwahori S et al. 1990), promote xylem differentiation and rooting (Oh, M. H et al. 1990). On the other hand, it has been reported that brassinosteroids may cause cellular responses such as pollen tube growth, epinasty, root inhibition, induction of ethylene biosynthesis, proton-pump activation and regulation of gene expression (Oh, M. H et al. 1990; Mandaya NB et al. 1988).

It was observed that the application of brassinosteroid increases the amount of nucleic acid and protein (Anuradha, S. et al. 2001; Arora P. et al. 2010b). The exogenous application of brassinosteroid appears to

interact both positively and negatively with other important signaling pathways, including those regulated by auxin and ethylene (Amzallag, G.N. et al. 2006) Brassinosteroids provide the continuity of growth and development by interacting and cross-talking with other plant hormones (Choudhary S. P et al. 2012b). It has been reported that BR application increases auxin transport (Li L. et al. 2005). Although many of the specific signals required for the initiation of BR biosynthesis are still unknown, auxin has been found to act as a signal for the biosynthesis of BR in the Arabidopsis plant (Y. Chung et al. 2011).

Spinach (*Spinacia oleracea* L.) is an annual with rosette-shaped body structure that can grow efficiently in a cool climate. Spinach is an important food source for human health because it contains important vitamins and minerals. Also, it can be marketed in frozen form. The fact that it is the first food that comes to mind in the nutrition of anemic patients, that it can be consumed easily in the form of salad and that the magnesium content is particularly good shows the importance of this vegetable.

## **MATERIALS AND METHODS**

In this study, various growth parameters (fresh weight, total chlorophyll and soluble protein content and membrane permeability) and antioxidant enzyme activities (Superoxide dismutase, Peroxidase) of spinach (*Spinacia oleracea* var. Matador) seedlings treated with 24-eBL were compared with untreated control groups. **Plant Material; Application 24-Epibrassinolide (24-eBL).**

In this research, *Spinacia oleracea* L. cv. Matador – which is widely grown vegetable in Turkey- was used as plant material and eBL (Sigma- E1641) is provided from Sigma-Aldrich. eBL was used after being dissolved in absolute ethanol. Seedlings grown in plant growth chamber, in which there is a 15-hour photoperiod under a light intensity of 6000 lux at  $15 \pm 2$  °C, were watered on alternate days with 400-500 ml distilled water for the first 7 days. Growing seedlings were watered on alternate days from 8th day to 15th day (including 15th day) with Hoagland Nutrient Solution.

On the 16th day, seedlings are divided into two groups to investigate whether  $10^{-9}$  M eBL solution which is applied by spraying to all plant (except the root). The 1st group: Control group grown in Hoagland nutrient solution; the 2nd group: It is the experimental group grown in Hoagland nutrient solution and applied eBL.

Whereas eBL is applied by spraying to all the parts of the seedlings in the 2. group, other group (Control) is sprayed only with distilled water. As a result of these applications, morphological differences were observed; peroxidase and superoxide dismutase enzyme activities alongside total chlorophyll, total protein amount, and changes in membrane permeability were identified in all parts of the plant at the 45th day.

### **Measurement of Fresh Weight, Determination of the Difference.**

Only the stems of the plants were harvested to make various analyses and the results of them were revealed. The fresh stem weights of the plants were measured on the 15th day. Afterwards, hormone application was made during 30 days to the plants transferred into the water culture. At the end of the 45th day, the fresh weights were measured, and the differences were calculated.

### **Determination of Total Chlorophyll Amount.**

After 45 days seedlings were harvested, its stem was extracted with 90% acetone and it was centrifuged at 3000 g at +4 °C for 10 minutes after waiting in the dark at +4 °C for 24 hours. By specifying the absorption values of the supernatants in a spectrophotometer at wavelengths of 630 nm, 645 nm, and 665 nm, total chlorophyll content was specified in terms of  $\mu\text{g/g}$  F.W. (Parsons, T.T. and Strickland, J.D.H., 1963).

### **Determination of Total Soluble Protein Amounts.**

Samples were homogenized in pairs with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.8) containing 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP) and 1 mM EDTA in cold press by using liquid nitrogen. The protein amount in the supernatant was obtained using Bradford method (Marion M. Bradford, 1976) by measuring at 595 nm. As a standard, Bovine Serum Albumin (BSA) was used. The protein amounts were expressed in terms of  $\mu\text{g/g}$  F.W. protein.

### **Determination of Peroxidase (POD) Enzyme Activity.**

Peroxidase (POD) is an enzymatic antioxidant that is thought to play an important role in the defense against reactive oxygen species (ROS) in many organisms. To determine the peroxidase activity, the method of the Birecka et al. (Birecka, H., 1973) was used. Absorption was measured at the wavelength of 470 nm. The measurements were made in microplate spectrophotometer BioTek Epoch2. Enzyme activity was expressed as  $\Delta\text{A/g.F.W.xdk}$ .

### **Determination of Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme Activity.**

Superoxide dismutase activity was determined in compliance with Beauchamp and Fridovich (Beauchamp C et al. 1971). The activity is defined by measuring the ability of SOD to inhibit the reduction of nitro blue

tetrazolium (NBT) photochemically. Reaction mixture contains 50 mM phosphate buffer (pH 7.8), 33  $\mu$ M NBT, 10 mM L-methionine, 0.66 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.0033 mM riboflavin. After the supernatant was diluted and the mixture waited for 20 minutes under 300  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> light intensity, absorbance values of the reaction mixture at 560 nm were read. One enzyme unit for SOD, the amount of protein (mg) to inhibit reducing with light 50%, was defined and SOD activities in stem samples were determined accordingly.

#### **Measurement of Membrane Permeability Changes.**

Before being dried, 45-day seedlings were washed with tap water and distilled water, respectively. Samples were placed into distilled water in pairs as 0.1 g sample/10 ml distilled water. First, the samples stood at 40 °C for 30 minutes and their EC (Electrical Conductivity) was measured in conductivity measuring device (C1). Then, they stood in the water bath at 100 °C for 10 minutes before measuring EC again (C2). The obtained values were expressed in terms of mS/cm by being put into the formula below (Premchandra GS et al. 1990). (MSI: Membran Stability Index).

$$\text{MSI: } [1-(C1/C2)] \times 100$$

**Statistical Analysis.** Analyzing data obtained using One-Way Analysis of Variance (One-way ANOVA) in Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows 10.0) program, the differences between the averages were found as P<0.05 with the Duncan Multiple Comparison Test.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

Brassinosteroids are growth regulators that are identified as the sixth group of plant hormones in a wide variety of organisms, from simple to higher plants. They are steroidal plant hormones that play a role in plant growth and development. Even very low concentrations of brassinosteroids have been found to be effective in adapting to environmental stresses as well as playing a regulatory role in growth and development (cell division, cell prolongation and expansion, growth in reproductive organs, leaf senescence, yield increase) (Yonca S. et al. 2012).

Subjects that require further investigation of the roles of BRs include phenotypic variability, reproductive physiology, senescence, branching and apical dominance, lignification, phototropism, photoperiodism, and endogenous rhythms.

Epibrassinolide is a steroid structured hormone and it promotes plant growth. The aim of this study was to investigate the effects of eBL application on the development of spinach seedlings which have an important place in the food chain. For this purpose, spinach seedlings grown in Hoagland solution were sprayed with epibrassinolide.

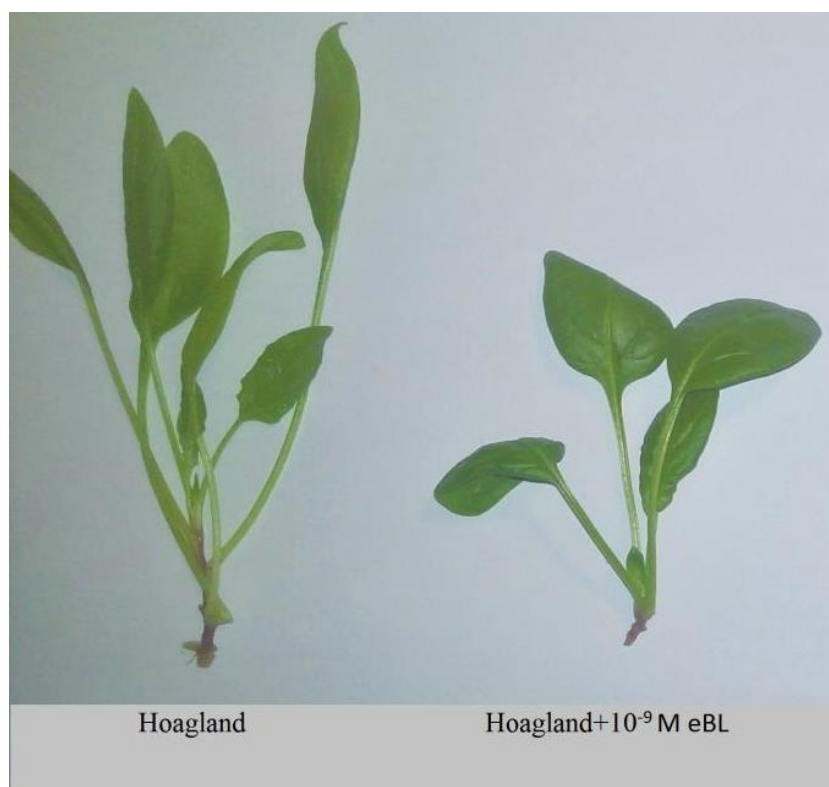


Figure 20. Development of 45 days old spinach seedlings grown in Hoagland solution and treated with  $10^{-9}$  M eBL

As a result of this study, " $10^{-9}$  M eBL" applied to the leaves of spinach seedlings grown in Hoagland solution promoted growth and development in the first 35 days and slowed the growth from the 35th day to the 45th day of harvest (Figure 1) The growth differences determined by fresh weight changes are shown in figure 2. As shown in Fig. 1, it was found that eBL treated spinach seedlings developed at the beginning of seedling growth had a slowdown in the last 10 days period until the harvest date. In this case, plants were harvested on the 45th day and biochemical analyzes were performed. As a result of this experiment, it was observed that growth and development slowed down contrary to known. Even though brassinosteroids are known to promote plant growth (Swamy KN., et al. 2010).

The effects of brassinosteroids on cell division, expansion and differentiation, and their relationship to endogenous interaction (source-sink relations) and all effects on plants have long been studied.

The decrease in fresh weight suggested that the changes in membrane stability, and the amount of molten material leaking into their aqueous medium was measured in terms of membrane stability index (MSI) with the electrical conductivity meter.

There was a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the groups (Figure 3). EBL application to seedlings grown in Hoagland solution, increased leaked material by affecting membrane permeability. The application of eBL caused permeability degradation and ionic imbalance. These results are in contradiction with the literature (Janeczko, A et al. 2007; A. S. Lukatkin et al. 2013). However, in some studies, it has been suggested that eBL does not significantly affect membrane permeability (Li et al. 2012b).

The deterioration of the membrane structure caused the deterioration of the ion gradient and the failure of the ATPH + pump to function properly. Accordingly, the development slowed down. Thus, the production of ATP required for photosynthesis and respiratory events gradually decreases and the process results in cellular death. There are also findings supporting these results (Hedrich, R. et al. 1989; Liu, Q et al. 1994)

The 12% increase in permeability of seedlings grown in Hoagland + eBL solution was attributed to the acceleration of senescence process.

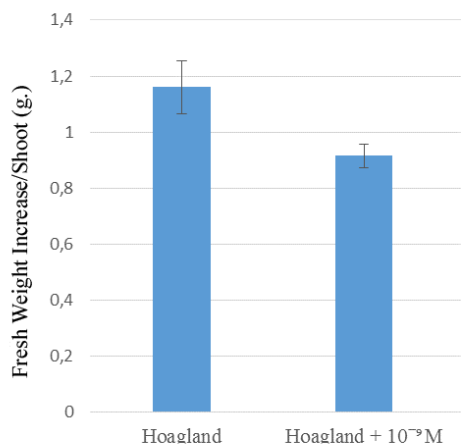


Figure 21. Fresh weight change of spinach seedlings grown in Hoagland solution for 30 days and treated with 10<sup>-9</sup> M eBL (p <0.05)

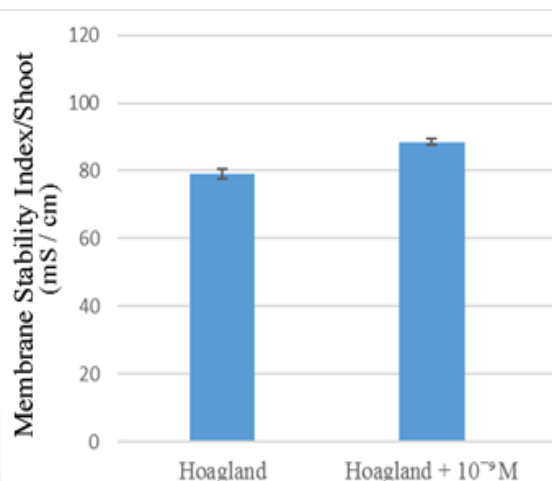


Figure 22. Comparison of membrane permeability of 45 days old spinach seedlings grown in Hoagland solution and treated with 10<sup>-9</sup> M eBL (p <0.05)

In order to determine the photosynthetic activities of these plants, total chlorophyll contents were determined. Total chlorophyll contents of the experimental and control seedlings grown in Hoagland solution and harvested on forty-fifth day were determined and the results are shown in Figure 4. On the forty-fifth day, a 21% reduction in fresh weight was supported by a 34% reduction in total chlorophyll content (Figure 4) and 36% reduction in total protein content (Figure 5) in the same seedlings.

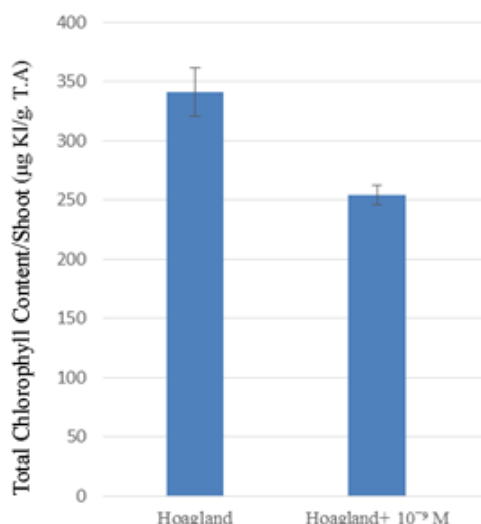


Figure 24. Total chlorophyll content in 45 days old spinach seedlings grown in Hoagland solution and treated with 10<sup>-9</sup> M eBL (p<0,05)

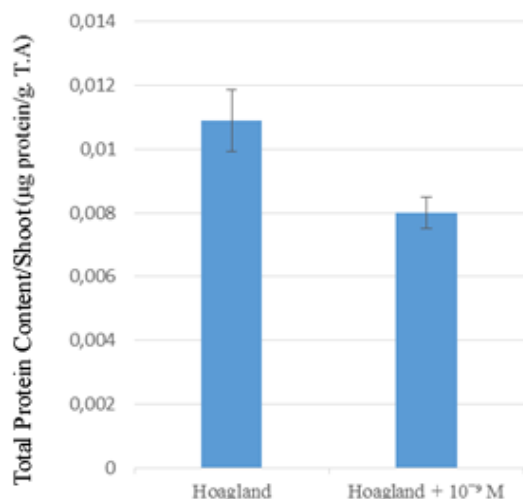


Figure 23. Total protein content in 45 days old spinach seedlings grown in Hoagland solution and treated with 10<sup>-9</sup> M eBL (p<0,05)

Çingil-Bariş and Sağlam-Çağ (2016) found that 10<sup>-9</sup> M eBL and auxin together accelerated the senescence of cotyledons. However, they found that 10<sup>-9</sup> M eBL delayed senescence when they block auxin transport by TIBA. To clarify this issue, the studies showing that brassinosteroid application promotes auxin transport are important (Li et al. 2005).



Brassinosteroids accelerate senescence in the presence of auxin can be explained in the light of this information. On the other hand, there are studies indicating that brassinosteroid and auxin interaction plays a role in plant resistance under stress (Choudhary SP et al. 2010).

Also, eBL has been reported to have a positive effect on gibberellin biosynthesis and signaling (Hu F. et al, 2011).

Contrary to expectations, application of eBL to seedlings resulted in a 34% reduction in chlorophyll content, which, as mentioned above, was interpreted to accelerate senescence in the presence of auxin.

Like chlorophyll reduction, a 36% decrease in protein content was observed in seedlings grown in Hoagland + eBL solution (Figure 5).

In this study, it was thought that eBL in the presence of auxin triggered the senescence process, causing proteins to break down and slow growth, and these results were in line with the results of Çingil-Bariş and Sağlam-Çağ (Çiğdem Çingil Bariş et al. 2016).

POD has a higher affinity than catalase. In this study,  $10^{-9}$  M eBL was applied to the trunks of spinach seedlings and POD activity was determined. Contrary to expectations, a 3-fold increase in POD activity was interpreted as slowing growth and accelerating senescence. The results of POD activity conform with the increase in POD activity in parallel with the increase in catabolic reactions in the organs undergoing senescence. POD activity results correspond to the increase in POD activity that is consistent with the increase in accelerated catabolic reactions in senescent organs (Kanazawa S et al. 2000; Serap Sağlam-Çağ 2004). However, this situation contradicts the findings of some researchers (Palavan-Ünsal N. et al. 2004).

According to our results, there is a negative correlation between the POD activity of eBL and chlorophyll and protein contents. The increase in POD activity was higher than the decrease in chlorophyll and protein content.

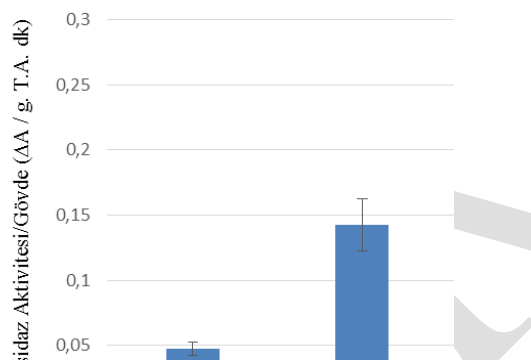


Figure 25. POD activity change of spinach seedlings grown in Hoagland solution for 30 days and treated with  $10^{-9}$  M eBL ( $p < 0.05$ )

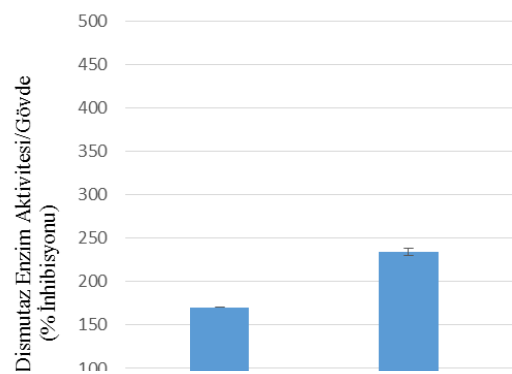


Figure 26. SOD activity change of spinach seedlings grown in Hoagland solution for 30 days and treated with  $10^{-9}$  M eBL ( $p < 0.05$ )

#### Superoxide

dismutase (SOD) is the enzyme responsible for detoxification of the superoxide radical. Gossett et al. stated that SOD is the most important grinder of superoxide ( $O_2^-$ ) and this enzymatic activity results in the formation of  $H_2O_2$  (Gossett et al. 1994).

Brassinosteroids have been reported to regulate the activities of superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase, catalase and glutathione reductase of antioxidative enzymes to provide protection to plants growing under stress (Hayat S. et al. 2007). Applying BR is known to promote auxin transport (Li et al. 2012b., Y. Chung et al. 2011). This may explain the fact that seedlings treated with eBL stimulate growth by day 35. The reason for the slowing of plant growth and the acceleration of senescence after 35 days has been attributed to the possibility of formation of a second auxin receptor in those days (Sağlam-Çağ S. 1997). This is explained by the acceleration of senescence in the presence of auxin in that process. BRs have been experimentally proven to increase the activity of certain enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) by increasing the expression of antioxidant genes (Xia Zhang et al. 2014.). Exogenous application of BRs accelerates plant growth and development, but this effect has been

reported to produce effects in different ways and at different concentrations with plant properties (Ashraf, M. et al. 2010).

## CONCLUSION

In this study, the effects of epibrassinolide on the development of spinach plants were investigated. The aim was to determine whether BRs affect plant growth by stimulating or inhibiting morphological development, as well as chlorophyll, protein, enzyme activities. The results showed that eBL, the most active form of brassinosteroids, a steroid plant hormone, slows the growth of spinach seedlings on the 45th day. There is little information about the role of eBL at the transcript level. Future studies should consider transcript / gene expression in order to further investigate the role of eBL in plant processing.

## REFERENCES

- Clouse S. D., Feldmann K. A. Molecular genetics of brassinosteroid action. 1999;1(1):163–190. In *Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones*, Sakurai A, Yokota T, Clouse SD eds, (Tokyo: Springer), pp.
- Haubrick LL, Assmann SM. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant Cell Environ.* 2006;29(3):446–57.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., and Smith, M.V. (1970). Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature.* 225, 1065–1066
- Grove, M.D.S., G.F. Rohwedder, W.K. Mandava, N. Worley, J. F. Warthen, J.D. Steffens, G.L., Flippenanderson, J.L. and Cook, J.L. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216-217.
- Savaldi-Goldstein, S., and Chory, J., “Brassinosteroids”, editors: Taiz and Zeiger, *Plant Physiology*, Four Edition, 617-634; 2006
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M. (1998) *Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 427-451.
- J.M. Sasse (2003). *Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update*. *J. Plant Growth Regul.* 22, 276–288.
- Michellini FM. et al., *In vitro* and *in vivo* antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. *Steroids.* 2004 Oct-Nov;69(11-12):713-20.
- Müssig C. Brassinosteroid-promoted growth. *Plant Biol (Stuttg).* 2005 Mar;7(2):110-7.
- Kamuro Y, Takatsuto S. Practical application of brassinosteroids in agricultural fields. In: Sakurai A, Yokota T, Clouse SD, editors. *Brassinosteroids: steroidal plant hormones*. Tokyo: Springer-Verlag; 1999. pp. 223–241.
- Iwahori, S. Tominaga, S. Higuchi Retardation of abscission in citrus leaf and fruitlet explants by brassinolide *Plant Growth Regul.*, 9 (1990), pp. 119-125.
- Oh, M. H., Romanow, W., Smith, R., Zamski, E., Sasse, J., Clouse, S. (1998). Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endo-transglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant Cell Physiology* 39: 124–130.
- Mandava NB. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1988: 39:23–52.
- Anuradha, S. & Seeta Ram Rao, S. *Plant Growth Regulation* (2001) 33: 151.
- Arora, P., Bhardwaj, R., and Kanwar, M. K. (2010b). 24-Epibrassinolide regulated diminution of Cr metal toxicity in *Brassica juncea* L. plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 22, 159–165.

Amzallag, G.N. & Vaisman, J. Influence of brassinosteroids on initiation of the root gravitropic response in *Pisum sativum* seedlings. *Biol Plant* (2006) 50: 283.

Choudhary S. P., Yu J. Q., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L. S. (2012b). Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17 594–605.

Li, L., Xu, J., Xu, Z.H. and Xue, H.W. (2005) Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2738-2753.

Y. Chung, P.M. Maharjan, O. Lee, S. Fujioka, S. Jang, B. Kim, S. Takatsuto, M. Tsujimoto, H. Kim, S. Cho, et al. Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis* *Plant J*, 66 (2011), pp. 564-578.

Parsons, T.T. and Strickland, J.D.H. (1963) Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine-Plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. *Journal of Marine Research*, 21, 155-163.

Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* Volume 72, Issues 1–2, 7 May 1976, Pages 248-254.

Birecka, H., Briber, K. A., Catalfamo, J. L.: Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects. *Plant Physiol.* 52, Jul 1973, 43–49.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971 Nov;44(1):276-87.

Premchandra GS, Saneoka H, Ogata S. 1990. Cell membrane stability, an indicator of drought tolerance as affected by applied nitrogen in soybean. *J Agric Sci Camb.* 115:63–66.

Yonca SURGUN et al. Altıncı Grup Bitki Hormonu: Brassinosteroidler. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi* 8.1 (2012) 27 – 46

Swamy KN., et al. “Effect of brassinosteroids on rooting and early vegetative growth of *coleus* (*Plectranthus forkohlii* (willd.) Briq.) stem cuttings”. *Indian Journal of Natural Product and Resources* 1.1 (2010): 68-73.

Janeczko, A., Gullner, G., Skoczowski, A., Dubert, F., Barna, B.: Effects of brassinosteroid infiltration prior to cold treatment on ion leakage and pigment contents in rape leaves. - *Biol. Plant.* 51: 355-358, 2007.

A. S. Lukatkin et al. Changes in Maize Seedlings Growth and Membrane Permeability under the Effect of Epibrassinolide and Heavy Metals. *Russian Agricultural Sciences* 39(4):307-310 · August 2013.

Li et al. 2012b. Effect of 24-epibrassinolide on drought stress-induced changes in *Chorispora bungeana*. *Biol. Plant* 56, 192–196.

Hedrich, R., Schroeder, J.I. (1989) The physiology of ion channels and electrogenic pumps in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 40, 539–569.

Liu, Q., Y. Feng and M. Forgac, 1994 Activity and in vitro reassembly of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase requires the 50-kDa subunit of the clathrin assembly complex AP-2. *J. Biol. Chem.* 269: 31592–31597.

Li et al. Brassinosteroids Stimulate Plant Tropisms through Modulation of Polar Auxin Transport in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2005 Oct; 17(10): 2738–2753.

Choudhary SP et al. Epibrassinolide induces changes in indole-3-acetic acid, abscisic acid and polyamine concentrations and enhances antioxidant potential of radish seedlings under copper stress. *Physiol Plant*. 2010 Nov;140(3):280-96.

Hu F., Wang D., Zhao X., Zhang T., Sun H., Zhu L., et al. (2011). Identification of rhizome-specific genes by genome-wide differential expression analysis in *Oryza longistaminata*. *BMC Plant Biol*. 11:1810.1186/1471-2229-11-18.

Çiğdem Çingil Barış, Serap Sağlam-Çağ. The Effects of Brassinosteroids On Sequential Leaf Senescence Occurring in Glycine Max L. *International Journal of BioTechnology and Research (IJBTR)* Vol. 6, Issue 4, Aug 2016, 7-16.

Kanazawa S, Sano S, Koshiba T, Ushimaru T. Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during dark-induced senescence. *Physiol Plant*. 2000; 109:211–216.

Serap Sağlam-Çağ. The effect of epibrassinolide on senescence in wheat leaves. January 2004 *Acta Physiologiae Plantarum* 26(3):18-19).

Palavan-Ünsal, N. et al., 2004, The role of meta-topolin senescence of wheat leaf segments, *Journal of cell and molecular biology*, 3, 23-31.

Gossett et al. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34, 706-14.

Hayat, S., Ali, B., Hasan, S. A., and Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot.* 60, 33–41.

Y. Chung et al. Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in *Arabidopsis* *Plant J*, 66 (2011), pp. 564-578.

Sağlam-Çağ S. 1997. Profiles of leaf senescence during reproductive growth of sunflower and maize. *Annals of Botany*, 85: 87-195. The effects of mineral nutrients and plant growth regulators on the mechanism of sequential leaf senescence in *Helianthus annuus* L. Ph.D. Thesis. Istanbul University, Institute of Science, Istanbul (In Turkish).

Xia Zhang et al. 2014. “Changes in Antioxidant Enzyme Activity and Transcript Levels of Related Genes in *Limonium sinense* Kuntze Seedlings under NaCl Stress,” *Journal of Chemistry*, vol. 2014 Article ID 749047, 6 pages, 2014.

Ashraf, M. et al. (2010). The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critic. Rev. Plant Sci.* 29, 162–190.

## Bazı yeni 7-N-açilamino-2-okso-1,2,3,4-tetrahidrokinolin türevlerinin antioksidan özellikleri

Zeynep Gönül<sup>1\*</sup>, F. Zehra Küçükbay<sup>2</sup>, Zehra Tekin<sup>2</sup>, Hasan Küçükbay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İnönü University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, 44280 Malatya-Turkey

<sup>2</sup>İnönü University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, 44280 Malatya, Turkey

\*Sorumlu yazar e-mail: zeyneppgonull@gmail.com

### Özet

On adet yeni 7-N-açilamino-2-okso-1,2,3,4-tetrahidrokinolin ve bir adet yeni dipeptit-benzotriazol türevine ait anti oksidan aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme ve metal şelatlama yöntemlerine göre incelendi. Bileşiklerin antioksidan aktiviteleri referans bileşikler BHA, BHT ve  $\alpha$ -tokoferolün aktiviteleri ile karşılaştırıldı. Bileşikler DPPH yöntemine göre, **9** ve **11** nolu bileşikler hariç çok düşük aktivite gösterirken metal şelatlama metoduna göre tamamen etkisiz bulunmuşlardır. **11** Nolu bileşik 37.5, 62, 5 ve 125  $\mu$ g/mL derişimlerinde referans antioksidan bileşiklere göre daha iyi antioksidan aktivite göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, amino asit, dipeptit, benzotriazol, açilasyon.

### Abstract

The antioxidant activity of ten new 7-N-acylamino-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and one new dipeptide-benzotriazole derivative was investigated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazase (DPPH) radical scavenging and metal chelating methods. The antioxidant activities of the compounds were compared with those of the reference compounds BHA, BHT and  $\alpha$ -tocopherol. The compounds showed very low activity except compounds **9** and **11** according to the DPPH method and were found to be completely ineffective according to the metal chelating method. Compound **11** showed better antioxidant activity than the corresponding antioxidant compounds at 37.5, 62, 5 and 125  $\mu$ g / mL concentrations.

**Keywords:** Antioxidant, amino acid, dipeptide, benzotriazole, acylation.

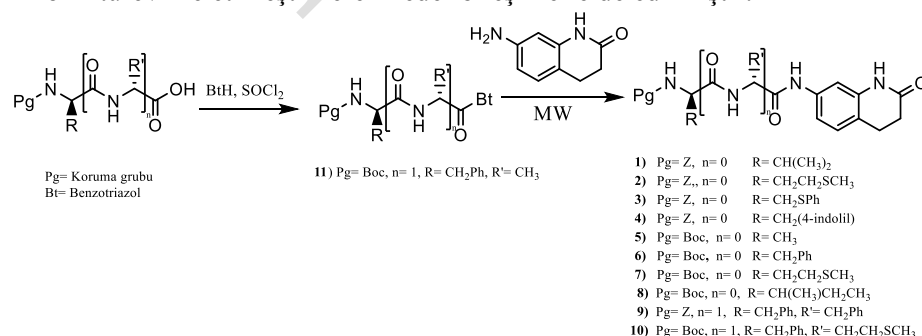
### GİRİŞ

Heterosiklik bileşikler biyolojik prosesler ve ilaç kimyasında çok önemli role sahiptirler. Birçok ilacın çekirdek yapısında heterosiklik iskelet bulunduğundan bu yapıların sentezleri ve iyileştirilmeleri üzerinde büyük çaba sarf edilmektedir. Bunlar arasında kinolinon türevleri özel bir yere sahiptir (Shiro ve ark., 2015). Kinolinon türevlerinin biyolojik aktiviteleri arasında anti-inflamatör, antikanser, anti-diabetik, antibakteriyal, antioksidan, antiparasit, karbonik anhidraz enzim inhibitörü gibi aktiviteler sıralanabilir (Shiro ve ark. 2015; Hassan ve ark. 2013; Küçükbay ve ark., 2016).

Biyolojik sistemlerin yapı taşları olan amino asitler ve/veya peptit serileri de önemli biyolojik özelliklere sahiptirler. Amino asit ve peptitlerin heterosiklik yapılarla birleştirilmesinde Katritzky grubu tarafından geliştirilen N-açilbenzotriazol metodu oldukça etkili bir sentez metodudur (Katritzky ve ark., 2009; Panda ve ark., 2013) Bu yöntemle amino asit ve peptit içeren heterosiklik bileşik türevleri hızlı, saf, yüksek verimle ve ılıman şartlarda orijinal kiralitenin tam korunduğu sentezlere imkan vermektedir (Lebedeva, 2015). Bu çalışmada ki yeni kinolinon türevleri de, benzotriazol metodu kullanılarak sentezlenmiştir.

### MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan başlangıç bileşikleri ve reaktifler Aldrich, Across, FluoroChem veya Merck Chemical Co. firmalarından temin edilmiştir. Bileşiklerin yapıları ve saflığı <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) ile doğrulanmıştır. N-Cbz- veya N-Boc-korumalı amino asit ve dipeptitlerin benzotriazol türevleri literatür yöntemlerine göre sentezlenmiştir (El Khatib ve ark., 2011; Buğday ve ark. 2018; Küçükbay ve ark., 2019). Benzotriazol ile etkinleştirilmiş N-korumalı amino asit ve N-korumalı dipeptit türevleri aşağıdaki şemaya (Şema 1) göre kinolin türevi ile etkileştirilerek hedef bileşikler elde edilmiştir.



Şema 1. 7-N-Açilamino-2-okso-1,2,3,4-tetrahidrokinolin türevlerine ait sentez şeması.

### N-Korumalı amino asit veya dipeptit-kinolin türevlerinin genel sentez yöntemi

N-korumalı amino asit veya N-korumalı dipeptit (1 eşg.) THF içerisinde çözüldü ve üzerine 7-amino,1,2,3,4-tetrahidrokinolin-2-on (1 eşg.) ilave edilerek mikrodalga ısıtma şartlarında 70 °C da 1 saat ısıtıldı. Ardından uçucular vakum yardımıyla uzaklaştırıldı. Ele geçen ham ürün metanolden kristallendirildi.

### In vitro antioksidan analizler

Sentezlenen yeni bileşiklerin antioksidan aktivite testleri, Blois (Blois, 1958) tarafından tanımlanan radikal süpürme yöntemi ile Dinis (Dinis ev ark., 1994) tarafından tanımlanan metal şelatlama yöntemlerine göre belirlendi. Elde edilen sonuçların karşılaştırılması referans antioksidan bileşikler olan BHA (2-*tert*-bütil-4-hidroksianisol), BHT (2,6-di-*tert*-bütil-4-metilfenol) ve  $\alpha$ -tokferol kullanılarak yapıldı.

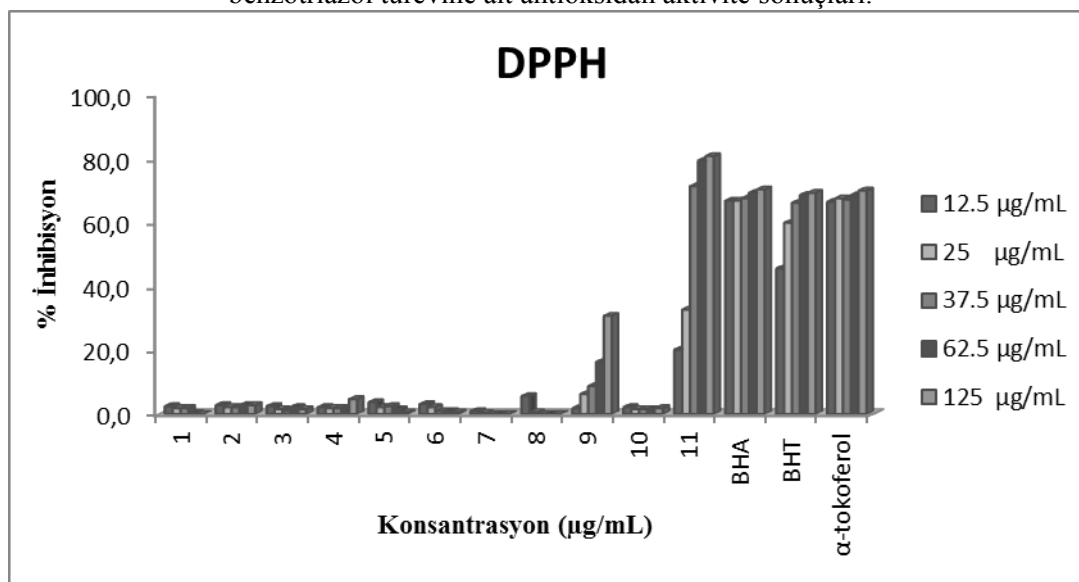
### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Hazırlanan yeni bileşiklerin yapı ve saflıkları NMR ve erime noktaları ile tespit edildikten sonra radikal süpürme ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Bileşiklerin DPPH yöntemine göre elde edilen antioksidan sonuçları Tablo 1 ve Şekil 1 de görülmektedir. Tablo 1 ve Şekil 1 deki sonuçlar incelendiğinde benzotriazol içeren **11** nolu bileşiğin özellikle 37.5, 62.5 ve 125  $\mu$ g/mL derişimlerde referans bileşiklerden çok daha iyi antioksidan özellik gösterdiği anlaşılmaktadır. Benzotriazol grubunun kinolin türevi ile yer değiştirmesi ile ele geçen bileşiklerde (**1-10**) ise antioksidan özelliklerinin genel olarak azaldığı anlaşılmaktadır. DPPH yöntemine göre genellikle gözlenen zayıf antioksidan özellikler, Fe(II) klorür ile yapılan metal şelatlama yönteminde ise tamamen yok olmuştur.

**Tablo 1.** Serbest radikal süpürme (DPPH) yöntemine göre amino asit / dipeptit-kinolin türevleri ile dipeptit-benzotriazol türevine ait antioksidan aktivite sonuçları.

Bileşik No	DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi, % İnh.				
	12,5 $\mu$ g/mL	25 $\mu$ g/mL	37,5 $\mu$ g/mL	62,5 $\mu$ g/mL	125 $\mu$ g/mL
1	2,515	1,886	1,886	0,314	ND
2	2,830	2,201	2,201	2,830	2,830
3	2,515	1,572	0,943	2,201	1,572
4	2,201	1,886	1,886	0,628	4,716
5	3,773	2,201	2,515	1,572	0,628
6	3,144	2,201	0,943	0,943	0,628
7	0,943	0,314	ND	ND	ND
8	5,660	0,628	ND	ND	ND
9	1,886	6,289	8,805	16,352	30,817
10	2,201	1,572	1,572	1,572	1,886
11	<b>20,209</b>	<b>32,752</b>	<b>71,428</b>	<b>79,442</b>	<b>80,836</b>
BHA	66.898	66.898	67.595	69.337	70.383
BHT	45.644	59.930	66.202	68.641	69.337
$\alpha$ -tokoferol	66.550	67.595	67.247	68.641	70.034

**Şekil 1.** Serbest radikal süpürme (DPPH) yöntemine göre amino asit / dipeptit-kinolin türevleri ile dipeptit-benzotriazol türevine ait antioksidan aktivite sonuçları.



**Tablo 3.** Metal şelatlama yöntemine göre amino asit / dipeptit-kinolin türevleri ile dipeptit-benzotriazol türevine ait antioksidan aktivite sonuçları. (TE: Tespit edilemedi)

Bileşik No	Metal Şelatlama aktivitesi, %		
	16,52 µg/mL	33,05 µg/mL	49,58 µg/mL
1	TE	TE	TE
2	TE	TE	TE
3	TE	TE	TE
4	TE	TE	TE
5	TE	TE	TE
6	TE	TE	TE
7	TE	TE	TE
8	TE	TE	TE
9	TE	TE	TE
10	TE	TE	TE
11	TE	TE	TE
EDTA	66,854	97,741	97,797

## SONUÇ

Bu çalışmada, antioksidan aktiviteleri tespit edilen amino asit /dipeptit- kinolin ve benzotriazol türevleri metal şelatlama yöntemine göre herhangi bir antioksidan aktivite göstermezken, DPPH yöntemine göre çok zayıf antioksidan özellik sergilemişlerdir. Ancak N-korunmalı dipeptit-benzotriazol bileşiği, **11** ise referans bileşiklere göre daha iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Finansal destek için İnönü Üniversitesine (BAPB- Grand No: FYL-2018-909) teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Blois MS 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Buğday N, Küçükbay FZ, Küçükbay H, Bua S, Bartolucci G, Leitans L, Kazaks A, Tars K, Supuran CT 2018. Synthesis of novel dipeptide sulfonamide conjugates with effective carbonic anhydrase I, II, IX, and XII Inhibitory Properties. *Bioorganic Chemistry* 81: 311–18.
- Dinis TCP, Maderia VMC, Almeida LM 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315:161-169.
- El-Khatib M, Jauregui L, Tala SR, Khelashvili L, Katritzky AR 2011. Solution-phase synthesis of chiral O-acyl isodipeptides. *MedChemComm* 2 (11): 1087.
- Hassan MM, Othman ES, Abass M 2013. Substituted quinolinones. 18. 3-acetyl-4-methylthioquinolin-2(1h)-one as useful synthon intermediate for synthesis of some new quinolinones. *Research on Chemical Intermediates* 39 (3): 1209–25.
- Katritzky AR, Angrish P, Todadze E 2009. Chiral acylation with n-(protected  $\alpha$ -aminoacyl)benzotriazoles for advantageous syntheses of peptides and peptide conjugates. *Synlett*, 15: 2392–2411.
- Küçükbay FZ, Küçükbay H, Tanc M, Supuran CT 2016. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of amino acid – coumarin/quinolinone conjugates incorporating glycine, alanine and phenylalanine moieties. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31 (6): 1198–1202.
- Küçükbay H, Buğday N, Küçükbay FZ, Berrino E, Bartolucci G, Perte SD, Capasso C, Supuran CT 2019. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel 4- (2- aminoethyl ) benzenesulfonamide-dipeptide conjugates. *Bioorganic Chemistry* 83: 414–23.
- Lebedyeva IO 2015. Benzotriazole-based strategies toward peptidomimetics, conjugates, and other peptide derivatives In: *The chemistry of benzotriazole derivatives*, Monbaliu JCM Ed. Cham: Springer International Publishing, Vol.43 pp 95–141.
- Panda SS, Ibrahim MA, Küçükbay H, Meyers MJ, Sverdrup FM, El-Feky SA, Katritzky AR 2013. Synthesis and antimalarial bioassay of quinine - peptide conjugates. *Chemical Biology and Drug Design* 82 (4): 361–66.
- Shiro T, Fukaya T, Tobe M 2015. The chemistry and biological activity of heterocycle-fused quinolinone derivatives: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97 (1): 397–408.



## Çanakkale'de Bulunan Peynir İşletmelerinde Laktokok Faj Prevalansının Ön Değerlendirmesi

Başar UYMAZ TEZEL\*

\*Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Programı,  
ÇANAKKALE/TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: [buymaz@comu.edu.tr](mailto:buymaz@comu.edu.tr)

### Özet

Süt tesisleri, fajların yayılması için ideal bir ortam oluşturur. Laktokokal suşların fajlarla enfeksiyonları, fermente süt ürünlerinin kalitesini etkileyen değişik şiddette fermentasyon sorunlarına neden olabilir. Bu çalışmada Çanakkale'de bulunan peynir tesisinden litik laktokok fajlarının araştırılması, izole edilmesi ve faj konakçı duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aylık olarak peynir tesisinden süt ve peynir altı suyu örnekleri toplandı. Süt ve peynir altı suyu örneklerinden fajların izolasyonu ve sayımı çift tabaka agar yöntemi kullanılarak yapıldı. Saflaştırılmış faj izolatları, -20 ° C'de % 20 gliserol içeren M17 besiyerinde saklandı. Saflaştırılan lizatin faj-Konakçı duyarlılığı 30 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* suşuna karşı deneyerek karakterize edildi. Üç ay boyunca laktokok faj prevalansını değerlendirmek için toplam 45 örnek (30 süt, 15 peynir altı suyu) toplandı. 45 örnekten 20 örnekte (% 44.4) laktokokal faj prevalansı belirlendi. Bununla birlikte, faj izolatlarının % 75'i (15 izolat) süt numunelerinden olmasına rağmen; % 25'i (5 izolat) peynir altı suyu örneklerindendi. Sadece iki *L. lactis* ssp. *lactis* suşu test edilen tüm fajlara karşı duyarlı bulunurken, yirmi sekiz suş dirençli olarak tespit edildi, Süt tesislerinde laktokok fajlarını kontrol etmek için çeşitli stratejilerin (sağlık, kültür rotasyonları ve fabrika/ekipman tasarımı) uygulanmasına rağmen, bunların varlığı ve kalıcılığı ciddi bir biyoteknolojik sorun olmaya devam etmektedir. **Anahtar Kelimeler:** Peynir işletmeleri, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, laktokokal fajları

### Primary evaluation of lactococcal phage prevalence from cheese facilities located in Çanakkale

#### Abstract

The dairy facilities constitute an ideal environment for the propagation of phages. Infections of lactococcal strains by phages may cause fermentation issues of varying severity which impacts on the quality of fermented dairy products. The present study aimed to survey of lytic lactococcal phages from cheese facility which was located in Çanakkale, to isolate, and to determine the phage-host ranges. For these purposes, milk and whey samples were collected from the cheese facility monthly. Isolation and enumeration of phages from milk and whey samples were performed by using the double agar overlay method. The purified phage isolates were stored in M17 broth containing 20% glycerol at -20°C. The phage-host ranges of purified lysate were characterised against 30 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains. During three months, a total of 45 samples were collected (30 milk, 15 whey) to assess lactococcal phage prevalence. Out of 45 samples, the prevalence of lactococcal phages was determined in 20 samples (44.4%). Although, 75% of the phage isolates (15 isolates) were from milk samples; 25% of them (5 isolates) were from whey samples. Only two *L. lactis* ssp. *lactis* strains were determined as sensitive, twenty-eight were resistance to all tested phages. Despite the implementation of various strategies to control lactococcal phages in dairy facilities (sanitation, culture rotations, and factory/equipment design), their presence and persistence remain a serious biotechnological problem.

**Keywords:** Cheese facility, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, lactococcal phages

### GİRİŞ

Çoğalmaları için ortamda mutlak canlı bakteri hücrelerine gereksinim duyan (zorunlu bakteri parazitleri) bakteriyofajlar (fajlar), ilk kez 1915 yılında İngiliz bakteriyolog Frederick Twort'un katı besiyerinde stafilkok kültürlerinin erimesine neden olan ajanları fark etmesiyle keşfedilmiştir. Daha sonra 1917 yılında Kanadalı bakteriyolog Felix d'Herelle, Pasteur Enstitüsünde dizanteri basili üzerine yaptığı çalışmalar sırasında

bakterilerin filtreden geçebilen bazı canlılar tarafından lize edildiğini belirlemesiyle tekrar keşfedilmiştir. O yıllarda bu olay Twort-d'Herelle fenomeni olarak tanımlanmış, daha sonraki yıllarda ise bakteriyel lizisin nedeninin virüslerin olduğu belirlenmiş ve bunlara 'bakteri yiyen' anlamına gelen 'Bakteriyofaj' adı verilmiştir (Harper ve ark., 2015). Çalışmalarıyla fajların enfeksiyonun doğal kontrolünde rol oynadığını ve ayrıca hastalığın tedavisinde kullanılabileceğini gösteren d'Herelle; dizanteri ve *Salmonella gallinarum*'un neden olduğu tifo salgınlarından muzdarip hastaların tedavisinde fajları kullanarak araştırmalarını genişletmiştir. Keşiflerinin ardından fajların tifo, kolera ve veba gibi çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sağladığı başarılı kullanım potansiyellerine karşılık, gıda fermantasyonundan sorumlu starter kültürlerin faj kontaminasyonu gıda endüstrisinde önemli sorun teşkil etmektedir.

Biyosferindeki mevcut en bol ve çeşitli biyolojik varlıklar olan kabul edilen fajlar, viral genomlarını konakçı hücreye enjekte etmek suretiyle litik döngüyü başlatmakta ve viral enfeksiyon döngüsü ilerlemektedir. Sonuç olarak, faj ile enfekte olmuş hücrelerin fizyolojisi, metabolizması, işlevselliği ve gen ekspresyonu ciddi şekilde etkilenir ve hücrel aktiviteleerinin değişmesine neden olur (Sadiq ve ark., 2019). Faj kontaminasyonunun neden olduğu sorunların araştırıldığı çalışmalar, tüm gıda endüstrileri arasında süt endüstrisinin en çok etkilenen endüstri kolu olduğunu göstermektedir. Süt fabrikalarında fajların yarattığı sorunlar 1930'lu yıllardan beri bildirilmekte olup; laktik starter kültürlerinden ilk faj izolasyonu Whitehead ve Cox tarafından, 1935 yılında gerçekleştirilmiştir (Sadine 1979).

Yaygın olarak *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* ve *Leuconostoc* cinsine ait laktik asit bakterilerinin (LAB) kullanıldığı süt fermantasyonunda; bu kültürler fermantasyonun başlatılması, ürünün yapısal ve aromatik özelliklerinin geliştirilmesinden sorumlu olup aynı zamanda ortamda hakim florayı teşkil ederek ya da ürettikleri farklı antibakteriyel maddeler sayesinde fermantasyon ortamlarındaki istenmeyen mikrofloranın gelişiminin engellenmesinde de önemli rol oynamaktadır (Şanlıbaba, 1999). Mezofilik *Lactococcus lactis*, peynir ve tereyağı üretiminde yaygın olarak kullanılan ve endüstriyel bakımdan önemli bir starter kültürdür. Laktik starter kültürlerinin fajlarla kontaminasyonu fermantasyonun başlangıcında ortamdaki asit oluşumunun yavaşlamasına neden olurken, son aşamada ise ürüne has yapı ve aroma bileşiklerinin gelişimine engel olur. Değişen şiddette fermantasyon sorunlarına yol açan faj kontaminasyonun düşük kaliteli ürünlerin üretiminin yanında bir üretim sürecinde yaklaşık %15-20 oranında ürün kayıplarına da neden olduğu bildirilmektedir. Doğası gereği süt fermantasyonlarında asepsinin tam olarak sağlanamayışı, laktokok kültürlerinde lizogeninin yaygın bir özellik oluşu süt endüstrisinde faj kontaminasyon riskini artırırken; faj inhibitör ortamlarının kullanımı ya da starter kültür rotasyonu gibi klasik yöntemlerde faj kontaminasyonunun neden olduğu sorunlara köklü bir çözüm getirilememektedir (Akçelik ve Şanlıbaba, 2002).

Morfolojik ve genetik olarak yapılan son sınıflandırmaya göre laktokok fajları on ayrı grup (c2, P335, 936, P034, P087, 949, 1706, KSY1, Q54 ve1354) altında tanımlanmış; bunlardan c2, P335 ve 936 grup üyelerinin süt endüstrisinde prevalansının yüksek olduğu (sırasıyla %5, %10 ve %80) rapor edilmektedir (Sunthornthummas ve ark., 2017). Günümüz geniş ölçekli süt fermantasyonlarında önemli bir sorun olan laktokokkal fajları için süt, ideal bir gelişim ortam oluşturmakta ve peynir üretim tesislerinde birçok yüzeyde ve havada faj bulunmaktadır. Bununla birlikte, çiğ sütte faj bulunduğunda süütün pastörizasyonu sırasında tamamen inaktive olamayabileceği ve proses sırasında peynirin kalan fajlarla kontamine olabileceği bildirilmektedir (Marvig ve ark., 2011). Çiğ süütün süt işletmesindeki başlıca virulent faj kaynağı olduğu ve günümüzde faj inaktivasyonu için termal uygulamanın en yaygın metot olarak tercih edildiği ancak, bazı laktokokkal faj gruplarının ise pastörizasyona dirençli olduğu bildirilmektedir (Atamer ve ark., 2010). Bu kapsamda planlanan çalışmanın temel amacı: i) Çanakkale'de bulunan bir peynir işletmesinde üç ay boyunca çiğ süt ve peynir altı suyu örneklerinde litik laktokokkal faj prevalansının belirlenmesi, ii) faj izolasyonu, iii) faj-konakçı duyarlılığının belirlenmesidir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çanakkale illinde yer alan bir peynir işletmesine gelen paçal sütleri ile peynir altı suyu çalışma materyali olarak kullanılmış olup, örnekler aseptik koşullarda, soğuk zincir korunarak analiz için laboratuvara getirilmiştir. Örneklemeye üç ay boyunca her ay gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada konakçı laktokok suşları olarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan 30 adet *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşları kullanılmıştır.

## METOT

### Örneklerin faj izolasyonuna hazırlanması

10 mL çiğ süt örneğine 0.6 mL %10'luk laktik asit ilave edilerek kazein çöktürülmüştür; ortamda bulunan çözünmeyen komponentler kaba filtre kağıdı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Peynir altı suyu ise hiçbir işleme tabi tutulmadan kaba filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde olunan filtratlar 0.45 µm por çapında steril membran filtrelerden (Sartorius) geçirilerek sterilize edilmiştir.

### Faj izolasyonu, faj titresinin belirlenmesi, saflaştırma ve faj stoklarının hazırlanması

Fajların izolasyonu ve saflaştırılması için, daha önce Mullan (2001) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır.

İzolasyon materyali olarak hazırlanan örnek filtratlarından, steril tüplere 0.1 mL alınarak üzerine konakçı hücrelerinin üç saatlik M17 broth kültürlerinden (0.1 mL) ve adsorbsiyonun sağlanması için 1 M CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisinde (0.1 mL) ilave edilerek karıştırılmıştır, 30 °C'de 12 dakika inkübe edilmiştir. Adsorbsiyon sonrası karışımın üzerine 10 mL steril M17 broth aktarılarak 30 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Berraklaşma görülen ortamlara 15.000 devirde on dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Elde olunan süpernatantlar tekrar membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Steril süpernatantlardaki faj varlığı çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir: Steril süpernatant (0.1 mL) , üç saatlik *L. lactis* ssp. *lactis* kültürü (0.1 mL) ve CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O çözeltisi (0.1 mL) ile karıştırılarak 30 °C'de 12 dakika inkübe edilmiştir. Karışımın üzerine yumuşak agar (2.5 mL, %0.45 agar-agar) ilave edilerek, alt tabak olarak hazırlanan M17 agar üzerine dökülmüştür. 30 °C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası petri ler değerlendirilerek, berrak plakların oluşumu faj varlığı olarak tanımlanmıştır.

Faj titresinin belirlenmesi yine çift tabaka agar yöntemine göre belirlenmiş olup; faj süspansiyonlarının steril fizyolojik suda seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Üç saatlik *L. lactis* ssp. *lactis* kültürü (0.1 mL) ilave edilmiş yumuşak agar homojen bir şekilde M17 agar üzerine yayılmış, daha sonra üzerlerine hazırlanan faj dilüsyonlarının her birinden ayrılan bölümlere 10'ar µL damlatma yapılmıştır. 30 °C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası petri ler, damlatma yapılan bölgelerde faj dilüsyonların oluşturduğu lizis plakları incelenerek faj titreleri belirlenmiştir.

İzole edilen fajlar % 20 oranında gliserol (v/v) içeren M17 broth ortamlarında -20 °C'de stoğa alınmıştır.

### Bakterilerin faj duyarlılıklarının belirlenmesi

Titreleri plak oluşturma birimi/mL (pfu/mL) olarak belirlenen faj lizatlarının toplam 30 farklı *L. lactis* subsp. *lactis* suşuna karşı etkinlikleri daha önce Lillehaug (1997) tarafından belirlenen çift tabaka agar yöntemine göre belirlenmiştir. Bu bağlamda hazırlanan üç saatlik bakteri kültürlerinden yumuşak agar üzerine 0.1 mL aktarılarak alt tabaka M17 agar üzerine dökülmüştür. Homojen bir şekilde petri ye dağılması sağlanan agar donduktan sonra üzerine 10 µL test edilecek faj lizatları ayrı ayrı damlatılmıştır. 30 °C'de 18 saatlik inkübasyona bırakılan ortamlarda, plakların oluşumu değerlendirilerek faj-konakçı duyarlılık profili belirlenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Çanakkale'de bulunan bir peynir işletmesine üretimde kullanılmak üzere gelen paçal sütleri ile üretim sonrası peynir altı suyu örnekleri laktokokal faj prevalansını belirlemek üzere analiz edilmiştir. Üç ay boyunca devam eden örneklemede 30'u çiğ süt ve 15'i peynir altı suyu olmak üzere toplam 45 örnek analize alınmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1** Faj varlığı bakımından taraması yapılan örnek listesi

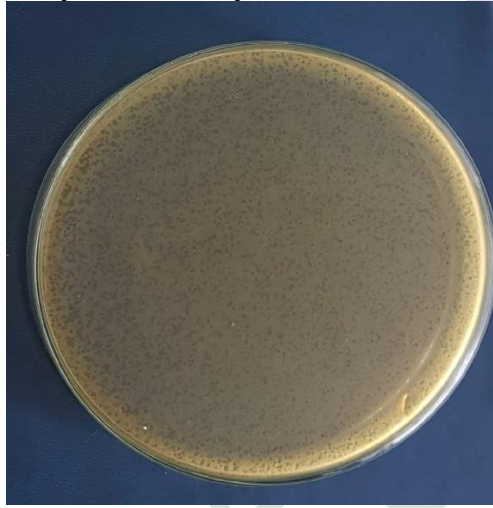
Örnek Kodu	Örnek Adı	Faj Varlığı	Faj Kod No	Homolog Konakçı Suş
S1-1	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-2	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-3	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-4	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-5	Çiğ Süt	+	Örkb 1-5	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-6	Çiğ Süt	+	Örkb 1-5	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-7	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-8	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-9	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-10	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11

S1-11	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-12	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-13	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-14	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S1-15	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-16	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-17	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-17	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-18	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-18	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-19	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-20	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-21	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-21	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-22	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-22	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-23	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-23	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-24	Çiğ Süt	+	Ørkb 2-24	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-25	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-26	Peynir Altı Suyu	+	Ørkb 2-26	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-27	Peynir Altı Suyu	+	Ørkb 2-27	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-28	Peynir Altı Suyu	+	Ørkb 2-28	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-29	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S2-30	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-31	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-31	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-32	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-32	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-33	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-33	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-34	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-35	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-36	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-36	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-37	Çiğ Süt	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-38	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-38	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-39	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-39	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-40	Çiğ Süt	+	Ørkb 3-40	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-41	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-42	Peynir Altı Suyu	+	Ørkb 3-42	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-43	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-44	Peynir Altı Suyu	+	Ørkb 3-44	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11
S3-45	Peynir Altı Suyu	-	-	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RKB11

Aynı işletmeden temin edilen toplam 45 örnekte laktokokkal faj prevalansı %44,4 (20 adet örnek) olarak tespit edilmiştir (Şekil 1). Faj izolatlarının %75'i (15 izolat) süt numunelerinden; %25'i (5 izolat) peynir altı suyu örneklerinden izole edilmiştir. Çiğ süt örneklerinden, örnekleme ilk ayında sadece iki örnekte faj varlığı belirlenirken, diğer iki ayda toplam 13 örnekte (ikinci ay 6, üçüncü ay 7 çiğ süt örneği) faj varlığı belirlenmiştir. Peynir altı suyunda ise örnekleme ilk ayında faj varlığı belirlenememiş; ikinci ve üçüncü aylarda (sırasıyla 3 ve 2 peynir altı suyu örneği) izolasyon yapılabilmektedir (Tablo 1). Süt işletmelerinin laktokok fajları ile kontaminasyonu farklı yollarla gerçekleşmektedir. Çiğ süt süt işleme prosesini olumsuz etkileyen potansiyel bir faj rezervuarıdır. 900 çiğ süt örneğindeki faj varlığını analiz eden bir çalışmada, örneklerin %9,2'sinin faj içerdiği belirlenmiştir (Madera ve ark., 2004). Çiğ sütün çok sayıda ( $10^4$  pfu/mL'ye kadar) faj içerebileceğini gösteren çalışmaların (McIntyre ve ark., 1991) yanında, fermantasyon sırasında bu sayının artabileceği ve peynir gibi son üründe bu sayının  $10^9$  pfu/mL'yi bulabileceği bildirilmektedir (Atamer ve ark., 2010). Bununla birlikte fajların bir süt işleme tesisinde bir yıldan daha fazla bir süre ile kalabileceği ve kontaminasyon kaynağı olarak risk oluşturabileceği de bildirilmektedir (Rousseau ve Moineau 2009). Günümüzde faj inaktivasyonu için en yaygın kullanılan metot ısı işlemi olarak bildirilse de çiğ sütte faj bulunması durumunda pastörizasyon sırasında bunların tamamen inaktive olamayacağı ve peynire işlenecek sütün kalan fajlarla kontamine olabileceği bildirilmektedir (Marving ve ark., 2011). Peynir altı suyu, işletme ortamında faj kontaminasyonuna neden olan bir diğer rezervuarıdır. Peynir altı suyu ayırma tankına yakın noktalarda faj konsantrasyonunun  $10^6$  pfu/mL'ye ulaştığını gösteren çalışmalar, hava kaynaklı faj kontaminasyonunun da önemli bir rezervuar

oluşturabileceğine işaret etmektedir (Rousseau ve Moineau 2009). Çalışmamızda homolog konakçı suşu kullanılarak titrelere  $10^8$ – $10^9$  pfu/mL düzeyine yükseltile 20 laktokok fajı, faj-bakteri dinamik dengesi esas alınarak suretiyle 30 suşa karşı duyarlılıkları denenmiştir. Çift tabaka M17 agar ortamlarında faj plak oluşumu sonucu 2 adet *L. lactis* ssp. *lactis* suşunun tüm fajlara karşı duyarlı olduğu; 28 suşun ise % 100 dirençli olduğu saptanmıştır.

İşletmelere sağlanan çiğ sütün faj yükü, fermantasyonun aseptik koşullarda gerçekleştirilmemesi laktokok suşlarını faj kontaminasyonuna açık hale getirir. Bu çalışmanın sonuçları işletmelere tedarik edilen çiğ sütte laktokok faj prevelansının yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle süt işletmelerinde önemli ölçüde ürün kayıplarına neden olan faj kontaminasyonun engellenmesi için; i) daha işin başında faj bulaşmasının mümkün olduğunca engellenmesi, ii) işletme dizaynının bulaşmaya izin vermeyecek biçimde düzenlenmesi ve bilhassa kültür hazırlama bölmelerinin üretim sahalarından uzak tutulması, iii) etkin bir sanitasyon yönetiminin oluşturulması, iv) rekombinant DNA teknolojisi ile faj dirençli, çabuk gelişen bakteri kültürlerinin starter kültür olarak seçilmesi ve v) kültür rotasyonunun devreye sokulması bir zorunluluktur (De Melo ve ark., 2018).



Şekil 1. Laktokokkal faj plakları

## SONUÇ

Çanakkale’de bulunan bir süt işletmesinden temin edilen materyallerle yürütülen bu çalışmanın sonucunda, süt tesislerinde (sağlık, kültür rotasyonları ve fabrika / ekipman tasarımı) laktokok fajlarını kontrol etmek için çeşitli stratejilerin uygulanmasına rağmen, faj varlığı ve kalıcılığının halen ciddi bir biyoteknolojik sorun olmaya devam ettiği tespit edilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Gülcan ÇİFTÇİ, Hilal YAZAN, Feride KURHAN, Burçin KÖKSAL, Ersin YIĞMAN, Nurgül PINAR, Kübra ŞERİ ve Yüksel KILAVUZ’a teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

Akçelik M, Şanlıbaba P 2002. Characterisation of an Exopolysaccharide Preventing Phage Adsorption in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MA39. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26: 1151-1156.

Atamer Z, Hinrichs J 2010. Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. International Dairy Journal, 20: 163-168.

De Melo AG, Levesque S, Moineau S 2018. Phages as friends and enemies in food processing. Current Opinion in Biotechnology. 49: 185-190.

- Harper DR, McConville M, Anderson FJ, Enright MC 2015. Antimicrobial phages. In: Tang YW, Liu D, Sussman M, Poxton I, Schwartzman J (eds), Molecular Medical Microbiology. London: Elsevier, pp. 567-581.
- Lillehaug D. 1997 An improved plaque assay for poor plaque-producing temperate lactococcal bacteriophages. Journal of Applied Microbiology, 83: 85-90.
- Madera C, Monjardín C, Suárez JE 2004. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. Applied and Environmental Microbiology, 70: 7365-7371.
- Marvig CL, Aideh B, Neve H, Heller KJ, Knøchel S, Vogensen FK 2011. Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. International Dairy Journal, 21: 556-560.
- McIntyre K, Heap HA, Davey GP, Limsowtin GKY 1991. The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. International Dairy Journal, 1:183-197.
- Mullan WMA (2001) Bacteriophage isolation and purification. [On-line] UK. Available at <http://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>.
- Rousseau GM, Moineau S 2009. Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory. Applied and Environmental Microbiology, 75: 5336-5344.
- Sadiq FA, He GQ, Sakandar HA, Li YJ, Ou K 2019. *Lactococcus lactis* phages from the perspective of their diversity, thermal and biocidal resistance. International Dairy Journal, 90: 28-38.
- Sunthornthummas S, Doi K, Rangsiruji A, Sarawaneeyaruk S, Pringsulaka O 2017 Isolation and characterization of *Lactobacillus paracasei* LPC and phage ØT25 from fermented milk. Food Control, 73: 1353-1361.
- Şanlıbaba P 1999. *Lactococcus* cinsine ait suşlarda faj dirençlilik sistemlerinin tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 72s.

## The effect of *Hypericum perforatum* L. extracts on obesity markers in 3T3-L1 *Mus musculus* cell line

Hilal Büşra Tokgöz<sup>1,\*</sup>, Gülben Uytan<sup>1,\*</sup>, Reşat Ünal<sup>1</sup>, Olcay Ceylan<sup>2</sup>, Güven Görk<sup>2</sup>, Filiz Altan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Muğla Sıtkı Koçman University, Muğla, Turkey

\* These author contributed equally to this work Correspondence: (afiliz@mu.edu.tr)

### Abstract

Obesity is a low-grade inflammatory disease that develops based on sedentary lifestyle, unhealthy and malnutrition, environmental and genetic factors. Obesity is a disease that causes different health problems by reducing the quality of life and affecting the body all over the world. Primary health problems correlated with obesity include insulin resistance, Type II diabetes, hypertension, atherosclerosis, hyperlipidemia, hypertriglyceridemia and metabolic syndrome. For the treatment of obese individuals with Type II diabetes, glucose-lowering insulin sensitizing drugs are used together with the diet. Metabolic surgery is recommended for individuals with BMI $\geq$ 40. Drugs recommended for obesity are not tolerable to anyone, while metabolic surgery is costly and has risks. Increased obesity rates lead to greater health and economic burdens in all countries. This encourages researchers to seek for alternative ways to treat obesity. Most of the alternative therapies base on medicinal plants. Based on the recent studies, *Hypericum perforatum* has been shown to improve the antidiabetic, antihyperglycemic, antiobesity effect and insulin resistance. In this study, 3T3-L1 adipocytes were used as an *in vitro* model to mimic obesity and DGAT-1 and LPL genes were chosen as molecular markers to examine the effect of *Hypericum perforatum* on obesity at the molecular level.

**Keywords:** Obesity, *Hypericum perforatum*, 3T3-L1 Cell Line

### Özet

Obezite, sedanter yaşam tarzı, sağlıksız ve yetersiz beslenme, çevresel ve genetik faktörlere dayanarak gelişen düşük dereceli inflamatuvar bir hastalıktır. Obezite, yaşam kalitesini düşürerek ve tüm vücudu etkileyerek farklı sağlık sorunlarına neden olan bir hastalıktır. Obezite ile ilişkili temel sağlık sorunları arasında insülin direnci, Tip II diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, hiperlipidemi, hipertrigliseridemi ve metabolik sendrom bulunur. Tip II diyabetli obez bireylerin tedavisi için, diyetle birlikte glukoz düşürücü insülin duyarlılaştırıcı ilaçlar kullanılır. BKİ  $\geq$  40 olan bireylere metabolik cerrahi önerilmektedir. Obezite için önerilen ilaçlar bazı kimseler için tolere edilebilir değildir. Metabolik cerrahi ise masraflıdır ve riskleri vardır. Artan obezite oranları tüm ülkelerde daha fazla sağlık yüküne ve ekonomik yüke yol açmaktadır. Bu, araştırmacıları obeziteyi tedavi etmek için alternatif yollar aramaya teşvik etmektedir. Alternatif tedavilerin çoğu tıbbi bitkilere dayanır. Son çalışmalara dayanarak, *Hypericum perforatum*'un, antidiyabetik, antihiperglisemik, antiobezite etkisini ve insülin direncini arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, 3T3-L1 adipositleri, obeziteyi taklit etmek için *in vitro* model olarak kullanılmıştır ve DGAT-1 ve LPL genleri, *Hypericum perforatum* 'un obezite üzerindeki etkisini incelemek için moleküler markörler olarak seçilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Obezite, *Hypericum perforatum*, 3T3-L1 Hücre Hattı

### INTRODUCTION

Obesity is a disease that increases dramatically in adults and children populations and causes different complications (Ng et al., 2014; Koren et al., 2018). Obesity is a disease that appears as a result of the growth of adipose tissue. This growth may include the increase in the number of adipocyte cells and / or the growth of the tissue size (Hatano et al., 2014). Triglycerides are the main storage molecules of metabolic energy and fatty acids in most living organisms. However, excessive accumulation of triglycerides is associated with diseases such as obesity and diabetes mellitus. The biosynthesis of triglycerides is catalyzed by diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT-1) enzymes (Harris et al., 2011). Obesity is characterized by overexpression of excess triglyceride in white adipose tissues and is often associated with abnormal storage of triglycerides in tissues such as skeletal muscle and liver. Since overexpression of DGAT-1 increases triglyceride accumulation, DGAT-1 increase is positively correlated with obesity (Greenberg et al., 1992). Lipoprotein lipase (LPL) plays an important role in adipocyte metabolism by hydrolyzing circulating triglycerides to fatty acid (Hartman et al., 1981). In obesity, the amount of LPL per cell is increased in adipose tissue (Terrettaz et al., 1994; Wang et al., 2009; Sadur et al., 1984). The 3T3-L1 cell line has a preadipocyte nature and can be transformed into an adipocyte when stimulated with the necessary chemicals. Because of this feature, this cell

line is widely used by researchers to understand fat and sugar metabolism disorders such as obesity, insulin and diabetes. *Hypericum perforatum* has been widely used as a medicinal plant for more than 2000 years (Klemow et al., 2004). The antiobesity effect of the plant has been proven by both clinical and non-clinical studies (Tian, et al., 2015; Husain et al., 2011). In this study, increasing doses of *Hypericum perforatum* were applied to 3T3-L1 adipocytes. The changed relative mRNA expression of DGAT-1 and LPL gene after plant application was demonstrated.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

*H.perforatum* L. was collected in Muğla and was dried for 15 days at room temperature. The dried whole plant of *H.perforatum* L. was suspended in ethanol (100%) and applied to 3T3-L1 cells in 50 µg/ml, 100 µg/ml and 150 µg/ml doses for 2 days.

### Chemical materials

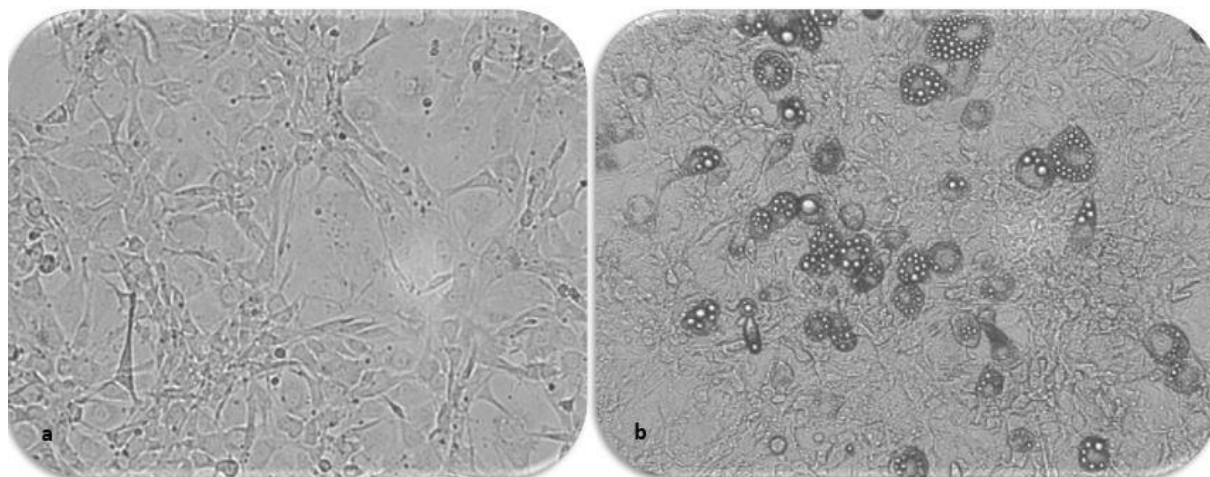
RiboEx™ (Cat. No.301-001) was used in this study for RNA isolation. EasyScript Plus cDNA synthesis kit (abm, G236) was used to convert the RNA extracted from the cell lines to cDNA. Quantitative PCR reaction was carried out using Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green (A323402).

### Cell culture

3T3-L1 cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (L0102-500) containing 10% Newborn Calf Serum (Capricorn, NCS-1B) and 1% Penicillin-Streptomycin (Multicell, 450-201-EL) in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C. 10% Fetal Bovine Serum (Capricorn, FBS-12B) and 1% Penicillin-Streptomycin containing DMEM was used to induce cells to adipocyte. Pre-differentiation medium containing 0.5 mM IBMX (Sigma, STBF6061V), 1µM dexamethasone (Sigma, BCBV5460) and 1µg/mL insülin (Sigma, SLBV1793) was applied for 48 hours followed by the application of differentiation medium containing 1µg/mL insulin to induce 3T3-L1 cells to adipocytes respectively. The cells stained with Oil Red O (Biovision, K580-24)

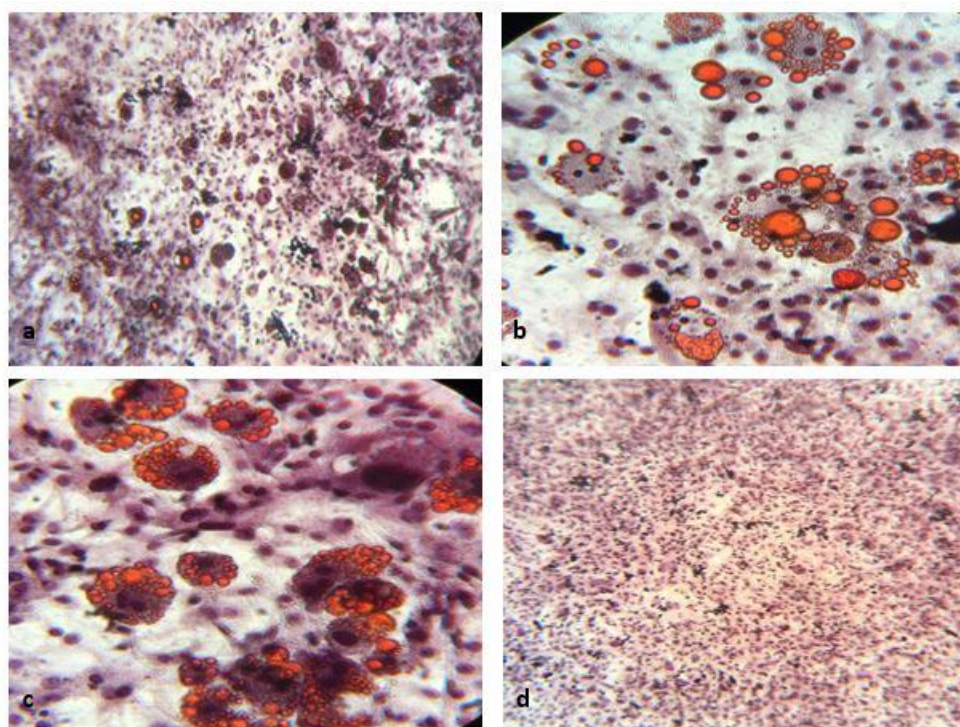
## RESULTS and DISCUSSION

In this study, 3T3-L1 cells with fibroblastic morphology and preadipocyte nature were used (Figure 1.a). When 3T3-L1 cells were stimulated with chemicals like insulin, dexametason and IBMX, they became adipocyte (Figure 1.b).



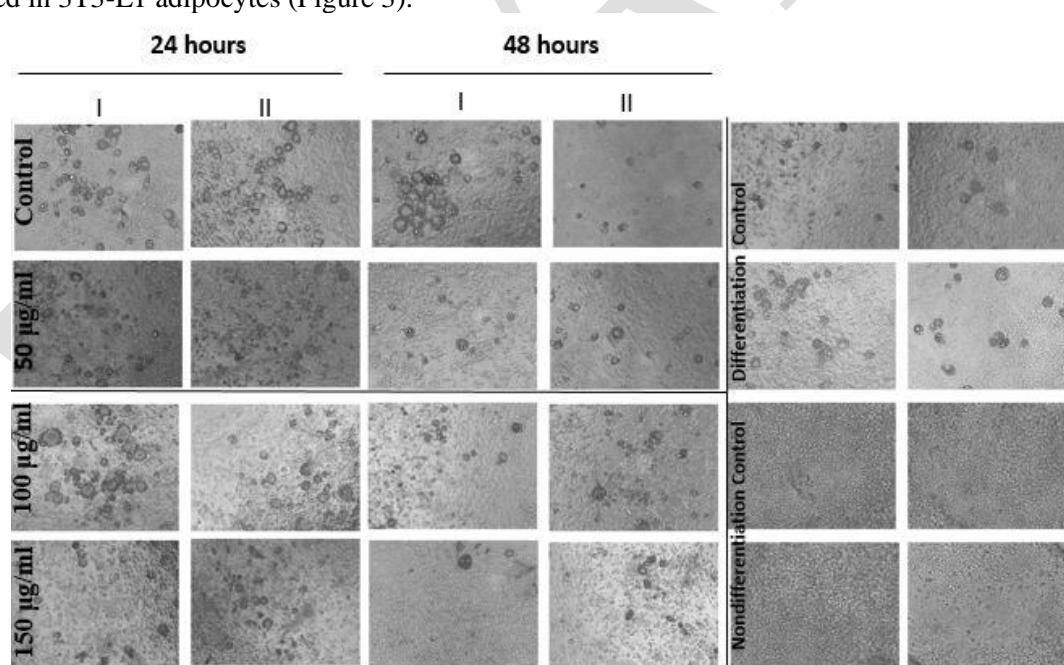
**Figure 1.** a. 3T3-L1 preadipocyte cells with fibroblastic morphology b. 3T3-L1 adipocytes  
At the end of two weeks, the formation of lipid droplets was observed by oil red o staining (Figure 2).





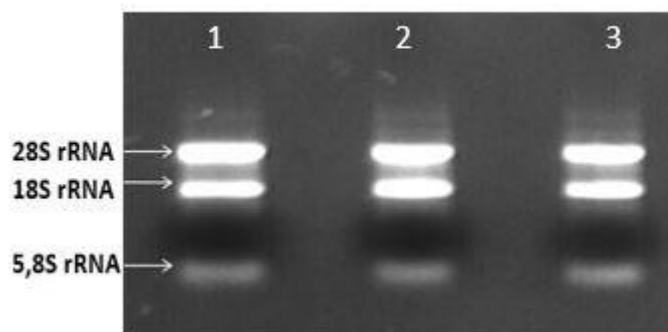
**Figure 2.** After oil red o staining lipit droplets appear red. a. Under electron microscope (10x) b.,c. Under electron microscope (40x) d. Nondifferentiation control appear purple (10x)

In pre-trials of 3T3-L1 preadipocytes, it was determined that the 24 and 48-hour application of 50, 100, 150  $\mu\text{g/ml}$  extracts of *Hypericum perforatum* dissolved in ethanol was suitable for the cells. Therefore, these doses were used in 3T3-L1 adipocytes (Figure 3).

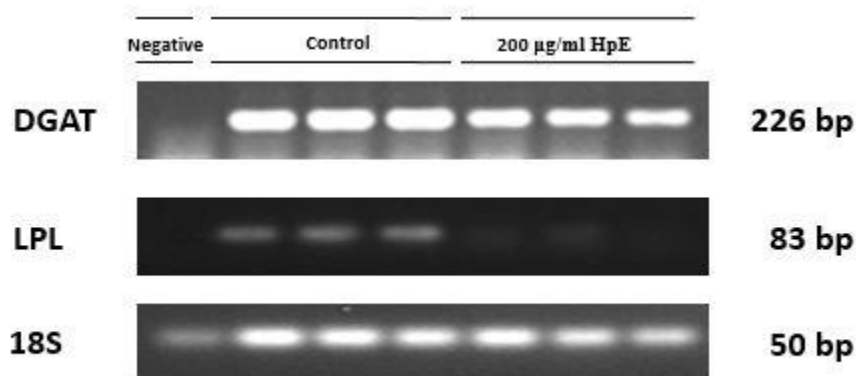


**Figure 3.** Treating of 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 150  $\mu\text{g/ml}$  *Hypericum perforatum* ethanol extracts to 3T3-L1 adipocytes

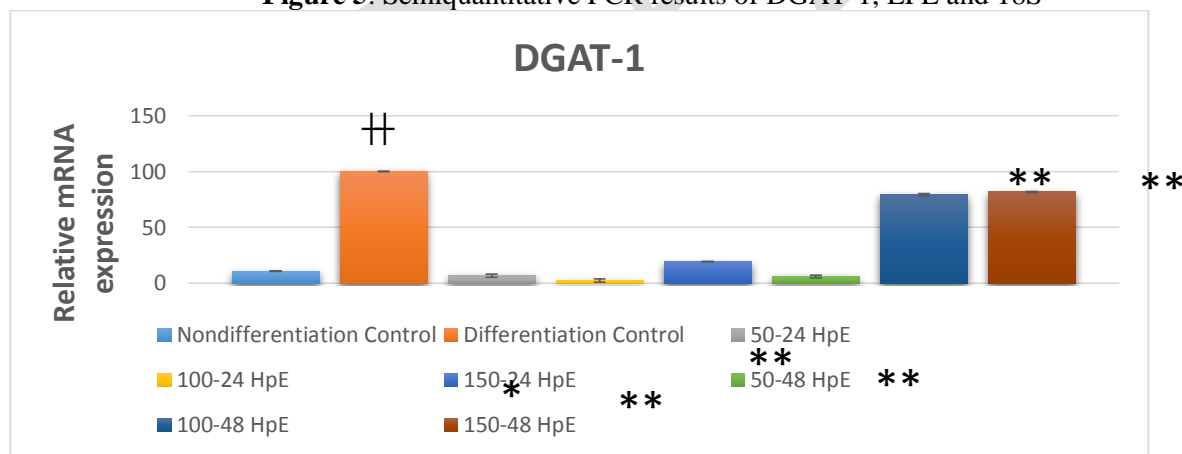
RNA was isolated from the cells with RiboEx™ and then cDNA synthesis was performed. Electrophoretic and spectrophotometric analyzes were performed to determine the quality of RNAs (Figure 4). The mRNA expression of DGAT-1 and LPL molecular markers which were designed on the Primer3, were performed by quantitative RT-PCR.



**Figure 4.** Agarose gel after isolation of total RNA; 1,2,3 shows 3T3-L1 adipocytes. In the 3T3-L1 preadipocytes treated with *Hypericum perforatum* and control, the semiquantitative results of DGAT-1, LPL and 18S as housekeeping gene were observed after PCR (Figure 5).



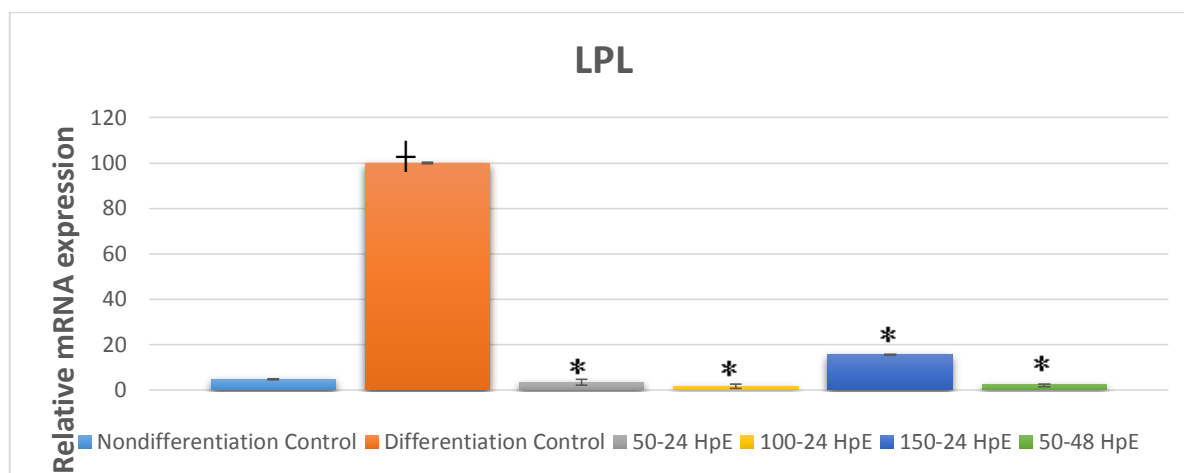
**Figure 5.** Semiquantitative PCR results of DGAT-1, LPL and 18S



**Figure 6.** Relative mRNA expression of DGAT-1 by Real Time PCR

\*means  $p < 0.05$  compare with differentiation control. \*\* means  $p < 0.001$  compare with differentiation control. †† means  $p < 0.001$  compare with nondifferentiation control.

Expression levels of LPL and DGAT-1 in adipocytes were observed by Real Time qPCR analysis. Administration of *Hypericum perforatum* extract to adipocytes led to the downregulation of the DGAT-1 and LPL gene (Figure 6, Figure 7). 24 hours and 48 hours application of 50 µg/ml, 100 µg/ml and 150 µg/ml *Hypericum perforatum* extracts were used in this study.



**Figure 7.** Relative mRNA expression of LPL by Real Time PCR

\*means  $p < 0.05$  compare with differentiation control. † means  $p < 0.05$  compare with nondifferentiation control.

In the present study, 3T3-L1 preadipocytes were transformed into adipocytes, followed by 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml *H.perforatum* extract treatment for 24 and 48 hours. cDNA was obtained from these cell groups and quantitative Real Time RT-PCR was performed. We observed that the application of *Hypericum perforatum* extract reduced the expression of DGAT-1 and LPL on transcriptional level. DGAT-1 and LPL both were downregulated and downregulation of DGAT-1 and LPL was statistically significant. The fact that these markers show a significant decrease with the application of plant extract were in consistence with the previous obesity related *in vivo* studies of the *Hypericum perforatum*.

## CONCLUSIONS

The application of *Hypericum perforatum* L. at different doses reduced the expression of DGAT-1 and LPL in fully differentiated 3T3-L1 cells. This also highlights the importance of transcriptional regulation of *Hypericum perforatum* L. to understand its antiobesity activity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant provided within the frame of Muğla Sıtkı Koçman University, Science Research Project (BAP) numbered ARGE 17/059.

## REFERENCES

- Greenberg, A. S., Nordan, R. P., McIntosh, J., Calvo, J. C., Scow, R. O., & Jablons, D. (1992). Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice *in vivo* and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer research*, 52(15), 4113-4116.
- Harris, C. A., Haas, J. T., Streeper, R. S., Stone, S. J., Kumari, M., Yang, K., Han, X., Brownell, N., Gross R., Zechner R., & Farese, R. V. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *Journal of lipid research*, 52(4), 657-667
- Yen et al. Glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(11), 2283–2301.
- Hartman AD., Lipoprotein lipase activities in adipose tissues and muscle in the obese Zucker rat, *Physiol Endocrinol Metabolism*, (1981). 241: E108 – E115.
- Hatano, T., Sameshima, Y., Kawabata, M., Yamada, S., Shinozuka, K., Nakabayashi, T., & Mizuno, H. (2014). St. John's wort promotes adipocyte differentiation and modulates NF-κB activation in 3T3-L1 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(7), 1132-1138.
- Husain, G. M., Chatterjee, S. S., Singh, P. N., & Kumar, V. (2011). Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardised extract of *Hypericum perforatum* L. in rats. *ISRN pharmacology*.
- Klemow, K. M., Bilbow, E., Grasso, D., Jones, K., McDermott, J., & Pape, E. (2004). Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Oxidative Stress and Disease*, 14, 757-780.

- Koren, D., & Taveras, E. M. (2018). Association of sleep disturbances with obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Metabolism*, 84, 67-75.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., & Abraham, J. P. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet*, 384(9945), 766-781.
- Sadur, U. N., Yost, T. J., & Eckel, R. H. (1984). Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 59(6), 1176-1182.
- Terrettaz, J., Cusin, I., Etienne, J., & Jeanrenaud, B. (1994). *In vivo* regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(1), 9-15.
- Tian, J. Y., Tao, R. Y., Zhang, X. L., Liu, Q., He, Y. B., Su, Y. L., Ji, T. F., Ye, F. (2015). Effect of *Hypericum perforatum* L. Extract on Insulin Resistance and Lipid Metabolic Disorder in High-Fat-Diet Induced Obese Mice. *Phytotherapy research*, 29(1), 86-92.
- Wang H. and Eckel R. Lipoprotein lipase: from gene to obesity, (2009). *Physiol Endocrinol Metab* 297:E271-E288.

## Zeytinyağının Raf Ömrü Üzerine Farklı Ambalaj Materyallerinin Etkileri

Pervin UZUN<sup>1</sup>, Nurdan AKBAŞ<sup>1</sup>, Aysun ŞEHİRLİ<sup>1</sup>, Orhan EREN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:pervin.uzun@tarimorman.gov.tr

### Özet

Zeytinyağı muhafazasında zeytinyağının kalitesini etkileyen faktörler genel olarak; ısı, ışık ve oksijendir. Çalışmamızda Gemlik ve Memecik çeşitlerinden erken hasat döneminde elde edilmiş naturel sızma zeytinyağında ışığın ve ambalaj materyalinin raf ömrü üzerine olan etkisini görmek amacıyla açık ve koyu renk cam, açık ve koyu renk polietilen ve metal ambalaj olmak üzere 5 farklı ambalaj materyali kullanılmıştır. Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsünden temin edilen zeytinyağları Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bitkisel Ürünler Bölümü Yağ Laboratuvarında, 25±3°C' de muhafaza edilmiştir. 1 yıl boyunca 2 aylık periyotlarda, ransimat analizi yapılarak raf ömrü üzerine ambalaj materyalinin etkisi ve çeşitler arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Ransimat analizi Metrohm 892 Professional Ransimat cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Jump istatistiki analiz programında değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** zeytinyağı, oksidatifstabilite, raf ömrü, Gemlik, Memecik

### Effects of different packaging materials on shelf life of olive oil

#### Abstract

Factors that affecting the quality of olive oil in olive oil storage are; heat, light and oxygen. In this study, 5 different packaging materials; light and dark glass, light and dark polyethylene and metal packaging were used in order to see the effect of light and packaging material on the shelf life of extra virgin olive oil which were obtained from Gemlik and Memecik varieties during early harvest period. Olive oils obtained from Bornova Olives Research Institute and they were kept at 25 ± 3 ° C in the Oils and fats Laboratory of the Central Research Institute of Food and Feed Control. The effect of packaging material on shelf life and differences between varieties were examined by ransimat analysis for 1 year in 2 months period. Ransimat analysis was performed with Metrohm 892 Professional Ransimat. The results were evaluated in Jump statistical analysis program.

**Keywords:** olive oil, oxidative stability, shelf life, Gemlik, Memecik

### GİRİŞ

Türkiye’de zeytin özellikle Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu (Nizip, Gaziantep) Bölgelerinde yetiştirilmektedir. Marmara Bölgesi daha çok salamura çeşitlerinin yetiştirildiği bir bölge olup üretiminin % 80’ini Gemlik çeşidi oluşturur. Ege Bölgesi ise üretiminin yaklaşık % 70’ini karşılar ve bu bölgede yağlık çeşitler yaygındır. En yaygın çeşitler ise Ayvalık ve Memecik’tir. Akdeniz Bölgesi’nde ise daha çok yağlık çeşit yetiştirilir fakat üretim oldukça düşüktür. Güney Anadolu’nun Gaziantep-Nizip bölgesinde bazı yağlık çeşitler yetiştirilmektedir (Tekin 2004; Karakuş 2008).

Natürel sızma zeytinyağı; doğrudan tüketime uygun, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 0,8 gramdan fazla olmayan yağlardır (TGK, 2017). Zeytinyağı muhafazasında kaliteyi etkileyen en önemli faktörler genel olarak ısı, ışık ve oksijendir. Ambalajlama sırasında da ambalaj materyalinin seçiminden başlayarak, gerek metal kontaminasyonu ve sıcaklık artışını engellemek, gerekse yağın hava ve ışıkla temasının engellenmesine daima özen göstermek gerekmektedir. Zeytinyağı ambalajlamada kullanılan malzemeler: teneke cam plastik (pvc, polyetilen) özel kaplanmış karton kutulardır.

**Teneke Kutular:** Teneke kutularda aranacak nitelikler: Sert olmaları İçindeki ürünü iyi bir şekilde korumaları Ulaşım ve depolama dayanıklılığı İstiflenebilme özellikleri Ancak bunların kalay kaplamalarının kusurlu ve dağılımının homojen olmadığı durumlarda, bu kutulara konan ürünün kalitesinde bozulmaya, kutuların korozyona uğramasına ve paslanmasına neden olabilmektedir.

**Cam Şişeler:** Kimyasal olarak nötr olmaları İçlerine giren maddeyle reaksiyona girmemeleri Çekici tasarımları İçlerindeki mamulü göstermeleri Cam şişelerin olumsuz özellikleri nelerdir? Kırılgan oluşu Diğer malzemelere göre daha ağır olması Cam bir ambalaj malzemesi olarak sahip olduğu olumlu özellikler nedeni ile gıda ve içecek sektöründe çok yaygın ölçüde kullanılmaktadır. Cam şişelerin ışık geçirgenliği ile ilgili dezavantajı renklendirilmek suretiyle giderilebilmektedir. Kahverengi (amber) ve yeşil renkli cam şişeler elde

etmek mümkündür. Görülebilir ışık amber renkli şişe camından %10-40 oranında geçebildiği halde, şeffaf şişe camında bu oran %85-90 dır. Zeytin yağları cam şişelerde ambalajlı olarak uzun süre doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmamalı ve vitrinlerde bekletilmemelidir. Bu husus ürün etiketinde de belirtilmelidir.

**Plastik şişeler :** İçeriğin dış etkenlerden korunması Kimyasal ve bakteriyolojik bulaşmaların önlenmesi Kolay işlenebilir olması Taşıma ve kullanım kolaylıkları Bu ambalajlarla ilgili dezavantaj ise uygun plastik malzemelerin kullanılmaması halinde gıda ile plastik arasında migrasyonun söz konusu olmasıdır (Kıvrak M., 2019).

**Özel Kaplanmış Karton Kutular:** Bu ambalajların kullanımı öncelikle içme sütü ambalajlanmasıyla başlamış olup, üstün nitelikleri sayesinde kullanım sahası hızla artmıştır. Bu ambalajlar aseptik şartlarda doluma uygun olup, ürünlerin raf ömürlerini uzatmaktadır. Aseptik ambalaj (13); - neme karşı koruyucu polietilen, - sağlamaştırıcı, güçlendirici, karton - yapıştırıcı polietilen, - oksijen, koku ve ışığı engelleyen aseptik alüminyum folyo, - yapıştırıcı polietilen, - sıvı tutucu polietilen katmanlarından oluşmaktadır. Ambalaj malzemesi ile yağ arasındaki etkileşimler ve ilişkiler büyük oranda zamana bağlıdır. Migrasyon olasılığını minimize etmek bakımından, zeytinyağının ambalajlanmasından tüketimine kadar geçen sürenin kısa olması son derece yararlı olmaktadır (Kara, 2008).

Oksidasyon gıda teknolojisinde en büyük problemlerden birisidir. Yağların oksidasyon kararlılıklarının belirlenmesinde sıklıkla Schaal etüv testi, Aktif Oksijen Yöntemi (AOM) ve Ransimat metotları kullanılmaktadır. Günümüzde, bu üç yöntem yağ bilimi ve teknolojisinde yağların oksidatif stabiliteilerinin ölçümünde en yaygın şekilde kabul görmektedirler. Schaal fırın testi, fırın testi olarak ta adlandırılır. Yağ bozuluncaya kadar ya da peroksit değeri, konjuge dienler, karbonil değeri veya hekzanal değerleri tanımlanmış son noktaya ulaşıncaya kadar 60 °C'de çalışılır. AOM peroksit analizi içeren ve zaman alıcı bir yöntemdir. Ransimat yöntemi, kullanımı ve tekrarlanabilirlik kolaylığı nedeniyle kabul görmüştür ( Dıraman H. ve Baydır T, A., 2017).

Çalışmamızda Gemlik ve Memecik çeşitlerinden erken hasat döneminde elde edilmiş naturel sızma zeytinyağında ışığın ve ambalaj materyalinin raf ömrü üzerine olan etkisini görmek amacıyla açık ve koyu renk cam, açık ve koyu renk polietilen ve metal ambalaj olmak üzere 5 farklı ambalaj materyali kullanılmıştır ve oksidatif stabiliteileri incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda Gemlik ve Memecik çeşitlerinden erken hasat döneminde elde edilmiş naturel sızma zeytinyağında ışığın ve ambalaj materyalinin raf ömrü üzerine olan etkisini görmek amacıyla; açık renk cam, koyu renk cam, açık renk plastik, koyu renk plastik ve teneke ambalaj olmak üzere 5 farklı ambalaj materyali kullanılmıştır.

Zeytinyağları Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Zeytinyağları Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bitkisel Ürünler Bölümü Yağ Laboratuvarında, 25±3°C' de muhafaza edilmiştir. 1 yıl boyunca 2 aylık periyotlarda, ransimat analizi yapılarak raf ömrü üzerine ambalaj materyalinin etkisi ve çeşitler arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Ransimat analizi Metrohm 892 Professional Ransimat cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Jump istatistiki analiz programında değerlendirilmiştir.

Ransimat metodu, yağın oksidasyon kararlılığını tayin etmek için hazırlanmış bir metottur. Bu metot, sıcaklığı arttırarak ve içinden sürekli hava akımı geçirerek numunenin bozunma sürecinin hızlandırılmasına dayanır.

Hava akışı, uçucu oksidasyon ürünlerini distile su içeren bir kap içine taşımaktadır. Bu suyun iletkenliği sürekli olarak ölçülür. Bu kap içerisindeki iletkenlik artışları oksidasyon ürünleri ile oluşur. İletkenlikte ani, kuvvetli bir artış ile bir eğri ortaya çıkar ve indüksiyon zamanı işaretlenir.

Ransimat analizi 100°C, 110°C, 120°C ve 130°C olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Saptanan indüksiyon süreleri kullanılarak ekstrapolasyon yardımıyla oda sıcaklığındaki (25±3°C) indüksiyon süresi (raf ömrü) tahminlenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

**Tablo 1.** Çeşitlere ait raf ömrü (oksidatif stabilite) değerleri (yıl)

Çeşit	Ransimat ilk ay (yıl)	Ransimat 1 yılın sonunda (yıl)
Memecik	2.52 B	1.06 B
Gemlik	3.55 A	1.4 A

Çeşitler arasındaki fark incelendiğinde zeytinyağı sıkıldıktan hemen sonra yapılan analizler doğrultusunda gemlik çeşidinin 3.55 yıl, memecik çeşidinin ise 2,52 yıl raf ömrü değeri gösterdiği tespit edilmiştir. 2 ayda bir yapılan analizler göz önüne alındığında gemlik çeşidinin memecik çeşidine oranla daha hızlı bozunma gösterdiği sonucu elde edilmiştir. Karakuş 2008, zeytinyağının bileşiminde birçok fonksiyonel gruba sahip bileşikler bulunduğunu, bu gruplardan fenolik bileşikler zeytin yağında minör bileşikler olup, natürel zeytin yağının kalitesini tayin ederken göz önünde bulundurulması gereken önemli faktörler olduğunu bildirmiştir. Söz konusu bu bileşiklerin yağın oksidatif bozunmasından ve duyuusal algılanmasından kısmen sorumlu olduğunu, fenolik bileşikler ve miktarı, zeytin çeşidine, meyve olgunluğuna, zeytinin depolanma koşullarına, yağ elde etme sistemleri ve yağın depolama koşulları gibi birçok faktöre göre değişim gösterdiğini belirtmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlardaki değişimlerin çeşitlerin sahip oldukları fenolik bileşenlerinin miktarsal olarak farklılık göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Tablo 2.** Ambalaj materyallerine ait raf ömrü (oksidatif stabilite) değerleri (yıl)

Ambalaj	Ransimat ilk ay (yıl)	Ransimat 1 yılın sonunda (yıl)
Teneke	3,05 A	1,85 A
Açık renk cam	3,03 A	1,30 B
Açık renk plastik	3,04 A	0,97 C
Koyu renk cam	3,03 A	1,43 B
Koyu renk plastik	3,03 A	0,62 D

Ambalaj materyalinin raf ömrüne etkisi incelendiğinde; zeytinyağının ilk elde edildiği tarihte raf ömrü ortalama 3 yıl olduğu saptanmıştır. Bir yılın sonunda yapılan analizlerde teneke ambalajda muhafaza edilen yağın daha az bozunarak raf ömrü değerinin değiştiği, bunu sırasıyla koyu renk cam ambalaj, açık renk cam ambalaj, açık renk plastik ve son olarak ta koyu renk plastik ambalajın takip ettiği görülmektedir.

## SONUÇ

Lipit oksidasyonu oda sıcaklığında yavaş bir şekilde gerçekleşir. Ancak, bu zeytinyağı kalitesinin bozulmasının ana sebebidir ve bu reaksiyon oranı zeytinyağının raf ömrünü belirler. Lipolizis ve oksidasyon zeytinyağının bozulmasına yol açan en ciddi proseslerdir. Oksidasyon, meyveden yağ elde edildikten sonra başlar ve depolama süresince devam eder (Karakuş, 2008).

Ransimat analizi ile elde edilen sonuçlar hangi yağların daha çabuk, hangilerinin daha geç bozunacağını göstermektedir. Söz konusu analiz ile yağların oksidasyon stabiliteleri hakkında oldukça önemli bilgiler elde edilebilmektedir.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda gemlik çeşidinin memecik çeşidine göre daha yüksek raf ömrüne sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Ambalaj materyalinin seçiminin zeytinyağının kalitesine olan etkisi oldukça önemlidir. Çalışmamızda zeytinyağı kalitesini en iyi koruyan ambalaj materyalinin teneke olduğu, bunu koyu renk cam ve açık renk cam materyalin kullanılmasının en doğru seçim olduğu yargısına varılmıştır. Plastik ambalaj materyalinde muhafaza edilen zeytinyağlarının kalitesini hızla düşüş gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Dıraman H. ve Baydır T, A., 2017. Yağların Oksidasyon Kararlılıklarının Tespit Edilmesinde Kullanılan Hızlandırılmış Stabilite Metotları ve Bu Metotların Karşılaştırılması. Gıda ve Yem Bilimi - Teknoloji Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology 18: 34-41 (2017/2) araştırma.tarim.gov.tr/bursagida ISSN 1303-3107).
- Karakuş M., 2008. Bazı Zeytin Çeşitlerinden Elde Edilen Yağların Oksidasyon Stabilitelerinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Kara H.H., 2008. Zeytinyağının Depolanması Ve Ambalajlanması. I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi 17-18 Mayıs 2008 / Edremit-Balıkesir.
- Kıvrak M., 2019. Zeytincilik Ve Zeytin İşleme Teknolojisi Programı Ders Notları T.C. Balıkesir Üniversitesi Edremit Meslek Yüksekokulu. 01.07.2019.
- Tekin, A. 2004. Zeytin yağı teknolojisi ders notları, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, (yayınlanmamış), Ankara.
- TGK, 2017. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı Ve Prina Yağı Tebliği Tebliğ No: 2017/26).

## Postpartum depresyon ve omega-3 yağ asitleri arasındaki ilişki

Fatma Mert Biberoglu

İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: fbiberoglu@medipol.edu.tr

### Özet

(1) Gebelik sırasında ve postpartum dönemde görülen major depresif bozukluk maternal ve neonatal morbidite ile ilişkilidir. Gebelik esnasında görülen depresyon, postpartum depresyonu (PPD) tetikleyebildiğinden mutlaka tedavi edilmesi ya da önlenmesi gerekmektedir. Gebelik döneminde antidepresanlar kullanılırsa, bu ilaçlara maruz kalan bebeklerde nörodavranışsal bozukluklar görülmektedir. Bu yüzden PPD'nin önlenmesi için bazı besinlerin etkileri araştırılmaktadır.

(2) Depresyonun önlenmesi veya etkilerinin hafifletilmesinde önemli etkileri olan besinler, omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerini içeren balık yağı ve deniz ürünleridir. İnsan vücudunda doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri (omega-9) yapılmasına rağmen çoklu doymamış yağ asitleri (omega-3 ve omega-6) yapılamamaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri önemli hormonların öncüsüdürler, bu yüzden yeterli miktarlarda dışarıdan alınmaları gerekmektedir. Omega-6 yağ asitleri (linoleik asit) bitkisel sıvı yağlarda, omega-3 yağ asitleri ( $\alpha$ -linolenik asit) ise balık, keten tohumu, ceviz, soya, badem, kolza yağında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda omega-3 yağ asitlerinin PPD gelişmesinin önlenmesinde büyük rol oynadığı gösterilmiştir. Bu derlemede, omega-3 yağ asitleri ile PPD gelişme riskleri arasındaki ilişki anlatılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Postpartum depresyon, Çoklu doymamış yağ asitleri, EPA, DHA

### The relationship between postpartum depression and omega-3 fatty acids

#### Abstract

Major depressive disorder during pregnancy and postpartum period is associated with maternal and neonatal morbidity. Depression seen during pregnancy can trigger postpartum depression (PPD), so it must be treated or prevented. If antidepressants are used during pregnancy, neurobehavioral disorders are observed in babies exposed to these drugs. Therefore, the effects of some nutrients are investigated for the prevention of PPD.

Nutrients that have significant effects on the prevention or alleviation of depression are fish oil and sea products containing omega-3 polyunsaturated fatty acids. While saturated and monounsaturated fatty acids (omega-9) are made in the human body, polyunsaturated fatty acids (omega-3 and omega-6) cannot be made. Polyunsaturated fatty acids are the precursors of important hormones, so they must be taken in sufficient quantities. Omega-6 fatty acids (linoleic acid) are found in vegetable oils, while omega-3 fatty acids ( $\alpha$ -linolenic acid) are found in fish, flaxseed, walnut, soy, almond, rapeseed oil. Studies have shown that omega-3 fatty acids play a major role in preventing the development of PPD. In this review, the relationship between omega-3 fatty acids and PPD development risks will be explained.

**Keywords:** Postpartum depression, polyunsaturated fatty acids, EPA, DHA

#### GİRİŞ

(3) Depresyon psikiyatrik hastalıklar arasında en sık görülenlerden biridir. Depresyon görülme sıklığı kadınlar için %10-25 arasında değişmekte olup, erkeklerden yaklaşık 2 kat daha fazladır (Akdeniz and Aldemir, 2009; Brummelte and Galea, 2016; Çalık and Aktaş, 2011; Dennis and others, 2016; Efe and others, 2009). Gebelik ve doğum ile birlikte depresyon oluşma sıklığı artmaktadır. Depresyonu olan kadınların %26'sı gebelik sırasında, %45-65'i ise postpartum dönemde bu hastalıkla karşılaşmaktadır. Postpartum depresyon (PPD) tedavi edilmezse, tekrarlayan depresif atağa yol açabilir, anne-bebek etkileşimini bozabilir ve çocuk gelişimi için risk faktörü oluşturabilir (Efe and others, 2009; Erdem and Bucaktepe, 2012). Son zamanlarda, gebelikte deniz ürününün düşük düzeyde alınmasının PPD için bir risk faktörü olabileceği hipotezine dikkat çekilmiştir. Bununla ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunu omega-3 yağ asitleri oluşturmaktadır. Omega-3 yağ asitlerinin biyolojik olarak en aktif formları deniz ürünleri ve yosunlardan primer olarak elde edilen dokozahexaenoik asit (DHA) ve eikozapentaenoik asit (EPA)'tir. Özellikle DHA'nın eksikliğinde depresif hastalıkların meydana geldiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Karabulut and Yandı, 2006; Markhus and others, 2013).



(4) Bu derlemede PPD gelişme etmenleri ve omega-3 yağ asitlerinin PPD gelişimi üzerine olan etkileri anlatılacaktır.

### **Depresyon**

Depresyon; derin üzüntülü bir duygudurum içinde düşünce, konuşma, hareketlerde yavaşlama ve durgunluk, değersizlik, küçüklük, güçsüzlük, isteksizlik, karamsarlık, intihar gibi duygu ve düşünceleri ile fizyolojik işlevlerde yavaşlama gibi belirtileri içeren bir sendromdur (Çalık and Aktaş, 2011). Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak biyolojik, psikososyal, nöroendokrin ve nöroanatomi etkenler olmak üzere birçok farklı etken grubu vardır. Biyolojik etkenler arasında norepinefrin, serotonin, dopamin, asetilkolin bozuklukları yer almaktadır. Psikososyal etkenler arasında hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninde uyarı cevabına neden olur ve katekolaminlerin seviyelerinde değişiklikler meydana gelebilir. Nöroendokrin etkenler adrenal, tiroit ve büyüme hormonu ile ilişkilidir. Nöroanatomi etkenlerde ise limbik sistem, bazal gangliyonlar ve hipotalamus dejenerasyonu veya anomalileri depresyona neden olmaktadır (Brummelte and Galea, 2016).

Depresyon, duygudurum bozuklukları arasında en fazla görülen bir rahatsızlıktır. Yaşam boyu gelişme olasılığı kadınlar için %10-25, erkekler için ise %5-12 arasındadır. Depresyonda cinsler arası fark ergenlikte ortaya çıkmakta ve menopoz sonrası azalmaktadır (Akdeniz and Aldemir, 2009; Brummelte and Galea, 2016; Çalık and Aktaş, 2011; Efe and others, 2009). Kadınlar üreme dönemleri boyunca üreme hormonlarında meydana gelen değişikliklerin olduğu dönemlerde psikiyatrik rahatsızlıklara daha yatkın hale gelirler. Bu değişikliklerin belirgin olduğu dönemler menstruasyon döngüsünün geç luteal evresi ve postpartum dönemdir (Akdeniz and Aldemir, 2009). Gebelik ve doğumla birlikte kadınlarda depresyon görülme sıklığı artmaktadır. Bu hem annede belirgin hastalıklara yol açar hem de çocuğun gelişimini olumsuz etkilemektedir (Efe and others, 2009; Erdem and Bucaktepe, 2012). Depresyonu olan kadınların %26'sı gebelik sırasında, %45-65'i ise postpartum dönemde bu hastalıkla karşılaşmaktadır (Efe and others, 2009).

### **Gebelik Depresyonu**

Gebelik, kadınlar için doğal bir yaşam olayı olmasının yanı sıra önemli biyolojik ve psikososyal değişimlerin yaşandığı kaygı ve stres oluşturabilecek birçok etkenle karşılaşma olasılığının yüksek olduğu bir dönemdir. Bu yüzden gebelik, kadınların yaşamında fazlasıyla etki gösteren stresli bir dönemdir. Sıklıkla endişe ve depresyonla birleşmektedir. Gebelikte depresif belirti görülme sıklığı gebelik trimesterine göre değişiklik gösterebilmektedir. Literatürde birinci ve üçüncü trimesterlerde daha fazla depresyon ve anksiyetenin yaşandığı belirtilmektedir. Gebelik depresyonu, fetüsü ve annenin iyilik halini olumsuz etkilemesi ve postpartum depresyona zemin hazırlamasından dolayı (6,5 kat artırır) üzerinde önemle durulup, erken tanı konulması ve tedavi edilmesi gereken bir sorundur (Çalık and Aktaş (2011).

### **Postpartum Depresyon**

Postpartum depresyon, doğum sonrasında kadınların %10-20'sini etkileyen, majör depresyonun bir alt tipidir (Akdeniz and Aldemir, 2009; Aydın and Tamam, 2006; Erdem and Bucaktepe, 2012; Leung and others, 2013; Levant, 2011; Markhus and others, 2013). Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise PPD sıklığının %21,2-28 arasında değiştiği bildirilmiştir. Gazi Üniversitesi Hastanesi'nde bir yıl içinde doğum yapmış ve postpartum 4. haftadaki 214 kadın üzerinde yapılan çalışmada, doğum sonu 4. haftadaki kadınların %23,4'ünde PPD riski olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucu daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir (Efe and others, 2009).

Amerikan Psikiyatri Birliği'nin yayınladığı Ruhsal Bozuklukların Tanımı ve Sayımsal El Kitabı'na (DSM-IV) (Çalık and Aktaş, 2011) göre "postpartum başlangıçlı depresif dönem" tanısı konulabilmesi için depresyonun doğum sonrası ilk dört hafta içinde başlamış olması gerekmektedir (Akdeniz and Aldemir, 2009; Erdem and Bucaktepe, 2012). Ancak bazı çalışmalarda başlangıç döneminin 6-12. haftalarda olmak üzere bir yıl içinde herhangi bir dönemde olabileceği bildirilmiştir (Akdeniz and Aldemir, 2009; Efe and others, 2009; Erdem and Bucaktepe, 2012). Daha sonra 2013 yılında yenilenen DSM-V'e göre gebelikte ve postpartum dönemde görülen psikiyatrik bozuklukları ayrı bir klinik tanı olarak tanımlanmamış olup, postpartum depresyon DSM-V'de "Duygudurum Bozuklukları" içinde yer almakta ve "Postpartum Başlangıç Belirleyicisi" başlığı altında postpartum dört hafta içinde epizodun başlaması şeklinde tanımlanmaktadır (Aktaş and others).

Postpartum depresyon için başlıca risk faktörleri (Akdeniz and Aldemir, 2009; Aydın and Tamam, 2006; Çalık and Aktaş, 2011; Leung and others, 2013; Markhus and others, 2013);

- Genetik faktörler (%40-50 genetikle ilişkili, birinci derece akrabalarda depresyon varlığı, çevresel faktörlerle birlikte ele alınmalı),
- Psikolojik faktörler (geçmişinde depresyon veya psikiyatrik hastalıkların varlığı, gebelik sırasında depresyon/anksiyete öyküsü, gebeliğine yönelik zıt duygular gibi),
- Çevresel faktörler (stres, fiziksel, duygusal ve mental travma, viral enfeksiyonlar, kronik hastalıklar, oral kontraseptif kullanma),
- Sosyal faktörler (evlilik sorunları, yalnız yaşama, boşanma, ekonomik düzey düşüklüğü, sosyal destek azlığı veya yokluğu, sosyal izolasyon, aile içi şiddet, fiziksel, duygusal ve cinsel şiddet öyküsü varlığı, sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı),
- Biyolojik faktörler (malnütrisyon sonucu nörotransmitter ve hormonal fonksiyon bozukluğu),
- Hormonal faktörler (doğum sonrası östrojen, progesteron, kortizol düzeylerinin aniden düşmesi, prolaktin, tiroid stimüle eden hormon, triiodotironin/tiroksin oranı değişikliği) 'dir.

Postpartum depresyon tedavi edilmezse tekrarlayan depresif atağa yol açıp, bebeğin gelişimini olumsuz etkileyebilmekte, hem kadının yaşam kalitesini düşürüp, hem de annenin intiharına ve bebeğine zarar vermesine yol açabilmektedir (Efe and others, 2009; Levant, 2011).

### Postpartum Depresyon ve Beslenme

Son zamanlarda, beslenme ve ruh sağlığı arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir. Bu yüzden omega-3 yağ asidi, D ve B12 vitamini, iyot, selenyum ve yüksek kaliteli protein içeren deniz ürünlerinin tüketimi, diyetin önemli bir parçası olarak kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün son raporlarında gebelik ve ruh sağlığı arasında deniz ürünlerinin önemi vurgulanmaktadır. Gözlemsel ve klinik çalışmalarda, PPD etiolojisinde omega-3 yağ asidi tüketiminin etkileri araştırılmış ve düşük omega-3 yağ asidi seviyesi ile PPD oluşumu arasında bir ilişki ortaya konulmuştur Karabulut and Yandı (2006); (Markhus and others, 2013).

### Omega-3 Yağ Asitleri

Fonksiyonel besinlerden biri olan omega-3 yağ asitleri (Coşkun, 2005; Erkan, 2013), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin (LC-PUFA) bir grubuna verilen isimdir. Doymamış yağ asitleri, molekül dizilişlerinde karbon atomları arasında çeşitli sayıda çift bağ içermektedir. Doymamış yağ asitleri belirtilirken, isimlerinin yanında özel nümerik sistemler kullanılır. Örneğin; 18:3 (n-3) şeklinde gösterilen linolenik asidin, 3 adet çift bağ içeren 18 karbon atomundan oluştuğu, ilk çift bağın 3. karbon atomu ile 4. karbon atomu arasında olduğunu göstermektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerinden biri olan  $\alpha$ -linolenik asitler (ALA) vücutta sentezlenemediklerinden dolayı esansiyel olarak adlandırılmakta ve besinlerle dışarıdan vücuda alınması gerekmektedir (Erkan, 2013; Karabulut and Yandı, 2006; Mol, 2008). En yaygın görülen omega-3 yağ asitleri eikozapentaenoik asit (EPA), dokozaheptaenoik asit (DPA) ve dokozaheksaenoik asit (DHA)'tır. ALA, vücutta EPA ve DHA'ya metabolize olarak etkinlik göstermektedir.

Balık yağları omega-3 yağ asidi için en zengin kaynaktır, aynı zamanda EPA ve DHA için ise tek kaynak durumundadır (Erkan, 2013; Karabulut and Yandı, 2006; Mol, 2008; Turan and others, 2006). Bu yüzden haftada en az 3 kez besin gereksinimini sağlayacak şekilde, omega-3 yağ asidinden zengin balıkların 200-300 gram kadar tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Aynı zamanda alınması tavsiye edilen günlük ortalama miktarlar aşağıda verilmiştir (Karabulut and Yandı, 2006; Markhus and others, 2013):

1. ALA: Kadınlar 2,0 g, erkekler 3,0 g
2. EPA ve DHA: Kadınlar 1,1 g, erkekler 1,4 g

Omega-3 yağ asitlerinden zengin olan yiyecekler; somon gibi soğuk sulara yaşayan yağlı balıklar, ton balığı, uskumru, sardalya ve bu gibi balıkların yağlarından elde edilen balık yağı preparatları, keten tohumu, kanola, ceviz, soya, badem ve bunların yağları ile yeşil yapraklı sebzeler (özellikle semizotu) temel kaynak olarak gösterilmektedir (Erkan, 2013).

Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri nöronlar dahil olmak üzere bütün hücre zarlarını oluşturan, beyinde yüksek miktarda bulunan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla gen ekspresyonunu modüle eden, prostaglandin ve lökotrienler gibi sinyal moleküllerinin ön maddeleri olan fosfolipidlerin önemli bir bileşenidir (Levant, 2011; Levant and others, 2006; Levant and others, 2007). Beyinde LC-PUFA'nın baskın türü olan DHA, beyindeki yağ asitlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. DHA miktarının azalması depresif hastalıklarla

ilişkilidir. Depresif hastalarda eritrosit ve adipoz hücrelerindeki DHA içeriğinin kontroller ile kıyaslandığında %22 oranında azaldığı ve semptomların şiddeti veya intihar girişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (De Vriese and others, 2003; Levant, 2011; Levant and others, 2006).

İnsan beyninde DHA çoğunlukla gebeliğin üçüncü trimesterinde birikir ve yaşamın ilk birkaç yılında birikmeye devam eder. Konsantrasyonları maternal diyete ve anne sütünün içeriğine göre farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar ile maternal plazma DHA düzeylerinin tek bir gebelik sonrasında %50 oranında azalabildiği bildirilmiştir (Levant, 2011). Buna bağlı olarak da beyindeki DHA'nın azalması ile PPD için potansiyel risk faktörü oluşturduğu tanımlanmaktadır. Bu yüzden gebelere ve laktasyon dönemindeki kadınlara en az 300 mg DHA tüketmesi önerilmektedir (Levant and others, 2006).

Çeşitli çalışmalarda omega-3 yağ asitleri alım düzeyi ile depresyon arasında ters bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Batı Norveç'te Kasım 2009-Haziran 2011 arasında yapılan toplum merkezli prospektif kohort çalışma, 28. gebelik haftası dolmuş tüm kadınlar arasında yapılmıştır. Bulgular Edinburgh Postnatal Depresyon Ölçeği (EPDÖ) kullanılarak değerlendirilmiştir. EPDÖ; postpartum dönemdeki depresyonun yaygınlığını ve şiddetini tespit etmek için geliştirilen basit, 10 soruluk bir öz-bildirim ölçeğidir. Bu çalışmanın sonucunda EPDÖ skoru (bağımlı değişken) ile DPA, DHA içeriği, omega-3 düzeylerinin ters bir şekilde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Gebeliğin geç dönemindeki düşük maternal omega-3 düzeyi ile depresif belirtilerin postpartum üç aylık dönemde yüksek seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır (Markhus and others, 2013).

Kanada'da 475 gebe üzerinde yapılan bir çalışmada, prenatal dönemde mikro-besin ögesi alımı ve mevcut durumdaki sosyal faktörler ile postpartum üçüncü ayı boyunca PPD gelişme riski araştırılmıştır. Çalışmaya katılan kadınların büyük çoğunluğu (%99) prenatal dönemde mikro besin ögesi takviyesi (B6, B12, E vitamini, folik asit) almıştır. Omega-3'ü yeterli miktarda almayan kadınların %68,5'inde EPDÖ<10 (p=0.0015), hiç omega-3 almayan kadınların %78'inde EPDÖ≥10 (p=0.01) olduğu tespit edilmiştir. EPDÖ≥10 olması PPD varlığını ve şiddetini göstermektedir (Leung and others, 2013).

Omega-3 kullanımının PPD gelişme riskini azalttığına dair bulguların dışında bunu desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur. Büyük ölçekte balık tüketimi ile PPD arasındaki ilişkiyi ele alan ilk prospektif kohort çalışmada, Danimarka Psikiyatri Merkezi kayıtları kullanılarak postpartum 1 yıl boyunca depresyondan dolayı psikiyatri servislere başvuran 54202 kadın tespit edilmiştir. Balık tüketimi ile ilgili bilgiler Danimarka Kanseri Merkezi tarafından tasarlanmış bir anketin değiştirilmiş versiyonu olan besin tüketim sıklığı anketi (FFQ) kullanılarak elde edilmiştir. DHA alımı, yağlı balık ve yağsız balık tüketimi gibi veriler tamamlayıcı analizlerde kullanılmıştır. Bu analizler odds ratio (OR) ve ki-kare testleri kullanılarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre >30 g/gün balık tüketen kadınlarda PPD önlenmesi arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Ayrıca 10-20 g/gün balık tüketen kadınlarda PPD gelişme riski yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunamamışken, <3 g/gün balık tüketen kadınlarda ise PPD gelişmesinde yüksek risk altında oldukları tespit edilmiştir. Omega-3 alımı ile gebelik ve postpartum dönemdeki depresyon üzerine yapılan çalışmalarda çelişkili bulgular elde edilmiştir (Strøm and others, 2009).

## SONUÇ

(5) Postpartum depresyonun yaygınlığını saptamak amacıyla yapılan araştırmaların bir kısmının depresyonun tanısallık değerlendirilmesine, bir kısmının da depresyon belirtilerinin şiddetinin ölçümüne dayanması, birbirini tutmayan verilerin elde edilmesine neden olmuştur. Buna rağmen, omega-3 tüketiminin PPD gelişme riski üzerine yararlı etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Ancak daha kesin sonuçların elde edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

(6) Omega-3 yağ asitlerini içeren balık yağlarının balık tüketerek veya besin takviyesi olarak alınması depresyon ve PPD gelişme riskleri açısından önem taşımakta olup, günde 3 grama kadar omega-3 yağ asidi alınmasının FDA tarafından güvenli olduğu bildirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akdeniz F, Aldemir E. 2009. Kadınlara özgü ruhsal hastalıklar. Klinik Gelişim 22:80-83.  
Aktaş MC, Şimşek Ç, Aktaş S. Postpartum Depresyonun Etiyolojisi: Kültür Etkisi. JAREN/Hemşirelik Akademik Araştırma Dergisi 3(Supp: 1):10-13.  
Aydın H, Tamam L. 2006. Postpartum depresyonda kültürel faktörler.  
Brummelte S, Galea LA. 2016. Postpartum depression: etiology, treatment and consequences for maternal care. Hormones and behavior 77:153-166.

- Coşkun T. 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 48(1):61-84.
- Çalık KY, Aktaş S. 2011. Gebelikte Depresyon: Sıklık, Risk Faktörleri ve Tedavisi Depression in Pregnancy: Prevalence, Risk Factors and Treatment. Psikiyatrik Güncel Yaklaşımlar [Current Approaches in Psychiatry] 3:142-162.
- De Vriese S, Christophe A, Maes M. 2003. Lowered serum n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels predict the occurrence of postpartum depression: further evidence that lowered n-PUFAs are related to major depression. Life sciences 73(25):3181-3187.
- Dennis CL, Brown HK, Morrell J. 2016. Interventions (other than psychosocial, psychological and pharmacological) for preventing postpartum depression. Cochrane Database of Systematic Reviews(5).
- Efe Ş, Taşkın L, Eroğlu K. 2009. Türkiye’de postnatal depresyon ve etkileyen faktörler. J Turkish German Gynecol Assoc 10:14-20.
- Erdem Ö, Bucaktepe PGE. 2012. Postpartum depresyon görülme sıklığı ve tarama yöntemleri. Dicle Tıp Dergisi 39(3):458-461.
- Erkan N. 2013. TÜRKİYE'DE TÜKETİLEN SU ÜRÜNLERİNİN OMEGA-3 ([omega]-3) YAG ASIDI PROFİLİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ. Journal of FisheriesSciences com 7(2):194.
- Karabulut HA, Yandı İ. 2006. Su Ürünlerindeki Omega-3 Yağ Asitlerinin Önemi ve Sağlık Üzerine Etkisi. Su Ürünleri Dergisi 23(3):339-342.
- Leung BM, Kaplan BJ, Field CJ, Tough S, Eliasziw M, Gomez MF, McCargar LJ, Gagnon L. 2013. Prenatal micronutrient supplementation and postpartum depressive symptoms in a pregnancy cohort. BMC pregnancy and childbirth 13(1):2.
- Levant B. 2011. N-3 (omega-3) Fatty acids in postpartum depression: implications for prevention and treatment. Depression research and treatment 2011.
- Levant B, Ozias MK, Carlson SE. 2006. Diet (n-3) polyunsaturated fatty acid content and parity interact to alter maternal rat brain phospholipid fatty acid composition. The Journal of nutrition 136(8):2236-2242.
- Levant B, Ozias MK, Carlson SE. 2007. Specific brain regions of female rats are differentially depleted of docosahexaenoic acid by reproductive activity and an (n-3) fatty acid-deficient diet. The Journal of nutrition 137(1):130-134.
- Markhus MW, Skotheim S, Graff IE, Frøyland L, Braarud HC, Stormark KM, Malde MK. 2013. Low omega-3 index in pregnancy is a possible biological risk factor for postpartum depression. PloS one 8(7):e67617.
- Mol S. 2008. BALIK YAĞI TÜKETİMİ VE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ. Journal of FisheriesSciences com 2(4):601-607.
- Strøm M, Mortensen EL, Halldorsson TI, Thorsdottir I, Olsen SF. 2009. Fish and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intakes during pregnancy and risk of postpartum depression: a prospective study based on a large national birth cohort. The American journal of clinical nutrition 90(1):149-155.
- Turan H, Kaya Y, Sönmez G. 2006. Balık etinin besin değeri ve insan sağlığındaki yeri. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi 23(1/3):505-508.

## Two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanosheets with molecularly imprinted polymer for electrochemical determination of citrinin

Muhsin Doğan<sup>1\*</sup>, Necip Atar<sup>2</sup>, Mehmet Lütfi Yola<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Engineering, Department of Biomedical Engineering, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey

<sup>3</sup>Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

Corresponding author e-mail: doganmuhsin.01@gmail.com

### Abstract

A new molecular imprinted sensor approach based on two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride (2D-hBN) nanosheets was presented for citrinin (CIT) detection. All nanomaterials' formation and properties were highlighted with scanning electron microscope (SEM), x-ray diffraction (XRD) method, cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). CIT imprinted voltammetric sensor was improved in presence of 80.0 mM phenol containing 20.0 mM CIT by CV.  $1.0 \times 10^{-13}$  -  $1.0 \times 10^{-8}$  M and  $3.0 \times 10^{-14}$  M were founded as the linearity range and the detection limit (LOD). Finally, CIT imprinted glassy carbon electrode (GCE) was used for food sample analysis.

**Keywords:** Two-dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride; Core-shell Nanoparticles; Fuel Cell

### INTRODUCTION

CIT is mutagenic and carcinogenic metabolite and first isolated from *Penicillium citrinum*. It is one of the mycotoxins which have resistance to decomposition. Due to this property, they are found in various food samples such as cheese, barley and red yeast rice, apples (Ahmed et al., 2007; Atar et al., 2015). They also have negative effects such as liver and kidney diseases. CIT, 4,6-dihydro-8-hydroxyl-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylic acid, is toxic material which has various effect such as nephrotoxic, hepatotoxic and immuno-toxic (Markov et al., 2013).

Hexagonal boron nitride nanosheets are promising 2D materials because of important applications such as electronic, sensor and catalysis. In addition, 2D-hBN nanosheets are mainly utilized for bioimaging and drug delivery systems in biomedical applications (Weng et al., 2014). These usages are owing to stable water dispersions and low cytotoxicity. 2D-hBN nanosheets, known as white graphene, have crucial chemical and physical properties such as high temperature stability, large surface area, high mechanical strength and termal conductivity (Khan et al., 2016; Kurapati et al., 2016).

We firstly prepared 2D-hBN nanosheets in this report. After that, CIT imprinted polymer was developed on 2D-hBN nanosheets by molecular imprinting technology. This technology is a polymerization method around target molecule. This method provides the specific cavities to analyte molecule on polymer surface (Yola and Atar, 2018). Hence, the selective sensor is easily created for biomedical and other applications. An electrochemical sensor based on 2D-hBN nanosheets whose surface is coated with molecular imprinting polymer (MIP) was developed and then applied to the selective and sensitive detection of CIT in this study.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

The chemicals in present report were following: CIT was bought from Sigma-Aldrich, USA. Phenol (Merck, Germany), boron nitride powders (Merck, Germany), isopropyl alcohol (IPA, Sigma-Aldrich), potassium ferricyanide ( $K_3Fe(CN)_6$ , Sigma-Aldrich, USA). In addition, the stock aqueous solutions (1.0 mM) were prepared in phosphate buffer solution (PBS) (0.1 M, pH 10.0).

#### Instrumentation

All electrochemical experiments were performed using out IviumStat (U.S) equipped with C3 cell stand. Argon gas was passed through the solutions during experiments for about 10 min. JEOL 2100 transmission electron microscope (TEM) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### Preparation of 2D-hBN nanosheets

To prepare 2D-hBN nanosheets, the powder of bulk boron nitride (100.0 mg) was dispersed in IPA (50.0 mL). The dispersion was heated at 50°C for 24 h under stirring. After that, the dispersion was subjected to ultrasonication for 20 h. Then, the obtained supernatant was centrifugated at 15000 rpm for 10 min. Finally, the precipitate was washed with acetone several times and dried at 60°C overnight to obtain 2D-hBN nanosheets

### Procedure for the electrode preparation

GCE was cleaned according to our previous reports (Yola et al., 2015b). 15  $\mu$ L of 2D-hBN nanosheets suspension was dropped onto the clean GCE surfaces. Then, the solvent was evaporated by an infrared lamp.

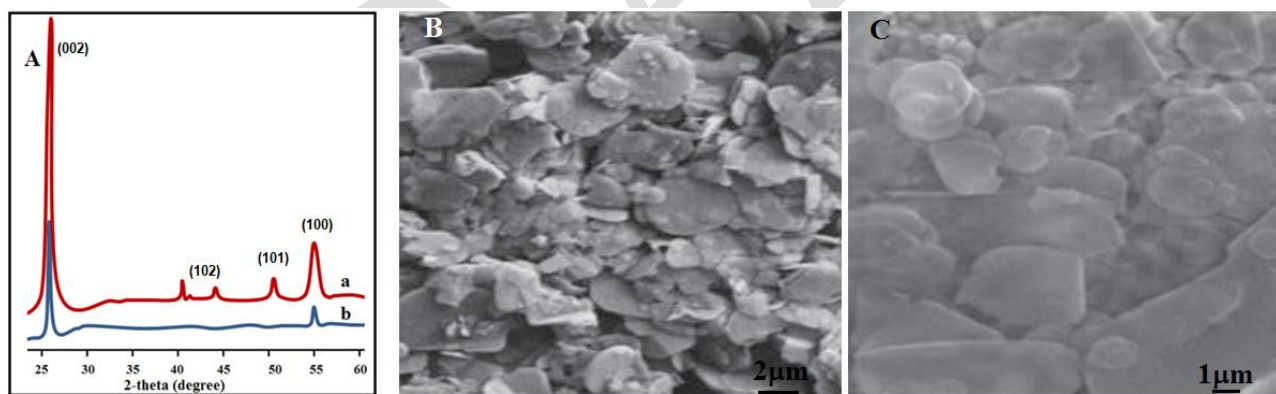
### Preparation of CIT imprinted voltammetric sensor and CIT removal from electrode surface

After the preparation of 2D-hBN/GCE as working electrode, 80.0 mM phenol containing 20.0 mM CIT in 0.1 M PBS (pH 10.0) was prepared in voltammetric cell. Ag/AgCl/KCl(sat) as the reference electrode and Pt wire as counter electrode were utilized. The potential (from 0.0 V to +1.0 V) was applied to working electrode by CV for 15 cycles. The imprinted electrode based on 2D-hBN/GCE without CIT (NIP/2D-hBN/GCE) was also developed to investigate the selectivity of imprinting. 1.0 M NaCl solution was used for CIT removal on electrode surface. The removal procedure was performed according to the literature (Yola et al., 2015a).

## RESULTS AND DISCUSSION

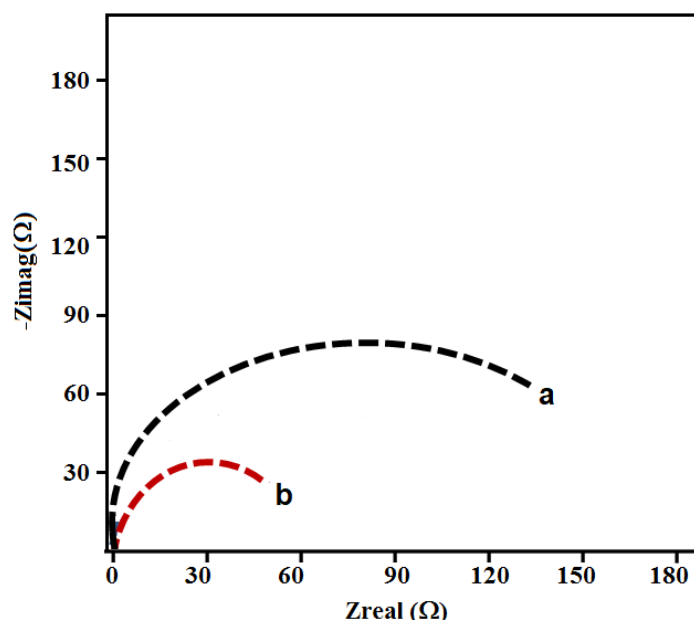
### Characterization of nanomaterials

Fig. 1A demonstrates XRD pattern of bulk boron nitride (curve a) and 2D-hBN nanosheets (curve b). XRD pattern of bulk boron nitride shows the characteristic diffraction peaks corresponding to (100), (101), (102) planes (Li et al., 2012). The characteristic diffraction peaks of bulk boron nitride disappeared on XRD pattern of 2D-hBN nanosheets. However, (002) plane of boron nitride remains intact. SEM image (Fig. 1B) of boron nitride confirms its bulk structure. In the bulk structure, irregular morphology, agglomeration and varying dimensions of boron nitride are seen. The 2D-hBN nanosheets are obtained after ultrasonication of bulk boron nitride. Fig. 1C suggested the formation of 2D-hBN nanosheets. The particle thickness decreases with the lateral sizes of 2D-hBN nanosheets in comparison with bulk boron nitride.



**Figure 1.** XRD pattern (A) of bulk boron nitride (curve a) and 2D-hBN nanosheets (curve b); SEM images of (B) bulk boron nitride; (C) 2D-hBN nanosheets

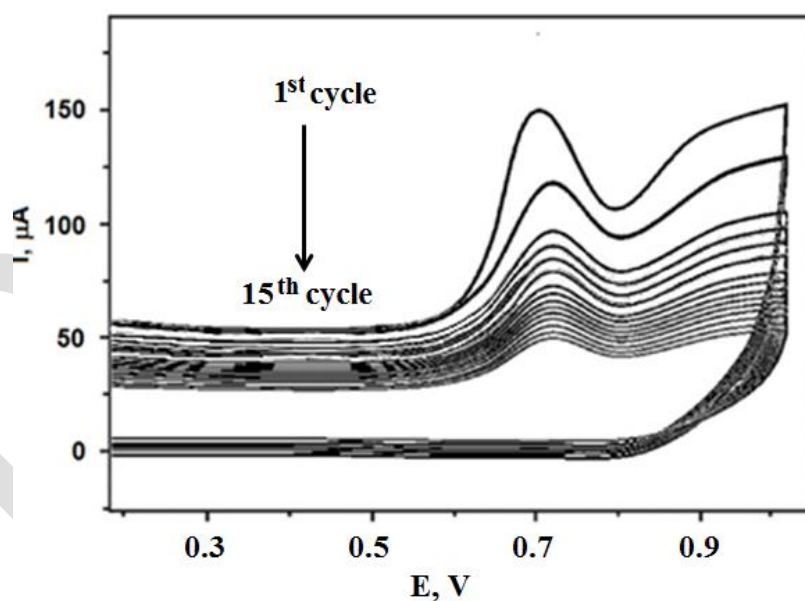
Fig. 2 shows the impedance plot of modified electrodes in this article. The obtained charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) values of the prepared electrodes are 160 ohm (curve a) and 60 ohm (curve b), respectively. Due to large surface area, high mechanical strength and thermal conductivity of 2D-hBN nanosheets, the catalytic increase was observed.



**Figure 2.** Fitting of impedance spectrum for 1.0 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (1:1) in 0.1 M KCl at (a) bare GCE and (b) 2D-hBN/GCE

#### **Formation of CIT imprinted electrode on 2D-hBN**

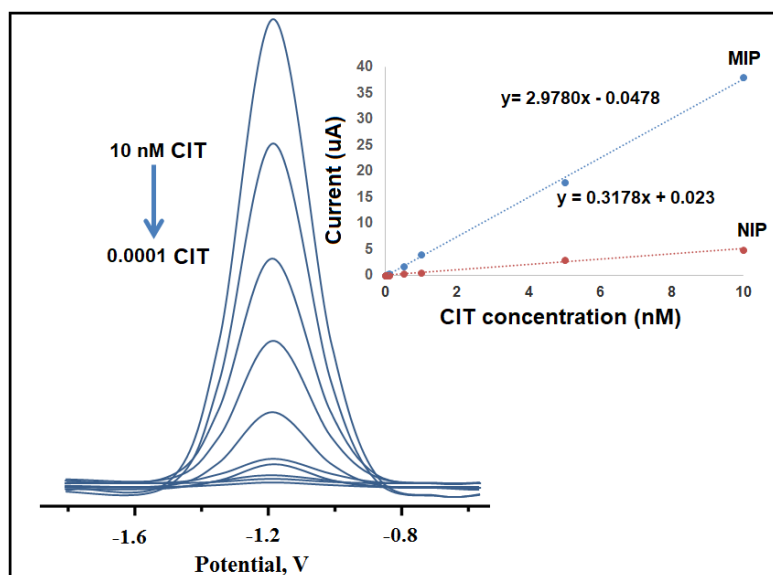
During the first scan, the oxidation potential of 80.0 mM phenol containing 20.0 mM CIT was 0.70 V (Fig. 3). The current signal with irreversible peak at 0.70 V slowly diminished with subsequent scans. They vanished at 15<sup>th</sup> cycle on 2D-hBN/GCE. Thus, we think that CIT imprinted electrode is successfully formed on 2D-hBN/GCE.



**Figure 3.** The polymerization of 80 mM phenol containing 20.0 mM CIT on 2D-hBN/GCE (Scan rate: 100  $\text{mV s}^{-1}$ )

#### **Linearity range of proposed sensor**

Fig. 4 indicated the relation between current signals and CIT concentrations at MIP/2D-hBN/GCE (from  $1.0 \times 10^{-13}$  M to  $1.0 \times 10^{-8}$  M). The regression equations are  $y$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $2.9780x$  (nM) - 0.0478 for MIP and  $y$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $0.3178x$  (nM) + 0.023 for NIP. According to the results of MIP and NIP, the reliability of the measurements and quality of imprinting were confirmed. Thus, MIP electrode in this article shows more response to CIT analyte. (inset of Fig. 4). The quantification limit (LOQ) and LOD for CIT were obtained as  $1.0 \times 10^{-13}$  M and  $3.0 \times 10^{-14}$  M, respectively.



**Figure 4.** DPVs with different CIT concentrations at MIP/2D-hBN/GCE in pH 10.0 of PBS (from blank solution without CIT to  $1.0 \times 10^{-8}$  M CYP): Inset: Calibration curve of CIT for MIP and NIP electrodes

### Recovery

According to recovery experiments (Table 1), owing to close values to 100.00%, the ingredients in food samples had no interference effect in analysis procedure. Consequently, the matrix presence in food sample can not importantly affect the selective analysis of CIT.

**Table 1.** The recovery values of CIT (n=7)

Sample	Added CIT (nM)	Found CIT (nM)	Recovery (%)
Food samples	-	$2.11 \pm 0.02$	-
	0.01	$2.10 \pm 0.03$	$99.06 \pm 1.9$
	0.50	$2.63 \pm 0.01$	$100.77 \pm 1.0$
	5.00	$7.12 \pm 0.04$	$100.14 \pm 0.7$

### CONCLUSIONS

In this report, novel molecular imprinted sensor based on two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanosheets was developed and applied for CIT detection in food samples. The prepared nanomaterial and surfaces were well characterized by using SEM, XRD and EIS. According to the characterization studies, the particle thickness decreases with the lateral sizes of 2D-hBN nanosheets in comparison with bulk boron nitride.  $1.0 \times 10^{-13}$  -  $1.0 \times 10^{-8}$  M and  $3.0 \times 10^{-14}$  M were founded as the linearity range and the detection limit.

### REFERENCES

- Ahmed NE, Farag MM, Soliman KM, Abdel-Samed, AKM, Naguib KM 2007. Evaluation of Methods Used To Determine Ochratoxin A in Coffee Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9576-9580.
- Atar N, Eren T, Yola ML 2015. A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice. *Food Chemistry* 184: 7-11.
- Khan AF, Brownson DAC, Randviir EP, Smith GC, Banks CE 2016. 2D Hexagonal Boron Nitride (2D-hBN) Explored for the Electrochemical Sensing of Dopamine. *Analytical Chemistry* 88: 9729-9737.
- Kurapati R, Backes C, Ménard-Moyon C, Coleman JN, Bianco A 2016. White Graphene undergoes Peroxidase Degradation. *Angewandte Chemie International Edition* 55: 5506-5511.
- Li LH, Chen Y, Cheng BM, Lin MY, Chou SL, Peng YC 2012. Photoluminescence of boron nitride nanosheets exfoliated by ball milling. *Applied Physics Letters* 100: 261108-261112.
- Markov K, Pleadin J, Bevardi M, Vahčić N, Sokolić-Mihalak D, Frece J 2013. Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control* 34: 312-317.
- Weng Q, Wang B, Wang X, Hanagata N, Li X, Liu D, Wang X, Jiang X, Bando Y, Golberg D 2014. Highly Water-Soluble, Porous, and Biocompatible Boron Nitrides for Anticancer Drug Delivery. *ACS Nano* 8: 6123-6130.



- Yola ML, Atar N 2018. A novel detection approach for serotonin by graphene quantum dots/two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanosheets with molecularly imprinted polymer. *Applied Surface Science* 458: 648-655.
- Yola ML, Atar N, Eren T, Karimi-Maleh H, Wang S, 2015a. Sensitive and selective determination of aqueous triclosan based on gold nanoparticles on polyoxometalate/reduced graphene oxide nanohybrid. *RSC Advances* 5: 65953-65962.
- Yola ML, Eren T, Atar N 2015b. A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide: Application to selective determination of tyrosine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical* 210: 149-157.

DRAFT

## Determination of cypermethrin by square wave voltammetry through modified polymer inclusion membrane with reduced graphene oxide

Muhsin Doğan<sup>1\*</sup>, Mehmet Lütfi Yola<sup>2</sup>, Necip Atar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Afyon Kocatepe University, Faculty of Engineering, Department of Biomedical Engineering, Afyonkarahisar, Turkey

<sup>2</sup> Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

<sup>3</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey  
Corresponding author: e-mail: doganmuhsin.01@gmail.com

### Abstract

In this study, polymeric membrane was modified with reduced graphene oxide and used for the effective determination of cypermethrin (CYP) using prepared molecular imprinted electrochemical sensor. The use of reduced graphene oxide in the membrane filtration process as an additive material presents great opportunities and possibilities for membrane technology. The purpose of this study was to improve the structural and mechanical features of polymeric membrane by adding reduced graphene oxide, which already possesses high mechanical and chemical properties for the separation process.

**Keywords:** Cypermethrin, electrochemical sensor, polymer inclusion membrane, reduced graphene oxide, square wave voltammetry (SWV)

### INTRODUCTION

Pyrethroids are a class of significant pesticides and have high efficiency and low toxicity in agriculture and environment (Kuivila et al., 2012; Shen et al., 2012). They are founded in two types: (i) without  $\alpha$ -cyano group and (ii) with  $\alpha$ -cyano group. They contain also two or three asymmetric carbon atoms. CYP is a crucial pyrethroid and it is generally used as poison against many pests for a long time. Its high stability makes it efficient contaminant in the environment (Chen et al., 2016). Consequently, the exposure of CYP results in serious health problems such as cancer and sanity (Kırış and Velioglu, 2016).

Due to environmental pollution, global climate change and population growth, the protection of clean and natural water resources has emerged as a major problem in our country and our world. The choice of additive materials at then nanoscale, or modification of the membranes with nanomaterials, adds new dimension to membrane technology. Membrane technology provides high selectivity and efficiency in many purification and separation processes (Baker and Lokhandwala, 2008). It especially provides flexible modular design and presents many advantaged uses of less chemical in water purification systems. It uses quite different membranes for purification of industrial water, recycling and reuse of waste water (Almeida et al., 2012). Membrane technology is a very economical and suitable technology for water purification, but there are some parameters which affect the performance efficiency and activity of membrane technology.

In this study, polymeric membrane (PIM) was modified with reduced graphene oxide (rGO) and used for the determination of CYP from real samples using molecular imprinted modified electrodes. Because of high stability and high surface area of rGO, the high mechanical and chemical properties for the separation process were provided by using rGO. Additionally, the high stability, repeatability and reusability were obtained on membrane formation. According to results, CYP was transported by 80.19% from donor to acceptor phase at the end of 10 days. This important transportation resulted from polymeric membrane modified with reduced graphene oxide.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

rGO (Sigma-Aldrich), Aliquat 336 (Acros), CH<sub>3</sub>COOH (Merck), 2-nitrophenyl octyl ether (Merck), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO (Merck), Cellulose tri acetate (CTA) (Mn= 72.000-74.000) (Fluka) were used in transport studies without any purification. All experiments were achieved at constant temperature (25 °C) with Polyscience Temperature Controller (Model:912, USA). Square wave voltammetry (SWV) was carried out on an electrochemical station (IviumStat, U.S) equipped with a C3 cell stand. The stock solution of CYP (1.0 mM) was prepared by dissolving it in 20 mL of ultra-pure quality water and then diluting it with ultra pure quality water to 50 mL.

### **Instrumentation**

All electrochemical experiments were performed using out IviumStat (U.S) equipped with C3 cell stand. Argon gas was passed through the solutions during experiments for about 10 min. JEOL 2100 transmission electron microscope (TEM) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### **Modifying Polymeric Membrane with Reduced Graphene Oxide**

Cellulose tri acetate (CTA) weighing 0.200 g was used as a support for the preparation of membrane that was used in reduced graphene oxide polymer inclusion membrane (rGO/PIM). CTA was dissolved in 15 mL dichloromethane and added rGO the amount of %1 weight. The solution was stirred for three hours. After that, the solution was homogenized in an ultrasonic bath for 1 hour at 25 °C so rGO could penetrate into the polymer framework. On the other side, 0.35 mL 2-nitrophenyl octyl ether (2-NPOE).

### **Transport Studies**

Previous studies have used diffusion cells that included two equal compartments for the transport of CYP in rGO/PIM experiments (Kaya et al., 2016). The modified polymeric membrane was placed between the divisions in the diffusion cell. In the donor phase, which is at the left side of the diffusion cell, there was 25 ppm CYP aqueous solution in 0.1 M HCl. On the right side of diffusion cell, called the acceptor phase, there was an acetic acid/ammonium acetate buffer solution at pH 5. A magnetic stirrer was used in both phases and kept a constant rate (500 rpm) throughout the rGO/PIM transport studies. All of the experiments were achieved at constant temperature (25°C) via a temperature controller. Samples were taken (1 mL) at certain time intervals during both phases and kept in glass tubes for the determination of CYP by SWV.

### **Preparation of Imprinted CYP Surfaces**

TOB-imprinted surfaces were prepared according to our previous protocol (Yola et al., 2015).

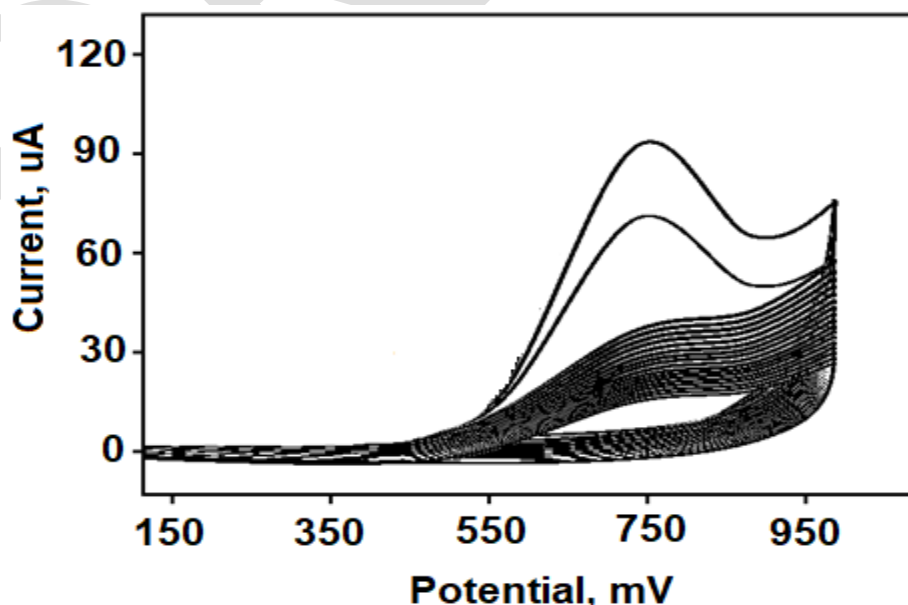
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Formation of CYP Imprinted Electrochemical Surfaces**

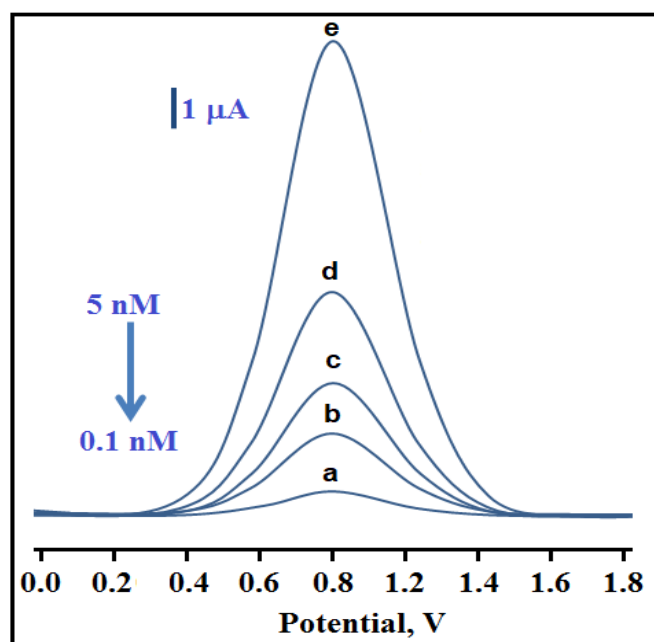
Electro polymerization was presented in Fig 1. The specific peak corresponded to 0.78 V. During scanning, the signal of the specific peak diminished. After that, the peak disappeared. This situation demonstrated the formation of polymer on the electrode surface.

### **Linearity Range**

Electrochemical response was linear to concentration from 0.1 – 5.0 nM (Fig. 2). The regression equation of CYP was  $y = 3.9501x + 0.2058$ . Each point of the calibration graph corresponded to the mean value obtained from six independent measurements.



**Figure 1.** Electro polymerization of 100 mM pyrrole containing 25 mM CYP



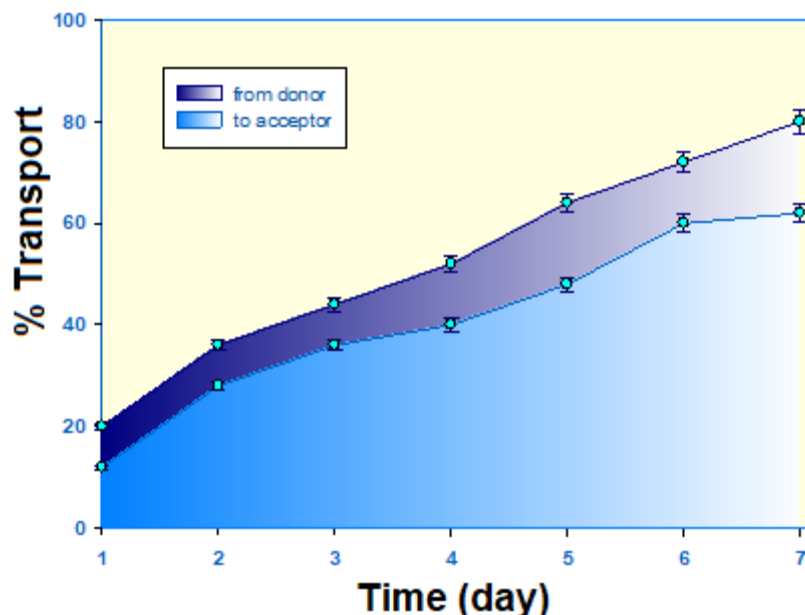
**Figure 2.** Effect of concentration on electrochemical signal of CYP-imprinted surface (a) 0.1 nM CYP; (b) 0.5 nM CYP; (c) 1.0 nM CYP; (d) 2.0 nM CYP; (e) 5.0 nM CYP

#### **Transport and Determination of CYP from Synthetic Solution through the rGO/PIM**

In the present study, 25 ppm CYP aqueous solution was used and prepared as a synthetic in 0.1 M HCl as a donor phase to research the transport of CYP through the rGO/PIM. pH 5 acetic acid/ammonium acetate solution was used as an acceptor phase, and the transport studies were carried out for seven days at a constant stirring rate (500 rpm). At the end of seven days, the amounts of CYP were presented as in Table 1 for each phase. Table 1 clearly shows that the transport of CYP increased with increased time. Eighty percent of the CYP was removed from the donor and 68.00% CYP was transported to the acceptor phase at the end of seven days. In Fig. 3, CYP % transport is shown at both the donor and acceptor phases, day by day. CYP was determined by square wave voltammetry using prepared electrochemical sensor.

**Table 1:** Transport quantities of CYP from synthetic solution in the donor phase to acceptor phase by determination of SWV (n =6)

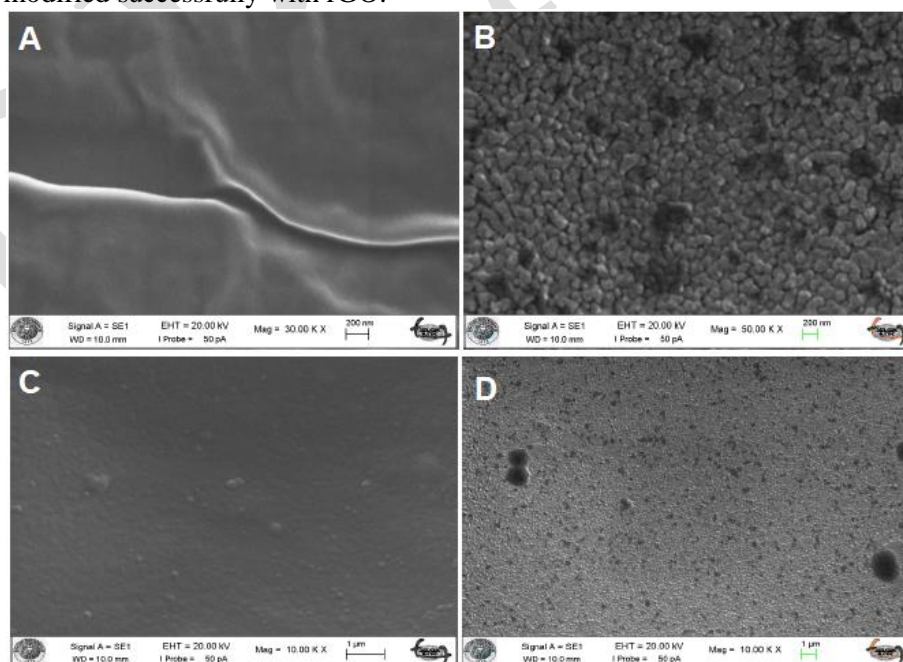
Transport time (day)	CYP quantity (ppm) in the donor	CYP quantity (ppm) in the acceptor	Removed CYP % quantity from donor	Transported CYP % quantity to acceptor
Initial	25.0± 0.20	-	-	-
1	20.0± 0.20	3.0± 0.05	20.0	12.0
2	16.0± 0.20	7.0± 0.08	36.0	28.0
3	14.0± 0.15	9.0± 0.08	44.0	36.0
4	12.0± 0.15	10.0± 0.09	52.0	40.0
5	9.0± 0.10	12.0± 0.10	64.0	48.0
6	7.0± 0.10	15.0± 0.15	72.0	60.0
7	5.0± 0.07	17.0± 0.18	80.0	68.0



**Figure 3.** CYP % transport from the donor phase to the acceptor phase

### Characterization

Scanned electron microscopy (SEM) is a surface characterization method that is commonly used in membrane morphology. SEM photos present significant evidence as to how the membrane components are distributed in the membrane and help to understand the membrane structure. To this end, SEM photos were taken of blank PIM and rGO/PIM. Fig 4. present the SEM photo of the blank membrane and modified rGO/PIM in 200 nm and 1  $\mu$ m size, respectively. The blank PIM surface (Fig 4A and C) was smooth when compared to the modified rGO/PIM. After modifying the membrane with rGO, it was immediately obvious that the rGO/PIM membrane had a much rougher texture than the blank membrane. The dark regions belonging to rGO on the membrane surface were also distinctly visible in the SEM photos (Fig 4B and D). The number of visible macrospores in the membrane structure was also much greater than the number of blank membranes. Furthermore, this photo demonstrated that rGO was well connected to the membrane structure and that the membrane was modified successfully with rGO.



**Figure 4.** SEM photo of blank membrane (PIM) (A) 200 nm; rGO/PIM membrane (B) 200 nm; SEM photo of blank membrane (PIM) (C) 200 nm; rGO/PIM membrane (D) 200 nm

## CONCLUSIONS

With this work, we tried to develop a sensitive molecular imprinted electro chemical sensor for the determination of CYP. We synthesized modified rGO/PIM units for the physical potential of PIM with rGO. The method developed is economic, easy to use, and selective, and it can be applied to real samples. All of those advantages demonstrate the suitability of rGO/PIM for separating CYP. Not only did CYP transport from the milk sample, but the modification of the PIM by rGO and development of molecular imprinted electro chemical sensors were successful as well. It is thought that the method developed may be suggested as an alternative for the separation of CYP, as it is accurate, precise, sensitive, selective and demonstrates reproducible methods for quality control in analysis laboratories.

## REFERENCES

- Almeida MIGS, Cattrall RW, Kolev SD 2012. Recent trends in extraction and transport of metal ions using polymer inclusion membranes (PIMs). *Journal of Membrane Science* 416: 9-23.
- Baker RW, Lokhandwala K 2008. Natural Gas Processing with Membranes: An Overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47: 2109-2121.
- Chen L, Xu P, Diao J, Di S, Li R, Zhou Z 2016. Distribution, Metabolism and Toxic Effects of Beta-Cypermethrin in Lizards (*Eremias argus*) Following Oral Administration. *Journal of Hazardous Materials* 306: 87-94.
- Kaya A, Onac C, Alpoguz HK, Yilmaz A, Atar N 2016. Removal of Cr(VI) through calixarene based polymer inclusion membrane from chrome plating bath water. *Chemical Engineering Journal* 283: 141-149.
- Kırış S, Velioglu YS 2016. Reduction in pesticide residue levels in olives by ozonated and tap water treatments and their transfer into olive oil. *Food Additives & Contaminants: Part A* 33: 128-136.
- Kuivila KM, Hladik ML, Ingersoll CG, Kemble NE, Moran PW, Calhoun DL, Nowell LH, Gilliom RJ 2012. Occurrence and Potential Sources of Pyrethroid Insecticides in Stream Sediments from Seven U.S. Metropolitan Areas. *Environmental Science & Technology* 46: 4297-4303.
- Shen MF, Kumar A, Ding SY, Grocke S 2012. Comparative study on the toxicity of pyrethroids,  $\alpha$ -cypermethrin and deltamethrin to *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 9-13.
- Yola ML, Atar N, Eren T, Karimi-Maleh H, Wang S 2015. Sensitive and selective determination of aqueous triclosan based on gold nanoparticles on polyoxometalate/reduced graphene oxide nanohybrid. *RSC Advances* 5: 65953-65962.

## Antioxidant properties of isabella grape (*Vitis labrusca* L.) phenolic composition

Zehra Can<sup>1\*</sup>, Yakup Kara<sup>2</sup>, Sevgi Kolaylı<sup>2</sup>, Merve Kavgacı<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Bayburt University, Faculty of Applied Sciences, Department of Emergency and Disaster Management, 6900, Bayburt, Turkey

<sup>2</sup>Karadeniz Technical University, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, 61080, Trabzon, Turkey

\* Corresponding author e-mail: zcan@bayburt.edu.tr

### Abstract

Grapes known as rich in anthocyanins and resveratrol has been cultivated in different types in our country. Phenolic components and antioxidant rates of seeds and flesh of Isabella grapes that are endemic to East Black Sea Region and certain types of grapes grown in our country were compared in the research. Total Phenolic Material, Total Flavonoids Material Amount (TFM), Iron (III) Reduced / Antioxidant Capacity Indication (FRAP) and Phenolic components were analyzed in this study. 19 phenolic standards were used in the phenolic composition analysis carried out with reversed phase HPLC-UV. Study datas and analysis of some grapes types consumed in our country were compared. As a result of the study, it was detected that seed of all grapes were richer than their flesh in both phenolic composition and antioxidant capacity. It is also detected that the richest grapes types in phenolic composition were Alphonso, Isabella and Kardinal. Razaki and Red Globe were found to be the richest grapes types with regards to resveratrol. Particularly rind of Isabella scented grapes were detected to be richer in resveratrol.

**Keywords:** Isabella, Phenolic content, Flavonoid content, FRAP, HPLC, Reduction power.

### Introduction

Grape is an important fruit species in the world, Turkey has a geographic location, as one of the leading countries in the world production of grapes and also grapes. In our country, approximately 1200 genotypes of tables, dried, wine and grape varieties are grown. Grape is a kind of fruit rich in flavanoids, it is a natural product rich in antioxidants which contains gallic acid as major phenolic acid and various flavan-3-oles and flavanoids. Grape contains (+) catechin, (-) catechin, (-)- epicatechin and their gallates and proyanidine derivatives of monomeric flavan-3-oles (Bakkalbasi et al., 2005). Phenolic compounds can directly contribute to antioxidant activity (Duh et al., 1999). Grapes are important sources of antioxidant compounds that can act in prevention and control of some chronic diseases. The consumption of grape juice and grape products have been shown to increase serum antioxidant power (Day, 1997; Yuan, 2011) and reduce bladder dysfunction in animal model. In recent years, the antioxidant effects of phenolic compounds in foods have become increasingly important (Karakaya and El, 1999).

Wild specie, which is widely cultivated in the Eastern Black Sea Region, is known as Isabella grape (*Vitis labrusca* L.) and has a pleasant odor, small grain. The aim of the study was to determine the antioxidant activity and phenolic composition of Alphonso Lavallo, Cardinal, Razaki, Isabella and Red Globe spices compare them with the literature. Especially resveratrol content of grapes was also determined.

### Material and Method

Chemicals All the reagents used were of analytical grade. All phenolic acid standards were obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) and Merck (Darmstadt, Germany). Trolox was supplied by AppliChem (Darmstadt, Germany). Folin–Ciocalteu’s phenol reagent and TPTZ were purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Jack bean urease, urea, acetohydroxamic acid, sodium nitroprusside, iron(III) chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), iron(II) sulfate heptahydrate (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), and DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium acetate, ferric chloride, and glacial acetic acid were obtained from Merck. LC syringe filters (RC-membrane, 0.45 µm) were obtained from Sartorius Minisart RC 15, Sartorius (Darmstadt, Germany).

### **Samples extraction for antioxidant activity and phenolic analysis**

Alphonso Lavalle, Kardinal, Razaki, Isabella, Red Globe species were used in the study. The samples were first dried at 40 ° C for one week. With the help of blender, grapes were pulverized. 10 g each samples was added to an equal volume (100 mL) of 100 % methanol and the mixture was continuously stirred with a shaker (Heidolph Promax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for 24 h. Particles were removed with filter paper. The final volume of the solution was adjusted with 100% methanol. The methanolic extract was divided into two parts, the first being used for antioxidant tests, and phenolic compounds.

The methanolic extract was evaporated until dryness with a rotary evaporator at 40° C. The residue was dissolved in 10 mL acidified distilled water (pH 2). Liquid–liquid extraction was carried out with 5×3 mL diethyl ether and 5× 3 mL ethyl acetate, consecutively (Kim et al., 2006). Both diethyl ether and ethyl acetate phases were pooled and dried by rotary evaporation (IKA-Werke, Staufen, Germany) at 40°C. The pellet was resuspended in 2 mL methanol, filtered with syringe filters (RC-membrane, 0.45 µm), and injected to HPLC.

### **Total phenolic content (TPC)**

The total phenolic content of samples were determined by Folin-Ciocalteu reagent and some modifications were made according to the Slinkard and Singleton methods (Slinkard and Singleton, 1977). Firstly, 20 µL of each sample solution was diluted to 680 µL distilled water and 400 µL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent was added. After 400 µl of 10% of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and then vortexed then incubated for 2 hours at room temperature, absorbance measured at 760 nm using gallic acid as a standard. The results were given as mg gallic acid equivalents per g sample (GAE mg/100g).

### **Total flavonoid content (TPC)**

Total flavonoid content was determined by a colorimetric method as described previously (Fukumoto and Mazza, 2000). Firstly, 0.5 mL each sample solution, 0.1 mL of 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and 0.1 mL of 1 M NH<sub>4</sub>.CH<sub>3</sub>COO were added to a test tube then was mixed well incubated at room temperature for 40 minutes. After the absorbance was measured against the blank 415 nm. The results were expressed as mg quercetin equivalents (QE) per g sample (mg QE/ 100g).

### **Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay**

The total antioxidant potential of a each sample solution was determined using the ferric reducing ability of FRAP assay by Benzie and Strain (1996) as a measure of antioxidant power. Briefly, the FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (300 µM, pH3.6) a solution of 10 µM TPTZ in 40 µM HCl and 20 µM FeCl<sub>3</sub>. The each sample 100 µL and reagent 3 mL were added to each well mixed. The absorbance was taken at 593 nm after 4 min. Standard curve was prepared using different concentrations of FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and the results was expressed as µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g).

### **Analysis of phenolic compounds by HPLC-UV**

The samples and standards qualitative analysis and quantitative determination of particular components of the fractions were analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Elite LaChrom Hitachi, Japan) with a UV detector. Separation was done on a column with a reverse phase C18 column (150 mm x4.6 mm, 5µm; Fortis), in gradient solvent systems A (2% AcOH in water) and solvent B (70:30, acetonitrile/water) which was sonicated before stirring and continuously degassed by the built-in HPLC system. The flow rate was kept constant at 1 mL min<sup>-1</sup> using gradient programming; starting the flow of mobile phase as B (5%) to three minutes, gradually increasing (up-to 15, 20, 25, 40 and 80% at 8, 10, 18, 25 and 35 minutes respectively) and decreasing to 5 % at 40 minutes and left for 10 minutes to equilibrate in the column. Phenolic profile was determined according to Can and Baltas, (2016).

### **Results and Discussion**

Grape (*Vitis spp.*) Is a type of fruit that is widely cultivated worldwide and is a kind of fruit that increasing produces. Due to the grapes, polyphenols vitamin C and sugars it contains, it is an agricultural product with high nutritional value. Flavonoids are a subclass of polyphenols found in a wide variety of natural products such as grapes, tea and cocoa (Quideau et al., 2011). These compounds, which are held particularly responsible for the color and taste of the wine, play an important role in the defense system (Corder et al., 2006). Polyphenolic substances found in grape seeds are usually monomeric flavan-3-ol and proanthocyanidins (Carlson et al., 2008).



Total phenolic content of grapes is given in Table 1. According to the results, the highest total phenolic content was found in Cardinal grape and lowest Alphonso Lavallo grape. In particular, cardinal grape was found to be quite high total phenolic content. And also was found to be high total flavonoid content. While total phenolic content of Alphonso Lavallo was lower than other grapes, total flavonoid content was found higher than isabella and red globe grapes.

Table 1. Total phenolic, total flavonoid content and FRAP values of samples

Samples	Total Phenolic Content (mg GAE/100 g)	Total Flavonoid Content (mgQE/100 g)	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ )
Alphonso Lavallo	28.0 $\pm$ 1.10	47.90 $\pm$ 5.70	124.06 $\pm$ 0.01
Cardinal	5471 $\pm$ 3.79	89.00 $\pm$ 7.80	260.814 $\pm$ 11.90
Razaki	3580 $\pm$ 2.32	54.70 $\pm$ 3.40	174.90 $\pm$ 0.19
Isabella	2014 $\pm$ 7.30	30.80 $\pm$ 2.00	82.00 $\pm$ 1.29
Red Globe	592 $\pm$ 2.40	41.70 $\pm$ 1.40	236.00 $\pm$ 8.93

Phenolic compounds are secondary metabolites, primarily located in the epidermal layer of grape berry skin and seeds and are known as important bioactive compounds, as well as major contributors of the biological activities in products derived from grapes. These biological activities are linked to the antioxidant compounds found in grape juice, such as flavonoids (anthocyanins, proanthocyanidins), phenolic acids and resveratrol among others. Therefore, grape can be consumed not only due to its appreciated sensory characteristics but also because it is an exert antioxidant activity effects when consumed (Cosme et al., 2018).

Table 2 shows the phenolic compounds read in HPLC-UV of the grape samples studied. Gallic acid, epicatechin, and resveratrol were detected in all grapes. Resveratrol is a common polyphenolic compound that is found in a few edible materials, such as grape skins, peanuts, and red wine. In many research it is known that resveratrol can prevent lipid peroxidation and prevent cell death (Frankel et al., 1993). Gallic acid was detected in all grapes species. Gallic acid is known to be a powerful antioxidant that destroys free radicals that damage cells. CAPE was detected in razaki, isabella and red globe grapes. CAPE has been shown to destroy tissue damaging radicals in several studies. Therefore, increasing the consumption of Izabella grapes with CAPE is thought to be beneficial for human health.

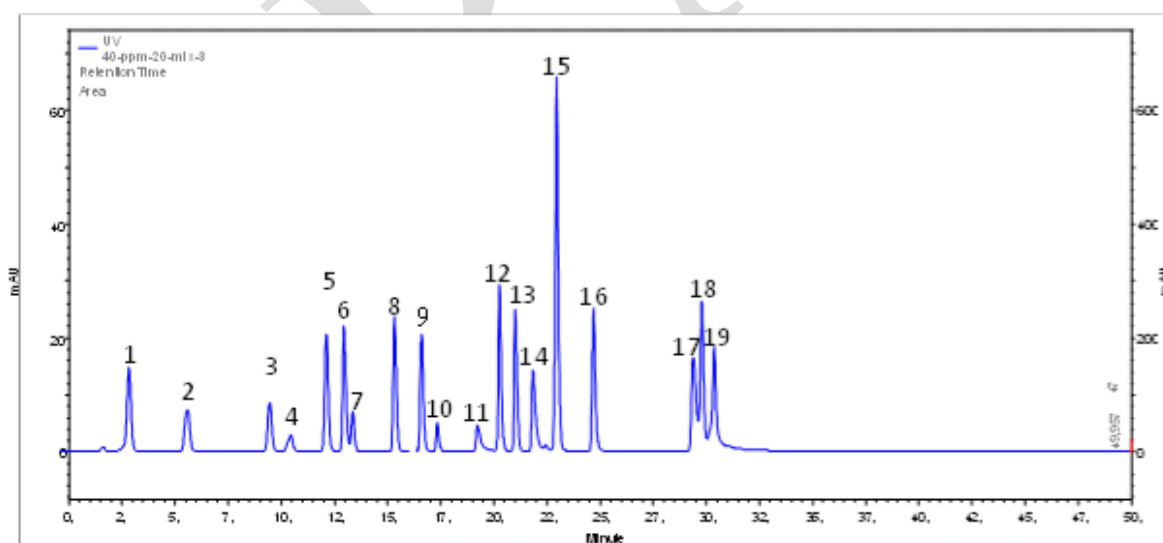


Figure 1. Phenolic compounds of calibration (1. Gallic acid, 2. Protocatechuic acid, 3. *p*-OH Benzoic acid, 4. Catechin, 5. Caffeic acid, 6. Syringic acid, 7. Epicatechin, 8. *p*- Coumaric acid, 9. Ferulic acid, 10. Rutin, 11. Myrecetin, 12. Resveratrol, 13. Daidzein, 14. Luteolin, 15. *t*-Cinnamic acid, 16. Hesperetin, 17. Chrysin, 18. Pinocembrin, 19. CAPE).

Table 2. Phenolic Compounds of Grapes Samples

Standards	Alphonso Lavalle	Cardinal	Razaki	Isabella	Red Globe
Gallic Acid	37.621	11.247	5.197	161.130	0.403
Protocateuic acid	n.d.	2.946	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -OH Benzoic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Catechin	356.192	66.621	8.622	n.d.	n.d.
Caffeic acid	14.738	n.d.	n.d.	37.794	n.d.
Syringic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Epicatechin	495.596	21.953	9.671	707.958	1.515
<i>p</i> -Coumaric acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ferulic acid	22.025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutin	4911.946	n.d.	n.d.	2121.641	n.d.
Myrecetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Resveratrol	35.66	0.178	0.45	18.77	0.18
Daidzein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Luteolin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>t</i> -Cinnamic acid	n.d.	n.d.	0.288	n.d.	0.195
Hesperetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chrysin	n.d.	n.d.	8.715	139.583	7.189
Pinocembrin	n.d.	n.d.	0.640	12.824	0.603
CAPE	n.d.	n.d.	1.342	13.822	0.749

\* Results mg phenolic /100 g sample, \*n.d.: not detected.

## Results

Grape is a fruit species rich in phenolic components and the type and amount of secondary metabolite phenolic agents contained in the grape varies according to the grape variety and soil and climatic conditions. In our study was found that when the total phenolic content was examined, the grapes seeds' phenolic components and their have high antioxidant activities. Consuming Alphonso Lavalle and Isabella grapes, which are rich in resveratrol, can also be thought to reduce the risk of developing heart disease and cancer. Because it has been speculated that dietary resveratrol may act as an antioxidant, promote nitric oxide production, inhibit platelet aggregation, and increase high-density lipoprotein cholesterol, and thereby serve as a cardioprotective agent.

## Acknowledgements

We are grateful to the Karadeniz Technical University Scientific Research Projects Unit (BAP-04) for its support for the study through its contributions to project No. 7369.

## References

- Bakkalbasi, E., Yemis, O., Aslanova, D. 2005. Major Flavan-3-ol Composition and Antioxidant Activity of Seeds from Different Grape Varieties Grown in Turkey, *European Food Research and Technology*. 221, 6, 792–797.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-6.
- Can, Z., and Baltas, N. 2016. Bioactivity and Enzyme Inhibition Properties of *Stevia rebaudiana*. *Current Enzyme Inhibition*. 12(2):188-194.
- Carlson, S., Peng, N., Prasain, J.K., Wyss, J.M. 2008. Effects of Botanical Dietary Supplements on Cardiovascular, Cognitive, and Metabolic Function in Males and Females, *Gender Medicine*. 5, S76-S90.

- Corder, R., Mullen, W., Khan, N.Q., Marks, S. C., Wood, E. G., Carrier, M. J., Crozier, A. 2006. Oenology: Red Wine Procyanidins and Vascular Health, *Nature*. 444, 7119, 566.
- Cosme, F., Pinto, T., Vilela, A. 2018. Phenolic Compounds and antioxidant Activity in Grape Juices: A Chemical and Sensory View. *Beverages*. 4,22.
- Day, A.P. 1997. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 41(6) 353-357.
- Duh, P.D., Tu, Y.Y., Yen, G.C. 1999. Antioxidant Activity of Water Extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum Morifolium Ramat*), *LWT-Food Science and Technology*. 32, 5, 269-277.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*. 341 (8852): 1103-1104.
- Fukumoto, L.R., and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3597-3604.
- Karakaya, S., El, S.N. 1999. Quercetin, Luteolin, Apigenin and Kaempferol Contents of Some Foods, *Food Chemistry*. 66, 3, 289-292.
- Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*. 95(3) 466-473.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouysegu, L. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angewandte Chemie International Edition*. 50, 3, 586-621.
- Yuan, L.H. 2011. Impact of apple grape juice consumption on the antioxidant status in healthy subjects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 62(8) 844-850.

## Türkiye Batı Karadeniz Bölgesi'ndeki kayın-kestane karışık ormanlarında ağaçlarda göğüs yüzeyindeki çapa bağlı azot içeriğinin değişimi

Ecem Cansu Özcan\*, Murat Sargıncı

\*Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği, Düzce, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: muratsarginci@duzce.edu.tr

### Özet

Bu çalışmanın amacı iklimsel olarak Batı Karadeniz kıyı kesimini temsil eden Düzce-Akçakoca bölgesi kayın (*Fagus orientalis* Lipsky) ve kestane (*Castanea sativa* Mill.) karışık meşçerelerindeki farklı çap ve boylardaki ağaçların toprak altı (kök) ve toprak üstü (gövde, dal, kabuk, yaprak) kısımlarının içerdiği azot (N) oranlarının belirlenmesidir. Araştırma sahaları Avrupa-Sibirya (Euro-Siberian) flora bölgesinin Öksin (Euxin) kesiminde yer almaktadır ve Batı Karadeniz iklim tipi içerisinde yer alan sahil kesimini temsilen doğu kayını ve Anadolu kestanenin yayılış gösterdiği Bolu Orman Bölge Müdürlüğüne Bağlı Akçakoca İşletme Müdürlüğü, Deredibi Orman İşletme Şefliği'ndeki Kaplandede dağ kesitinden seçilmiştir. 24 adet kayın ağacı ve 24 adet kestane ağacında azot içeriği hesaplanmıştır. Azot oranı en yüksek yaprakta ve en düşük oranda köklerde olmasına rağmen biyokütleyle bağlı olarak en yüksek azot miktarı köklerde, en düşük azot miktarı ise kayın ve kestanede kabuklarında belirlenmiştir. Çapa bağlı olarak, tüm ağaç bileşenleri (dal, yaprak, gövde ve kök) azot miktarlarının yanı sıra toplam miktarları hesaplayabilmek için regresyon denklemleri oluşturulmuştur. Kayın ve kestane toplam azot miktarı için regresyon denklemleri sırasıyla  $N \text{ (kg)} = 0.1083 \times \text{çap} - 1.2855$  ( $r^2=0.9116$ ) ve  $N \text{ (kg)} = 0.0717 \times \text{çap} - 0.8435$  ( $r^2=0.7551$ ). Bu değerler sürdürülebilir iklim yönetimi besin hesaplamaları ile ilgili alan verimliliğinde kullanılabilir. Ağacın sadece çapını bilen uygulamacılar ve araştırmacılar, N değerlerini çok geniş bir alanda kolayca hesaplayabilecektir. Ek olarak, bu veriler bölge için uzun vadeli bilgi olarak saklanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kayın, kestane, biyokütle, azot.

### Variation of Nitrogen Content of Beech-Chestnut Mixed Forests' Trees According to Diameter at Breast Height in Western Black Sea Region of Turkey

#### Abstract

The aim of this study is to determine the ratio and amount of Nitrogen (N) depends on biomass of below- (root) and aboveground of trees (stem, branch, bark, leaves) with different diameter at breast height (DBH) and height in beech (*Fagus orientalis* Lipsky) and chestnut (*Castanea sativa* Mill.) mixed stands in the Düzce-Akçakoca region where represents coastal climate region of Western Black Sea. Study sites are in Euxin subregion of Euro-Siberian Floristic Region and have been chosen from Kaplandede Mountain in Chieftaincy of Deredibi Forest Management where under Bolu Regional Directorate of Forestry organization where exists in Western Black Sea Coastal Climate Region. The content of N were calculated from 24 beech and 24 chestnut trees. Although the highest ratio of N was on tree leaves and the lowest was on stem wood, the highest amount of N was on roots and the lowest amount was on bark for both beech and chestnut trees depends on their biomass. Depending on the diameter, regression equations were created that can calculate N amounts of all tree components (branch, leaf, stem and root) as well as the total amounts. The regression equations for the total N amount of beech and chestnut were  $N \text{ (kg)} = 0.1083 \times \text{DBH} - 1.2855$  ( $R^2=0.9116$ ) and  $N \text{ (kg)} = 0.0717 \times \text{DBH} - 0.8435$  ( $R^2=0.7551$ ), respectively. These values can be used field efficiency related for sustainable management nutrient-calculations for the region. Knowing only the diameter of the tree, practitioners and researchers will be able to calculate N values easily in a very large area. In addition, these data may be stored as long-term information for the region.

**Keywords:** Beech, chestnut, biomass, nitrogen.

### GİRİŞ

Her geçen gün insan popülasyonunun artması doğal ekosistemler üzerindeki baskıların da artmasına neden olmuştur. 15-16 yy. da Rönesans ile bilim ve teknoloji alanında yenilikçi yaklaşımlar ve buna bağlı yeni gelişmeler meydana gelmiştir. 16.yy da hızlı nüfus artışı ile devam eden süreç 18.yy da Sanayi devrimi ile ayrı bir boyut kazanmıştır. Kısa zamandaki bu ilerleme ekosistemlerin dengelerini alt üst etmiş ve yeni buluşlar ile

hammaddeye olan ihtiyacın artmasına neden olmuştur. Orman alanları sadece odun hammaddesine olan ihtiyaç için tahrip edilmemiştir. Maden sahalarına erişim, otlatma ve tarım için yapılan açmalar ve şehirleşmede eklenince senaryo farklı boyutlara ulaşmıştır. II. Dünya Savaşı ile askeri ve teknolojik alandaki tesislerin atıkları, Nükleer Silah kullanımı ve 1970-80'li yıllardaki tropik ormanların meydana gelen tahribatlar yöneticileri gelişen bu durum karşısında çözüm yolları aramaya itmiştir. 1990 yılından itibaren Rio Dünya Çevre Zirvesi, Montreal süreci, Stokholm, Helsinki önerileri gibi birçok yerde orman alanlarının ve doğal kaynakların iyi kullanılması gerektiğine, saha verimliliği ve sürdürülebilirlik gibi önemli kavramlara vurgu yapılmıştır (FAO,2001) .

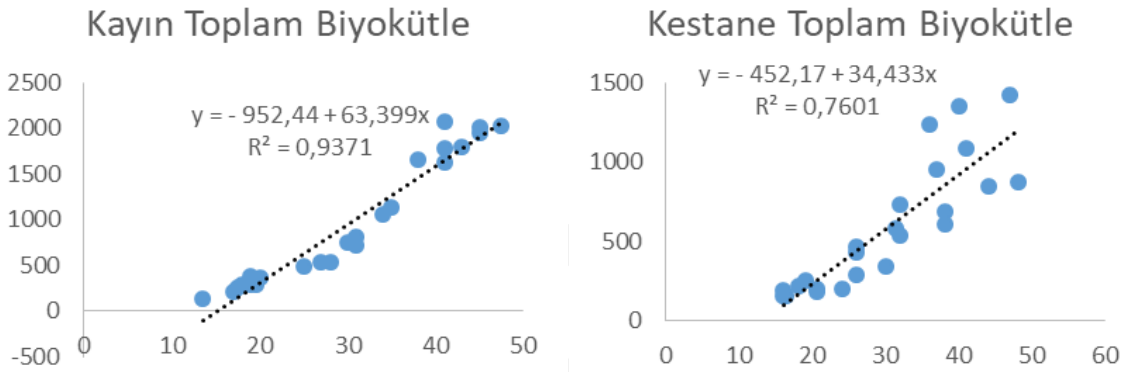
Sürdürülebilirlik teriminin hayatımıza girmesi ile orman alanlarından faydalanma kontrol altına alınmaya çalışılmıştır. Nüfus artışının halen devam etmesi ne kadar önlem alınsa da piyasanın hammaddeye olan ihtiyacı yüzünden tahribat üzerinde ki kontrol etkilerini hiçe saymıştır. Karasal ekosistemlerin % 30 nu orman alanları oluşur. Her yıl ortalama bu orman alanlarının % 0,3 'ü yok edilmektedir. Odun hammaddesi ihtiyacını önlemek amacı ile dünya üzerinde yılda 5 milyon ha. gibi bir alanda hızlı yetişen tür ağaçlandırmaları yapılmıştır. Ancak bu oranda yapılan çalışmaların her gün büyüyen odun açığını kapatmasını düşünmek bile imkânsızdır (Yıldız, 2009). Orman alanlarında bitkilerin beslenmesi için gerekli bitki besin elementlerinin bir kısmını toprak üzerinde ayrışması tamamlanan organik maddelerden sağlanmaktadır. Son zamanlarda kullanılmayan ağaç parçaları(dal, kök, kabuk, vs) kullanıma alınmıştır. Endüstriyel açıdan değerlendirilen bu materyaller piyasanın isteklerine cevap olsa da orman alanlarındaki verimin düşmesine neden olmaktadır. Verimsizleşmeyi destekleyen ayrı bir durum ise orman alanlarında ki ağır iş makinaları, maden atıkları ve kullanılmaya başlanan ağır kimyasal maddelerdir. Bütün bu sebepler tahrip edilen orman alanlarının yanında mevcut olan orman alanlarının da verimlerinin düşmesine neden olmaktadır (FAO, 2001). Verimi artırmada önemli bir kriter olan bitki besin elementlerinin orman ekosisteminde bulunma miktarları hesaplanırken araştırmacılar iki farklı yol izlemişlerdir. Bunlardan biri toprakta bulunma miktarları diğeri ise biokütlede bulunma miktarıdır. Ancak her iki işlem içinde birim zamanda maliyet ve iş miktarı oldukça fazladır. Bu çalışma birim zaman maliyet ve iş miktarı zıtlığının her iki paydaşına da optimal faydalar sağlamaktadır. Çalışma manipülatif yani doğası gereği doğadaki bazı değişkenleri değiştiren veya kontrol eden deneysel çalışma olmayıp durum belirleyen tanımlayıcı bilgilere dayanmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma sahaları Düzce ilinin Akçakoca ilçesine bağlı Kaplandede dağ kesitinden seçilmiştir. Alan Batı Karadeniz iklim tipi içerisinde yer almakta ve sahil kesimi temsil etmektedir. Bu sahalar Orta Karadeniz'den daha fazla Doğu Karadeniz'e nazaran ise daha az yağış almaktadır. En yakın Akçakoca ve düzce meteoroloji istasyonlarından alınan verilere göre ortalama sıcaklığı 13 °C ve Akçakoca için ortalama yıllık yağış miktarı 1070 mm iken Düzce için yağış 820 mm ye düşmektedir. Çalışma alanı Euro-Siberian flora bölgesinin Euxin kesiminde bulunmaktadır (Atalay, 2002). Araştırma alanlarında ormanın üst tabakasının büyük bir kısmında 100+ yaşında kapalılığı yer yer kırılmış yaşlı kayın ağaçları bulunmaktadır. Karışıma genelde gruplar halinde % 10-20 arası kestane (*Castanea sativa*) ve çok az miktarda bireyler halinde akçaağaç (*Acer compestre*, *A. platonoides*, *A. troutvetteri*) katılmaktadır. (Sargıncı, 2014). Çalışma alanında toprak tekstürü killi balçıktan kumlu balçığa kadar değişim göstermekte ve derinlik 80-90 cm'den fazladır. Çalışma alanı ve civarındaki topraklar USDA toprak sınıflandırma sistemine göre Typic Haplumbrepts olarak adlandırmaktadır (Kantarıcı, 2000). Eski Avrupa ve Amerika sınıflandırmasına göre ise asit kahverengi orman toprakları olarak adlandırılmaktadır (Sargıncı, 2014, Tavernier ve Smith, 1957, Yıldız ve Eşen, 2006, Yıldız ve ark., 2010). Çalışma alanlarından kayın kestane karışık meşçerelerini temsil edecek şekilde örneklemeler yapılmıştır. Çalışma bölgesi içerisinde farklı alanlardan "b", "c" ve "d" çağlarında bireyler tespit edilmiş ve ağaçların gelişim çağları çap sınıfları esasına göre oluşturulmuştur (b" Sırlıklık Direklik Çağını (Ø= 8-19,9 cm), "c" İnce Ağaçlık Çağını (Ø= 20-35,9 cm) ve "d" Orta Ağaçlık Çağını (Ø= 36-51,9 cm)). Bu bireylerden her bir tür ve her çağ için 8'er ve toplamda 48 adet ağaç belirlenmiştir. Örnek ağaçlar arazide kesilmiş ve dal, yaprak, gövde, kabuk ve kök kısımlarına ayrılmıştır. Her bir kısım ayrı ayrı tartılmış ve alt örneklemeler oluşturulmuştur. Alt örneklemeler laboratuvara taşınarak hassas terazide tartıldıktan sonra kurutma fırınında 65 °C'de ağırlık sabiti noktasına kadar kurutulmuştur. Kurutulmadan sonra tekrar tartılarak kuru madde oranları belirlenmiştir. Elde edilen oranlar arazide ki tartım değerlerine uygulanmış ve kesilen her bir ağaç için toplam dal, yaprak, gövde, kök biyokütelleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu işlem her birey için toplam toprak altı ve toprak üstü biyokütellerinin belirlenmesini sağlamıştır. Örneklerin N yoğunluğu Sömi-Mikro Kjeldal yöntemine göre tesbit edilmiştir (Kaçar ve İnan, 2008, Karla, 1998). N yoğunlukları biyokütle ile çarpılarak N miktarları hesaplanmıştır. İstatistik analizler SAS programı (SAS Inc., 1996) yardımıyla yapılmış ve sonuçlar  $\alpha = 0.05$  düzeyinde istatistiki olarak önemli kabul edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan arazi ve laboratuvar çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında istatistiki analizler tamamlanmış ve aşağıda belirtilen regresyon denklemleri oluşturulmuştur (Şekil 1-2). Her iki tür için ayrı ayrı oluşturulan bu denklemler göğüs yüksekliğindeki çapa bağlı olarak hem toplam biyokütlenin hesaplanabilmesini hem de bu biyokütleden elde edilen toplam azot miktarının hesaplanabilmesini sağlamaktadır. Buna göre Kayın ağacının toplam biyokütle ve azot miktarının ağacın göğüs yüksekliğindeki çapı (GYÇ) ile doğru orantılı ve pozitif (P-değerleri < 0,0001 ve R<sup>2</sup> değerleri 0,9371 ve 0,9116) bir ilişkisinin olduğu belirlenmiştir. Kestane ağacının toplam biyokütle ve azot miktarının ağacın göğüs yüksekliğindeki çapı (GYÇ) ile doğru orantılı ve pozitif (P-değerleri < 0,0001 ve R<sup>2</sup> değerleri 0,7601 ve 0,755) bir ilişkisinin olduğu belirlenmiştir. Uydular tarafından yapılan gözlemler ve ölçümler günümüzde ormanlardaki yer üstü biyokütlesini tahmin etmenin birincil kaynağı haline gelmiştir (Lu, 2006). Hiçbir uzaktan algılama aleti doğrudan biyokütle içeriğini ölçemediğinden, uzaktan algılama sinyali ile biyokütle arasında bir ilişki kurmak için yersel ölçümlere gerek vardır (Rosenqvist ve ark., 2003). Bu bağlamda elde edilen bu veriler ile gerek biyokütle miktarları gerekse içerdiği besin elementleri miktarları ileriki yıllarda hiç yersel ölçüm yapmadan uzaktan algılama metotlarıyla belirlenebilir.



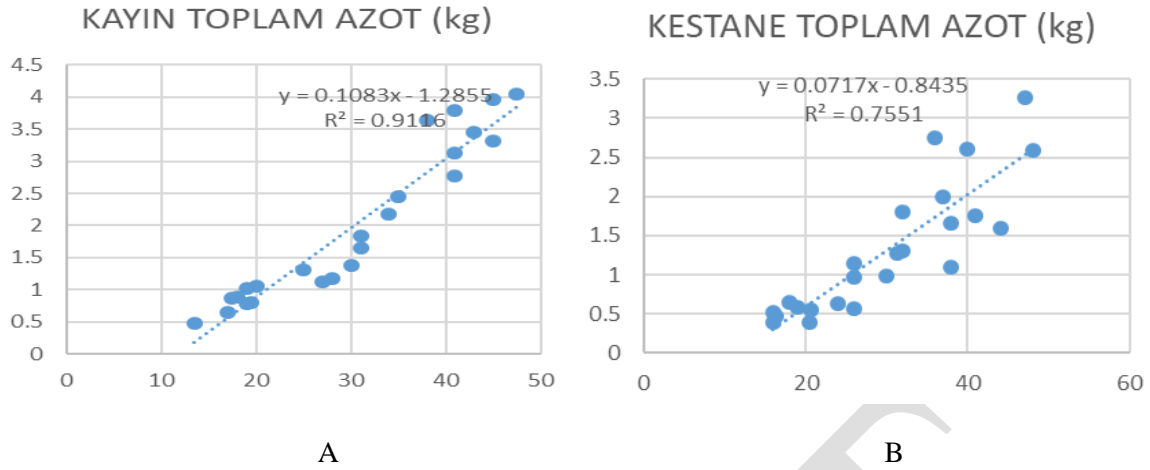
Şekil 1. Düzce Akçakoca yöresindeki kayın (A) ve kestane (B) göğüs yüksekliğindeki (d1.30) çapı ile ağacın toplam biyokütlesi arasındaki ilişki.

Yukarıdaki grafiğe göre Kayın ve Kestane ağaçları için oluşturulan biyokütle regresyon denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$\text{Kayın Biyokütlesi (kg)} = -952,44 + 63,399 \times \text{DBH (cm)}$$

$$\text{Kestane Biyokütlesi (kg)} = -452,17 + 34,433 \times \text{çap (cm)}$$

Ormanlarda biyokütle miktarının belirlenmesi pratik ormancılık sorunlarının çözülmesinin yanında bilimsel amaçlar için de oldukça önemlidir (Parresol, 1999; Wang, 2006). Biyokütle çalışmalarının büyük çoğunluğu geniş yayılış gösteren orman ağacı türleri üzerinde yapılmıştır. Çünkü bu ağaç türlerinin yer üstü biyokütlesi, bir orman ekosistemindeki toplam canlı biyokütlesinin en büyük bölümünü oluşturmaktadır (Chave ve ark, 2005; Basuki ve ark., 2009). Bununla birlikte, göreceli olarak çok az sayıda çalışma, farklı ağaç bileşenleri, ağaç türleri ve coğrafi bölgeler için biyokütle modelleri geliştirmeyi amaçlamıştır (Zianis ve ark, 2005; Bi ve ark, 2010; Sargıncı;2014). Şimdiki çalışmada da elde edilen veriler doğrultusunda ağaç biyokütlesinin hesaplanabilmesi için oluşturulan biyokütle denklemleri ve yine biyokütle bileşenlerinin içerdiği N oranlarından yola çıkarak hesaplanan azot miktarlarının göğüs yüksekliğindeki çap bağlı olarak değişim miktarları Şekil 2’de gösterildiği gibi regresyon denklemleri oluşturularak ortaya konmuştur.



**Şekil 2.** Düzce Akçakoca yöresindeki kayın (A) ve kestanenin (B) göğüs yüksekliğindeki (d1.30) çapı ile ağacın toplam azot miktarı (N kg) arasındaki ilişki.

Yukarıdaki grafiğe göre Kayın ve Kestane ağaçları için oluşturulan N miktarının çapa bağlı değişimini gösteren regresyon denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$\text{Kayın Toplam Azot Miktarı (kg)} = - 1.2855 + 0.1083 \times \text{çap(cm)}$$

$$\text{Kestane Toplam Azot Miktarı (kg)} = - 0.8435 + 0.0717 \times \text{çap (cm)}$$

## SONUÇ

Bu çalışma ile Batı Karadeniz kıyı kesiminin iklimini temsil eden Düzce-Akçakoca bölgesi kayın (*Fagus orientalis* Lipsky) ve kestane (*Castanea sativa* Mill.) karışık meşçerelerinde farklı çap ve boylardaki ağaçların toprak altı (kök) ve toprak üstü biyokütle ve biyokütleyle bağlı azot (N) miktarları belirlenmiştir. Bu veriler ile de biyokütleyle bağlı azot miktarlarını hesaplayabilecek regresyon denklemleri elde edilmiştir. Bu çalışma oluşturulan sözkonusu regresyon denklemleri sayesinde gelecekte bu bölge için yapılması planlanan uzun vadeli ormancılık faaliyetlerinde saha verimliliğinin hesaplanmasında birim zamandaki iş ve maliyeti azaltması ile kritik öneme sahiptir. Bu veriler hem uygulamacıya hem de benzer sahalarda çalışma yapacak bilim insanlarına oldukça geniş kolaylık sağlayacaktır. Nitekim ormanlarda biyokütle ve biyokütleyle bağlı besin elementleri miktarlarının belirlenmesi pratik ormancılık sorunlarının çözülmesinin yanında bilimsel çalışmalar için de önemli bir altlık oluşturacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi BAP-2017. 02. 02. 599 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir

## KAYNAKLAR

- Atalay, İ., Türkiye'nin Ekolojik Bölgeleri. Meta Basimevi, İzmir, Türkiye (2002).
- Basuki TM, Laake PEv, Skidmore AK, Hussin YA. Allometric equations for estimating the above-ground biomass in tropical lowland Dipterocarp forests. For Ecol Manag 2009; 257(8):1684e94.
- Bi H, Long Y, Turner J, Lei Y, Snowdon P, Li Y, et al. Additive prediction of aboveground biomass for *Pinus radiata* (D. Don) plantations. For Ecol Manag 2010;259(12):2301e14.
- Chave J, Andalo C, BrownS, Cairns MA, Chambers JQ, EamusD, et al. Tree allometry and improved estimation of carbon stocks and balance in tropical forests. Oecologia 2005;145(1):87-99.
- FAO. 2001. Global forest resources assessment 2000. Main report. FAO. Forestry Paper 140. Rome, Italy
- Kacar, B., İnal A., 2008. Bitki Analizleri, Nobel Yayın Dağıtım, ISBN 978-605-395-036-3, Ankara.
- Kalra, Y. (Ed.), 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. 287 pages.
- Kantarci, D., Toprak İlmi. İstanbul Üniversitesi yayın no. 4261 (2000).

- Lu, D. S. (2006). The potential and challenge of remote sensing-based biomaestimation. *International Journal of Remote Sensing*, 27, 1297-1328.
- Parresol RB. Assessing tree and stand biomass: a review of examples and critical comparisons. *For Sci* 1999;45(4):573-93.
- Rosenqvist, A., Milne, A., Lucas, R., Imhoff, M., & Dobson, C. (2003). A review of remote sensing technology in support of the Kyoto Protocol. *Environmental Science & Policy*, 6, 441-455.
- Sargıncı, M., *Batı Karadeniz Orman Ekosistemlerinde ölü Örtü Dinamiği*. Doktora Tezi. Düzce Üniversitesi, Düzce (2014).
- SAS Institute, Inc., *SAS/STAT Users Guide, Version 6.12*. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina (1996).
- Tavernier, R., Smith, G.D., The concept of Braunerde (Brown Forest soils) in Europe and the United States. *Advan. Agron.* 9 (1957) pp. 217-289.
- Wang C. Biomass allometric equations for 10 co-occurring tree species in Chinese temperate forests. *For Ecol Manag* 2006;222(1e3):9-16.
- Yıldız, Oktay, et al. "Kayın (*Fagus orientalis* Lipsky) ekosistemlerinde saha verimliliğinin sürdürülebilirliği." *Orman ve Av* 5 (2009): ss. 33-45.
- Yıldız, O., Eşen, D., Effects of different Rhododendron control methods in eastern beech (*Fagus orientalis* Lipsky) ecosystems in the western Black Sea Region of Turkey. *Annals of Applied Biology* 149 (2006) 235-242.
- Yıldız, O., Esen, D., Karaoz, M. Ö., Sargıncı, M., Toprak, B., Soysal, Y., Effects of different site preparation methods on soil carbon and nutrient removal from Eastern beech regeneration sites in Turkey's Black Sea region. *Applied Soil Ecology*. 45 (2010).
- Zianis D, Muukkonen P, Makipä R, Mencuccini M. Biomass and stem volume equations for tree species in Europe. *Silvafennica Monogr* 2005;4:63.



## İyonik sıvı katalizörlüğünde bitkisel atık yağlardan biyodizel üretimi

Adile Bilgin<sup>1\*</sup>, Aşkın N. Suvar<sup>1</sup>, Özgür Sönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bölüm, Mersin, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: adilekavlak33@hotmail.com

### Özet

Yemeklik bitkisel yağlar kullanıldıktan sonra uygun bir şekilde depolanmadan ve doğrudan çevreye salındığında çeşitli çevre problemlerine neden olurlar. Bununla birlikte atık pişirme yağları biyodizel üretiminde kullanıldığında hem biyodizel üretiminde önemli bir problem olan üretim maliyetini düşürür, hemde çevreye atılması önlenmiş olur. Bu çalışmada atık bitkisel yağdan biyodizel üretimi iyonik sıvı katalizörlüğünde mikrodalga yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üç farklı katalizör, 1-metil imidazol hidrogen sülfat ([Hmim]HSO<sub>4</sub>), 1-bütül-3-metilimidazolyum hidrogen sülfat ([Bmim]HSO<sub>4</sub>) ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Metanol/yağ mol oranı, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi ve katalizör dozajının biyodizel dönüşümüne etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, en etkili katalizörün [Bmim]HSO<sub>4</sub> olduğunu göstermiştir. Optimum koşullar aşağıdaki gibidir: metanol / yağ mol oranı 28:1, reaksiyon süresi 4 saat, reaksiyon sıcaklığı 150 °C ve [Bmim]HSO<sub>4</sub> dozu %10. Bu şartlar altında, biyodizelin dönüşümü% 93.5'e olarak bulunmuştur. Ayrıca [Bmim]HSO<sub>4</sub> kullanıldıktan sonra geri kazanılmış ve tekrar kullanılmıştır. [Bmim]HSO<sub>4</sub>'ün katalitik aktivitesinde 4 kez tekrar kullanıldıktan sonra çok az bir düşme gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyodizel, atık pişirme yağı, iyonik sıvı, mikrodalga yöntem

### Biodiesel production from waste vegetable oils in ionic liquid catalyst

#### Abstract

After using edible vegetable oils, they cause various environmental problems if not disposed properly and released directly into the environment. However, when used in biodiesel production, waste cooking oils reduce the cost of production, which is an important problem in the production of biodiesel, and prevent its disposal into the environment. In the study, to improve the efficiency of the acid-catalysed biodiesel production process, acidic imidazolium ionic liquids were employed to the production of biodiesel from waste vegetable oil under microwave irradiation. The efficiencies of three different catalysts, 1-methyl imidazole hydrogen sulphate ([Hmim]HSO<sub>4</sub>), 1-butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulphate ([Bmim]HSO<sub>4</sub>), and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were compared. The effect of the methanol/oil mole ratio, reaction temperature, reaction time, and catalyst dosage on the conversion of biodiesel was investigated. The results showed that the most effective catalyst was the ionic liquid [Bmim]HSO<sub>4</sub>. The optimal conditions were as follows: methanol/oil mole ratio 28:1, reaction time 4h, reaction temperature 150°C and [Bmim]HSO<sub>4</sub> dosage 10%. Under these conditions, the conversion of biodiesel reached 93.5%. In addition, [Bmim]HSO<sub>4</sub> was also recovered and reused. The catalytic activity of [Bmim]HSO<sub>4</sub> showed a slight decrease after four successive applications.

**Keywords:** Biodiesel, waste cooking oil, ionic liquid, microwave method

### GİRİŞ

Günümüz mevcut enerji politikaları, fosil yakıtların yanmasından kaynaklanan sera gazı emisyonlarının seviyesini azaltmak için sürdürülebilir yenilenebilir enerjinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Ayrıca, petrol rezervlerinin azalacak olması ve artan petrol maliyetleri de, çevreye zarar vermeyen alternatif temiz yakıt kaynaklarına yönelimine neden olmuştur. On yıllarda biyodizel temiz, yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Biyodizel transesterleşme yöntemi ile yenilebilir veya yenilemeyen bitkisel yağlar, hayvansal yağlar ve atık pişirme yağlarından bir katalizör varlığında etanol veya metanol gibi düşük zincirli alkoller kullanılarak elde edilir (Borah ve ark. 2018). Biyodizelin ticari üretiminde en büyük maliyet üretim maliyetidir. Palm, soya, Hindistan cevizi, yerfıstığı, ayçiçek ve kanola yağı gibi birçok bitkisel yağ biyodizel üretiminde kullanılır (Ullah ve ark., 2017). Fakat bitkisel yağlar gıda endüstrisinde önemli hammaddelerdir, bundan dolayı bu yağların biyodizel üretiminde kullanılması ekonomik ve paratik değildir. Yenilebilir bitkisel yağlar biyodizel üretimi için pahalı hammaddelerdir, bundan dolayı maliyetleri düşürmek için yenilemeyen yağlar, atık pişirme yağları gibi daha düşük hammaddeler kullanılabilir (Fadhil ve ark.,

2017). Biyodizel üretim maliyetini azaltmanın bir yolu, atık yemeklik yağlar gibi daha ucuz hammaddelerin biyodizel üretiminde kullanılmasıdır. Atık yemeklik yağlar, yenilebilir bitkisel yağlardan 2-3 kat daha ucuzdur (Talabian ve ark., 2013).

Dünyanın dört bir yanında restoranlarda veya evlerde yemek pişirmek için yenilebilir yağlar kullanılıyor, ardından bu yağlar atılıyor. Isı ve su miktarı, trigliseritlerin hidrolizini ve yağdaki serbest yağ asidi miktarını artırır. Bundan dolayı, atık yemeklik yağlar fazla miktarda serbest yağ asidi içerir (Talabian ve ark., 2013). Atık yemeklik yağlar, bazik katalizörler kullanarak transesterleşme yoluyla biyodizel üretiminde doğrudan kullanılamazlar. Çünkü serbest yağ asitleri bazik katalizörler ile sabun oluşumuna neden olurlar. Bundan dolayı, serbest yağ asitleri fazla olan bitkisel yağların transesterleşme reaksiyonlarında katalizör olarak sülfürik ve hidroklorik asit gibi güçlü homojen asit katalizörler kullanılır. Fakat bu homojen katalizörlerin reaksiyon ortamından geri alınmasının zor olması, kullanılan ekipmanlarda korozyona sebep olmaları, atık su ve asidik kirlilik oluşturması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Mohammadshirazi ve ark., 2014). Bundan dolayı alternatif katalizörlerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Son zamanlarda biyodizel üretiminde iyonik sıvılar alternatif yeşil katalizörler olarak kullanılmaya başlanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmada atık pişirme yağlarından biyodizel üretiminde katalizör olarak asidik karakterde iyonik sıvılar kullanılmıştır. Katalizör miktarı ve tipinin, sıcaklığın, reaksiyon süresinin ve metanol/oleik asit molar oranının biyodizel verimi üzerine olan etkisi araştırılmış ve tartışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmada kullanılan atık yağ, Mersin Üniversitesi Merkez Yemekhanesinden temin edilmiştir. Alınan atık yağ süzülerek asılı katı parçacıklar ve yiyecek kalıntıları giderilmiştir. Atık yağ kullanılmadan önce 110 °C de 2 saat kurutularak içerdiği nem uzaklaştırılmıştır. Deneylerde kullanılan 1-butil-3-metilimidazolium hidrojen sülfat, 1-metilimidazolium hidrojen sülfat Sigma Aldrich firmasından temin edilirken, metanol, sülfürik asit, dietileter ve sodyum hidroksit Merck firmasından temin edilmiştir.

### Mikrodalga Yöntem ile Atık Yağdan Biyodizel Üretimi

Biyodizel üretimi sıcaklık kontrollü ve karıştırma özelliğine sahip Milestone marka mikrodalga reaksiyon sisteminde teflon reaktörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 mL reaktör içerisine 10 gram atık yağ ve belirlenen oranlarda metanol ve katalizör ilave edilmiştir. Test edilen parametreler sıcaklık (80-180 °C), zaman (15dk-6 saat), metanol/yağ molar oranı (5:1-31:1) ve katalizör miktarı (% 1-25, a/a) olmuştur. Deney sırasında reaksiyon sıcaklığı, bir sıcaklık sensörü ile kontrol kabındaki sıcaklık ölçülerek takip edilmiştir. Reaksiyonun tamamlanmasından ardından, karışımın oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaksiyon karışımı bir ayırma hunisine aktarılarak bir gece boyunca bekletilerek fazların ayrılarak iki fazın ayrılmasına olanak verilmiştir. Üst faz biyodizel içerirken, alt faz gliserin ve iyonik sıvı içermektedir. Alt faz ayrıldıktan sonra üst faz ultra saf su ile üç kere yıkanarak safsızlıklar giderilmiştir. Ürün 80 °C de kurtularak fazla metanol uzaklaştırılmış ve analize hazır hale getirilmiştir.

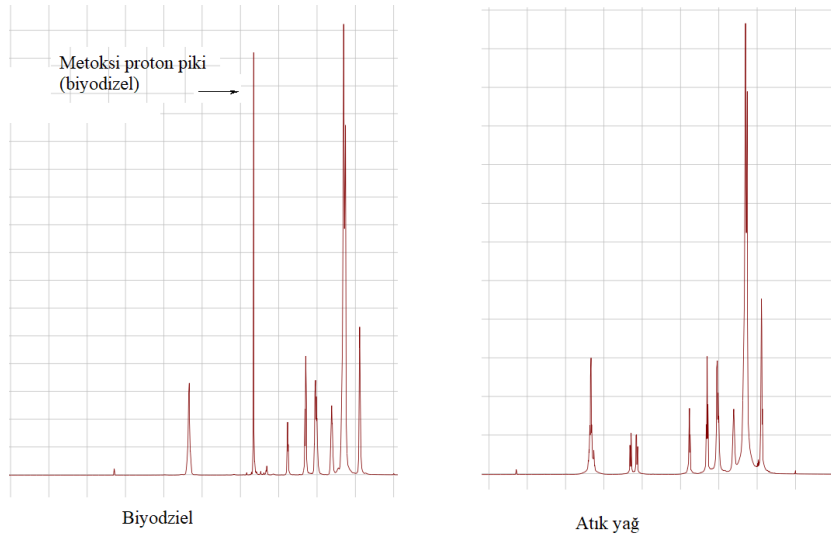
### Ürün Analizi

Metil ester dönüşümü olarak tanımlanan biyodizel dönüşümü <sup>1</sup>H NMR tekniği kullanarak aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir. Çözücü olarak CDCl<sub>3</sub> kullanılmıştır. Şekil 1 de hem üretilen hemde atık yağın NMR spektrumları gösterilmiştir.

$$\text{Dönüşüm} = 100 \times (2\text{AME}) / (3\text{ACH}_2) \quad (1)$$

AME= NMR spektrumunda 3,6 ppm'deki metil ester pikinin metoksi protonlarının integrali.

ACH<sub>2</sub>= 2,3 ppm deki α-metilen pikinin integrali

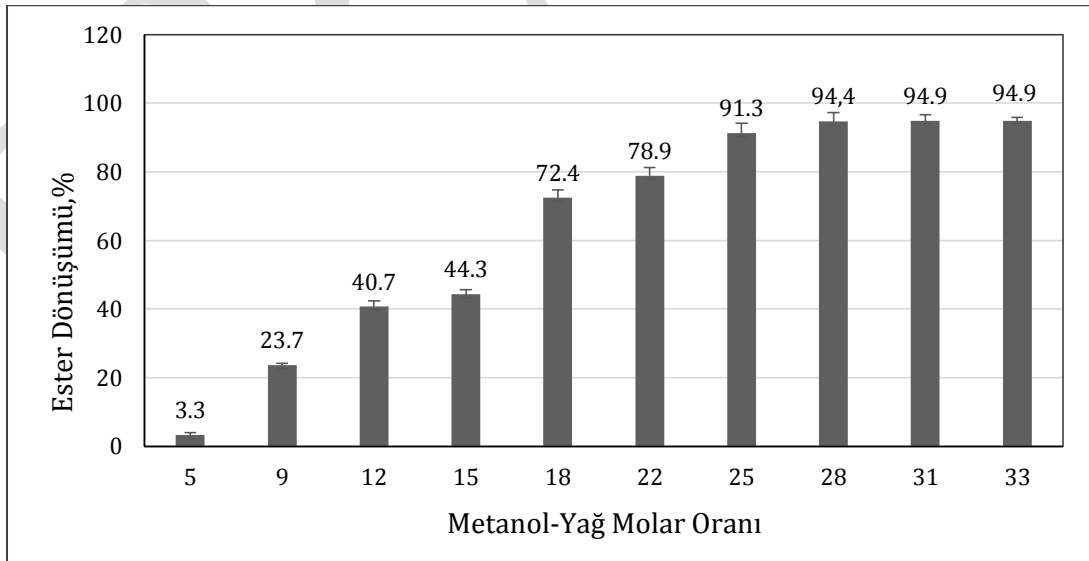


Şekil 1. Biyodizel ve atık yağın NMR spektrumları

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Reaksiyon Koşullarının Biyodizel Sentezi Üzerine Etkisi Metanol-Yağ Molar Oranının Etkisi

Transesterleşme tepkimesinde metanol-yağ molar oranı biyodizel verimini etkileyen parametrelerden biridir. Bitkisel yağların ana bileşeni olan trigliseritin transesterleşmesinde her bir mol trigliserit için 3 mol alkole ihtiyaç vardır. Reaksiyon sonucunda 3 mol yağ asidi metil esteri ve gliserin oluşur. Trigliseritlerin transesterleşme tepkimesi tersinir bir tepkimedir ve bundan dolayı fazla metanol miktarı tepkimeyi metil ester oluşumuna doğru yönlendirir (Mansir ve ark., 2018). Bu çalışmada metanol-yağ molar oranı 5:1-33:1 oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 2 metanol-yağ molar oranının yağ asidi metil ester dönüşümüne olan etkisi gösterilmiştir.

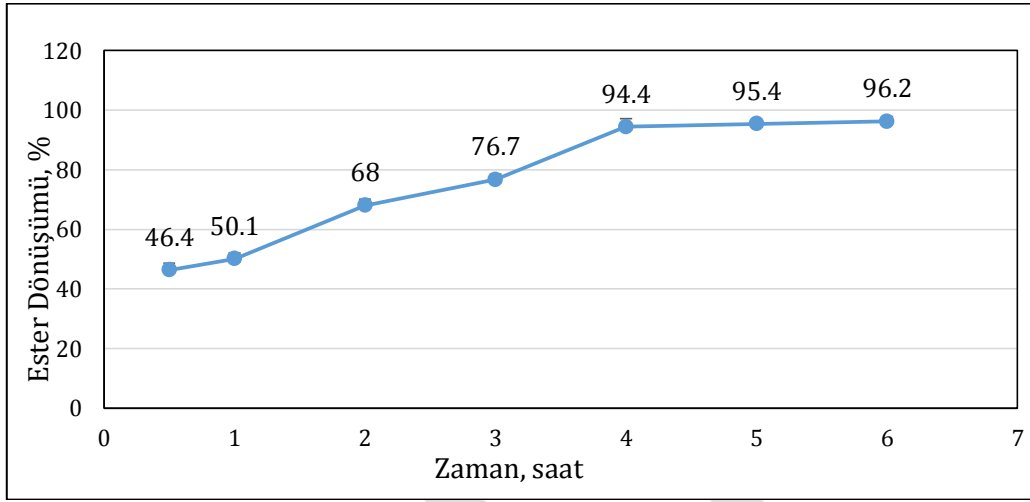


Şekil 2 Metanol-yağ molar oranının ester dönüşümü üzerine olan etkisi (150 °C reaksiyon sıcaklığı, %25 iyonik sıvı, 6 saat reaksiyon süresi)

Şekil 2 incelendiğinde metanol-yağ molar oranı arttıkça ester dönüşümünün de arttığı görülmektedir. Özellikle metanol-yağ molar oranı 25 olduktan sonra dönüşümün %90'ların üzerinde olduğu görülmüştür ve daha sonra sabit kalmıştır. Diğer taraftan metanol-yağ molar oranı 28:1 den sonra metanol miktarındaki daha fazla artış dönüşüm üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda diğer parametrelerin etkisini araştırmada metanol-yağ molar oranı 28 olarak alınmıştır.

### Reaksiyon Süresinin Etkisi

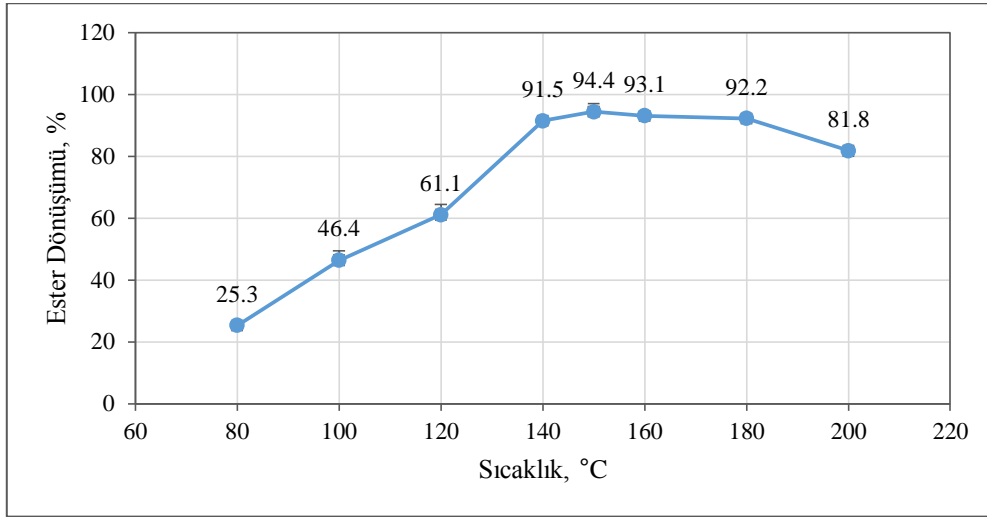
Ester değişim reaksiyonu ile biyodizel üretiminde sıcaklık biyodizel dönüşümünü etkileyen parametrelerden biridir. Bundan dolayı, zamanın ester dönüşümü üzerine olan etkisini araştırmak için farklı zamanlarda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Diğer parametreler ise reaksiyon sıcaklığı 150 °C, metanol-yağ molar oranı 28:1 ve katalizör miktarı %25 olarak sabit tutulmuştur. Şekil 3’de reaksiyon süresinin ester dönüşümü üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Yarım, 1,2 ve 3 saat sonunda ester dönüşümü %90’nın altında iken, 4 saatin sonunda ester dönüşümünün %90’nın üzerine çıktığı ve 4,5 ve 6. saatlerde hemen hemen sabit kaldığı gözlenmiştir. 4 saatin sonunda dönüşüm dengeye ulaşmış ve dönüşüm sabit kalmıştır.



Şekil 3 Reaksiyon süresinin ester dönüşümü üzerine olan etkisi

### Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

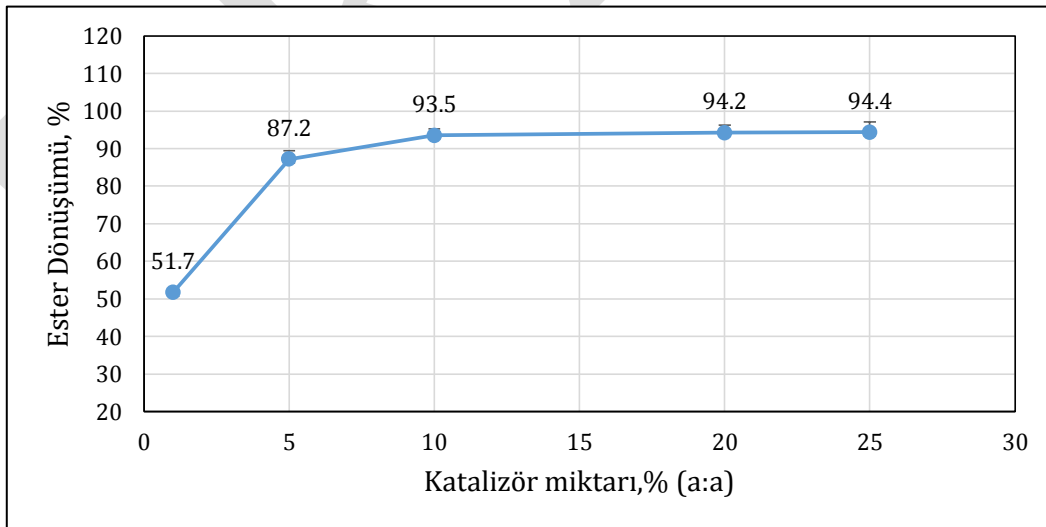
Biyodizel üretiminde verimi etkileyen önemli faktörlerden biride sıcaklıktır. Reaksiyon sıcaklığının, [Bmim]HSO<sub>4</sub> varlığında metanol ile atık yağın esterleşmesi üzerindeki etkisi, 4 saat boyunca 80-200 °C sıcaklık aralığında araştırılmıştır. Diğer parametreler ise metanol-yağ oranı 28:1 ve katalizör miktarı % 25 olarak alınmıştır. Şekil 4. reaksiyon sıcaklığının ester dönüşümü üzerine olan etkisini göstermektedir. 80, 100 ve 120 °C’lerde yapılan deneylerde elde edilen ester dönüşümü düşük iken, 140 °C’den sonra ester dönüşümünde önemli artışlar (%90’nın üzerinde) gözlemlenmiştir. En yüksek ester dönüşümü 150 °C de %94,4 olarak elde edilmiştir. Bundan dolayı optimum reaksiyon sıcaklığı 150 °C olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sıcaklığındaki artış hem moleküler çarpışmayı hemde reaktantların bir biri içinde karışmasını kolaylaştırmaktadır. Diğer taraftan, reaksiyon sıcaklığının artması hem yağın hemde katalizör olarak kullanılan iyonik sıvının viskozitesinin düşmesine neden olmaktadır (Zheng ve ark., 2017). Bu sebeplerden dolayı iyonik sıvı reaktantlar ile daha iyi karışmakta bunun sonucunda da daha yüksek ester dönüşümü elde edilmektedir. Fakat daha yüksek sıcaklıklarda ester dönüşümünde düşüşler gözlenmiştir. 180 °C de ester dönüşümü % 92,2’ye düşerken, 200 C de %81,8’ e düşmüştür.



Şekil 4. Sıcaklığın ester dönüşümü üzerine etkisi

### Katalizör Miktarının Etkisi

Katalizör miktarı reaksiyon için oldukça önemlidir. Yapılan bu çalışmada katalizör miktarının ester dönüşümü üzerine olan etkisini incelemek için [Bmim]HSO<sub>4</sub>'den % 1-25 arasında değişen oranlarda kullanılmıştır. Diğer parametreler ise, sıcaklık 150 °C, metanol-yağ molar oranı 28:1 ve reaksiyon süresi ise 4 saat olarak sabit tutulmuştur. Sonuçlar Şekil 5'de gösterilmiştir. Katalizör miktarı %1'den %10'a çıkarıldığında ester dönüşümü önemli oranda artmış ve %10 ile 25 arasında ise hemen hemen sabit kalmıştır. Bundan dolayı fazla miktarda iyonik sıvının kullanılması biyodizel maliyetini artıracığından optimum katalizör miktarı %10 olarak alınmıştır. İyonik sıvı miktarı artırıldığı zaman daha fazla reaktant iyonik sıvının asit kısımları ile etkileşime olanak bulur, bundan dolayı da ester dönüşüm miktarı da artmaktadır (Ding ve ark., 2017). [Bmim]HSO<sub>4</sub> yüksek viskoziteye sahip bir iyonik sıvıdır ve bu iyonik sıvının miktarının artırılması reaksiyon ortamının viskozitesinin artmasına neden olacaktır. Viskozitenin artması ile birlikte karışma problemleri meydana gelir ve bunun sonucunda kütle transferi ve reaksiyon hızı etkilenecektir (Li ve ark., 2014; Ullah ve ark., 2017). Bundan dolayı da fazla miktarda katalizör kullanılması verimi daha fazla artırmamıştır.

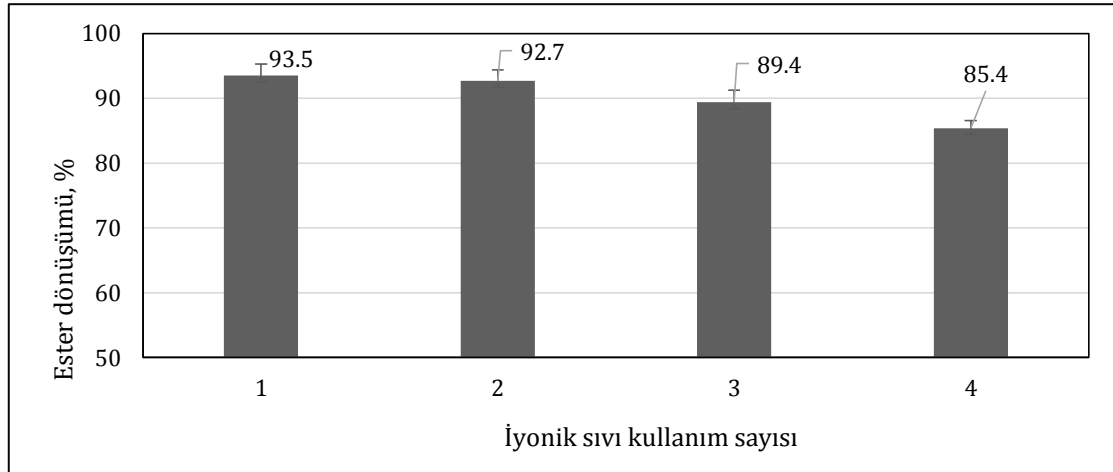


Şekil 5 Katalizör miktarının ester dönüşümüne olan etkisi

### İyonik Sıvının Tekrar Kullanılması

Biyodizel üretiminde homojen katalizörlerin geri kazanılıp tekrar kullanılmasındaki zorluklar bu katalizörlerin bir dezavantajıdır. Geri kazanılıp tekrar kullanılmadıklarında hem maliyetin artmasına hemde çevre için zararlı atıkların oluşumuna neden olmaktadır. İyonik sıvılar pahalı bileşikler olmasına rağmen, katalizör olarak

kullanıldığında reaksiyondan sonra tekrar kullanılması önemli bir avantajdır. Bu çalışmada kullanılan iyonik sıvı rekattanlar ile aynı fazda olduğundan homojen katalizör olarak değerlendirilebilir, ancak iyonik sıvı hem geri kazanılabilir hemde tekrar kullanılabilir özelliğine sahiptir. Geri kazanılan iyonik sıvı tekrar kullanılarak belirlenen koşullarda deneyler yapıldı ve sonuçlar Şekil 6'da gösterilmiştir.

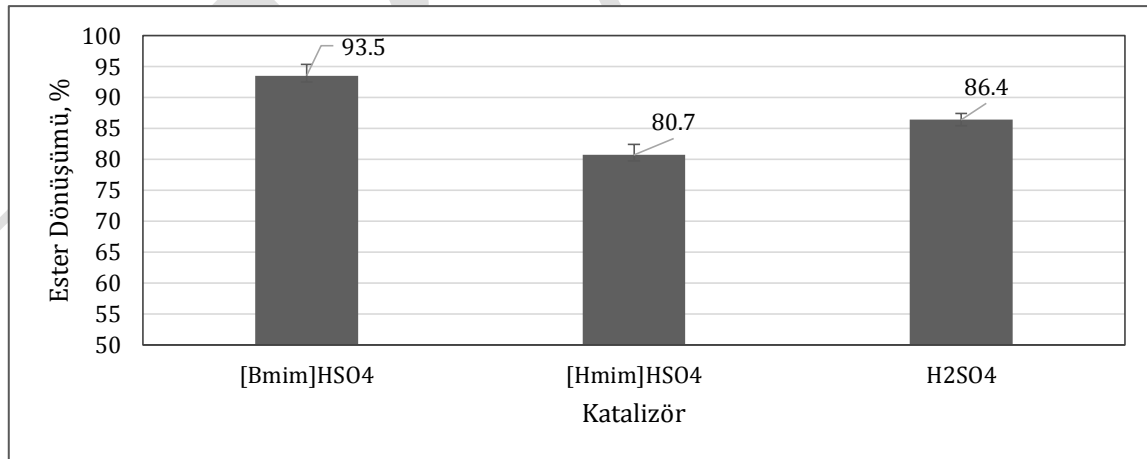


Şekil 6. İyonik sıvının tekrar kullanılabilirliği (Deney koşulları, 150 °C, metanol-yağ molar oranı 28:1, reaksiyon süresi 4 saat ve katalizör miktarı %10)

Şekil 6'da görüldüğü gibi iyonik sıvının dördüncü kez kullanımına doğru ester dönüşümünde bir azalma gözlenmiş ve bu %8,1'lik bir değere karşılık gelmektedir. Bu sonuç katalizörün geri dönüşümden sonra aktivitesinin genel olarak korunduğunu ve yeniden kullanılabilirliğe sahip olduğunu göstermiştir.

#### Farklı Katalizörlerin Etkisi

Bu çalışmada ayrıca atık bitkisel yağdan biyodizel üretiminde [Bmim]HSO<sub>4</sub> ile birlikte [Hmim]HSO<sub>4</sub> ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> katalizör olarak kullanılmış ve karşılaştırma yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 7 de gösterilmiştir.



Şekil 7 Farklı katalizörlerin katalitik aktivitelerinin karşılaştırılması (150 °C reaksiyon sıcaklığı, 28:1 metanol/yağ molar oranı, 4 saat reaksiyon süresi, %10 katalizör miktarı)

Şekil 7'de görüldüğü gibi [Bmim]HSO<sub>4</sub>'ün diğer iki katalizörden daha etkili olduğu görülmektedir. İyonik sıvıların yapıları ve asitlikleri atık yağın biyodizel dönüşümünü etkilemektedirler. Çalışmada kullanılan bu üç katalizörün 0,02 M çözeltileri hazırlanmış ve bunların pH değerleri bir pH metre kullanılarak belirlenmiştir. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, [Hmim]HSO<sub>4</sub> ve [Bmim]HSO<sub>4</sub> katalizörlerinin pH değerleri sırasıyla 1,63, 1,82 ve 1,92 olarak belirlenmiştir. Bitkisel yağlardan biyodizel üretiminde kullanılan katalizörün asitliği biyodizel verimi ve kalitesi açısından önemlidir. Fakat bizim bu çalışmada kullanılan katalizörlerden en etkili olanının diğer iki

katalizöre göre daha zayıf asit olan [Bmim]HSO<sub>4</sub> iyonik sıvısının olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, bu çalışmadaki koşullarda sadece katalizörün asitliği değil başka özelliklerinin de olabileceğini göstermiştir.

## SONUÇ

Elde edilen deneysel sonuçlardan biyodizel üretimi için en iyi koşullar belirlenmiştir. Bu koşullar, metanol / yağ mol oranı 28:1, reaksiyon süresi 4 saat, reaksiyon sıcaklığı 150 °C ve [Bmim]HSO<sub>4</sub> dozu %10 şeklindedir. Bu şartlar altında, biyodizelin dönüşümü% 93.5'e olarak bulunmuştur. Ayrıca katalizör olarak kullanılan iyonik sıvı geri kazanılıp ve tekrar kullanılmıştır ve dört kullanımına kadar katalizörün etkili olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar iyonik sıvıların biyodizel üretiminde katalizör olarak etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından 2019-1-TP2-3473 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Borah MJ, Devi A, Saikia RA, Deka D 2018. Biodiesel production from waste cooking oil catalyzed by in-situ decorated TiO<sub>2</sub> on reduced graphene oxide nanocomposite. *Energy*, 158: 881-889.
- Ding H, Ye W, Wang Y, Wang X, Li L, Liu D, Ji N 2018. Process intensification of transesterification for biodiesel production from palm oil: Microwave irradiation on transesterification reaction catalyzed by acidic imidazolium ionic liquids. *Energy*, 144: 957-967.
- Fadhil AB, Al-Tikrity E T, Albadree MA 2017. Biodiesel production from mixed non-edible oils, castor seed oil and waste fish oil. *Fuel*, 210: 721-728.
- Li Y, Hu S, Cheng J, Lou W 2014. Acidic ionic liquid-catalyzed esterification of oleic acid for biodiesel synthesis. *Chinese Journal of Catalysis*, 35(3): 396-406.
- Mansir N, Teo SH, Rabiu I, Taufiq-Yap YH 2018. Effective biodiesel synthesis from waste cooking oil and biomass residue solid green catalyst. *Chemical Engineering Journal*, 347:137-144.
- Mohammadshirazi A, Akram A, Rafiee S, Kalhor EB 2014. Energy and cost analyses of biodiesel production from waste cooking oil. *Renewable and sustainable energy reviews*, 33:44-49.
- Talebian-Kiakalaieh A, Amin NAS, Mazaheri H 2013. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy*, 104: 683-710.
- Ullah Z, Bustam MA, Man Z, Khan AS, Muhammad N, Sarwono A. 2017. Preparation and kinetics study of biodiesel production from waste cooking oil using new functionalized ionic liquids as catalysts. *Renewable energy*, 114: 755-765.
- Zheng Y, Zheng Y, Yang S, Guo Z, Zhang T, Song H, Shao Q 2017. Esterification synthesis of ethyl oleate catalyzed by Brønsted acid-surfactant-combined ionic liquid. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 10(4): 202-209

## Tüketicilerin probiyotik ürünlere yönelik algıları: Çanakkale örneği

Başar UYMAZ TEZEL<sup>1\*</sup>, Nefise AKÇELİK<sup>2</sup>, Mustafa AKÇELİK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Çanakkale, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: buymaz@comu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmanın amacı, Çanakkale'de yaşayan tüketicilerin, probiyotik ürünlere yönelik tutum ve davranışlarını belirlemektir. Bu amaçla, yüz yüze anket tekniği kullanılarak rastgele seçilen kişilere 31 soruluk bir anket yapılmıştır. Veriler, tanımlayıcı istatistikler kullanılarak analiz edilmiştir. Veriler farklı sosyo-ekonomik gruba dahil 499 tüketiciden (255 kadın ve 244 erkek) toplanmıştır. Anket verilerine göre tüketicilerin %53.7'si üniversite mezunu ve yaşları 17-25 (%40.7) ve 25-40 (%32.4) arasında değişiyor. Tüketiciler, sırasıyla, % 78.4'ü ve % 61.3'ü probiyotik ürünlerin yararlı mikroorganizmalar içerdiğini ve bu mikroorganizmaların canlı olması gerektiği hakkında hiçbir bilgiye sahip değildi. Tüketicilerin % 73,2'si sağlığı desteklemek için probiyotik tüketiminin gerekliliğini düşünmekle birlikte, tüketicilerin sadece % 14,8'i probiyotik ürünleri günlük tükettiğini belirtmiştir. Buna karşılık, tüketicilerin % 68.4'ü sağlıklarını desteklemek için faydalı yiyeceklere para harcadıklarını belirtirken; tüketicilerin 25.3'ü probiyotik ürünler için para harcamadıklarını belirtmiştir. Çanakkale örneğine odaklanan anket sonuçlarına göre, Türkiye'de probiyotik ürünler konusunda artan bir farkındalık bulunmaktadır, ancak probiyotik mikroorganizmalar ve sağlık etkileri hakkında hala önemli miktarda bilgi eksikliği söz konusudur.

**Anahtar Kelimeler:** Probiyotik ürünler, faydalı mikroorganizmalar, sağlık yararları, tüketici algısı.

### Consumers' perceptions of probiotic products: The case of Çanakkale

#### Abstract

The purpose of this study is to determine consumers', who lives in Çanakkale, attitudes, and behaviours towards the probiotics products. For this aim, a survey with 31 questions was obtained to randomly selected individuals with using face to face questionnaires technique. Data were analysed using descriptive statistics. Data were collected from 499 consumers (255 women and 244 men) in different socioeconomic groups. According to the survey, of consumers were university graduates, and the age of consumers was ranged between 17-25 (40.7%) and between 25-40 (32.4%). Respectively, 78.4% and 61.3% of consumers did not have any knowledge about that probiotic products include beneficial microorganisms and that they should be alive. Although, %73.2 of consumers thought the necessity of consumption of probiotics for support the health, only 14.8% of consumers indicated that the daily consumption of probiotic products. On the other hand, 68.4% of consumers stated that they spent money on beneficial foods to support their health, but 25.3 of consumers did not spend any money on probiotic products. According to survey results focused on the case of Çanakkale, there is increasing awareness for probiotic products in Turkey, but there is still a considerable lack of knowledge about probiotic microorganisms and their health effects.

**Keywords:** Probiotic products, beneficial microorganisms, health benefits, consumers' perceptions.

#### GİRİŞ

2.000 yıl önce, “gıdalar ilacınız olsun” mottosu ile gıdaların insan sağlığındaki önemini savunan Hipokrat, aslında günümüz yaşam alışkanlıklarına yerleşmiş bir kavram olan “fonksiyonel gıdalar” görüşünün de yolunu açmıştır. Belki de Hipokrat bu görüşünün temellerini, “Ölüm bağırsaklarda oturur” ve “kötü sindirim tüm kötülüklerin kökenidir” hipotezine dayandırmaktaydı. Yaşlanma sürecini “Yaşlanmamız, diğer hastalıklar gibi tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır” cümlesiyle tanımlayan bir diğer bilim insanı ise Elie Metchnikoff'tur. Bugünkü modern probiyotik görüşün fikir babası olarak atfedilen Elie Metchnikoff, ‘*The Prolongation of Life; Optimistic Studies*’ adlı eserinde, diyetlerinin büyük bir bölümü fermente süt ürünlerinden oluşan Bulgar dağ köylülerinin uzun ve sağlıklı yaşamları üzerinde yaptığı gözlemlere yer vermiştir (Anukam ve Reid, 2007). Fermente süt ürünleri tüketimi sonucunda Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) bağırsakta kolonize olduğu, pH'ı düşürdüğü ve sonuç olarak da yaşlanmaya neden olan proteolitik bakterilerin gelişimlerinin engellendiği



yolunda görüş ileri süren Metchnikoff, hipotezini kanıtlamak için 1916 yılında 71 yaşında vefat edene kadar her gün ekşi süt içmiştir (Gogineri ve ark., 2013).

Aslında farklı coğrafyalarda, farklı folklorik kültürün birer parçası olarak çeşitlenen fonksiyonel gıdalar; tıbbi besinler, nutrasötikler, reçeteli besinler, terapötik besinler, süper gıdalar ve tasarım gıdalar olarak da adlandırılmaktadır. Günlük diyetin bir parçası olarak tükettiğimiz geleneksel gıdalara benzemekle beraber; kanıtlanmış metabolik veya fizyolojik etkilere sahip, fiziksel ve zihinsel sağlığın korunmasında yararlı ve kronik hastalık riskinin azaltılmasına yardımcı, aynı zamanda da temel beslenme işlevlerine katkıda bulunan gıdalardır. Fonksiyonel gıdalarda gelinen son nokta ise nutrasötikler gibi tıbbi formüllerin kullanımınıdır. İlaç olarak kabul edilmeyen nutrasötikler; sağlığın korunmasında veya tedavide etkili olduğu kabul edilen bileşeni gıdadaki miktarından çok daha yüksek miktarlarda taşıyan hap, kapsül, toz, şurup, içecek gibi formlarda hazırlanan gıdalardır. Birinci nesil fonksiyonel gıda pazarını kalsiyum veya vitamin gibi sağlık etkileri iyi tanımlanmış bileşenler ile takviye gıdalar oluştururken, günümüzde; karotenoid, diyet lifi, yağ asidi ve prebiyotikler/probiyotikler/sinbiyotik ile takviye gıdalar hâkim durumdadır. Fonksiyonel gıda pazarının % 40 gibi önemli bir bölümünü fonksiyonel süt ürünleri oluşturmaktadır. Bu segmentte düşük laktozlu veya laktozsuz, mineral, vitamin, konjuge linoleik asit (CLA), sterol/stanol ve probiyotikler/prebiyotik gibi fonksiyonel bileşenleri içeren süt ve ürünleri yer almaktadır. Kefir, ayran, koumiss gibi geleneksel süt içecekleri hariç, fonksiyonel süt içecekleri pazarının 2021 yılına kadar 13.9 milyar USD gibi bir piyasa değerine ulaşacağı tahmin edilmektedir (Turkmen ve ark., 2019).

Metchnikoff'un geleceğe yönelik öncü gözlemleriyle şekillenmeye başlayan probiyotik mikroorganizmalar görüşü geride bıraktığımız yüzyılda etki mekanizmalarını açıklayan çok sayıda bilimsel çalışma ve bu etkileri gösteren klinik bulgularla heyecan verici seviyelere ulaşmıştır. Literatür probiyotik mikroorganizmalar ile ilgili yeni verilerle zenginleşirken; gıdalarla sağlığın desteklenmesi yönünde artan tüketici eğilimleri son yirmi yılda gıda endüstrisinin ilgisini bu noktaya çekmiş ve önemli bir Ar-Ge ve pazar payı yakalamıştır. 2017 verilerine göre global sağlık, gıda ve içecek piyasasının % 71,9'unu probiyotikler, % 21.3'ünü prebiyotikler ve % 6.8'ini gıda enzimleri oluşturmaktadır. Aynı yılda probiyotik pazar tahmin edilenden % 7 daha fazla büyüyerek, yaklaşık 1,8 milyar ABD dolarının üzerinde gerçekleşmiştir. Bu pastada % 83.2'lik dilimde fonksiyonel gıdalar ve içecekler sektörü yer alırken, % 12 ve % 4.8'lik dilimlerde sırasıyla diyet katkıları ve hayvan beslemesi yer almaktadır (Anonymous 2018).

Probiyotik mikroorganizmalarla ilgili tüketici eğilimlerini belirlemeye yönelik yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre; Amerikalı tüketicilerin % 73'ü sağlıklı bir yaşamı desteklemek için probiyotikleri faydalı bulurken, katılımcıların % 66'sı probiyotikleri sindirim sistemi sağlığı ile, % 45'i ise bağışıklık sisteminin desteklenmesi ile ilişkilendirmektedir. Aynı araştırmaya katılan tüketiciler arasında düzenli olarak probiyotik tüketimi % 18, gıda alışverişlerinde probiyotik mikroorganizma içeren gıdaları tercih edenlerin oranı % 25 ve çocukları için probiyotik mikroorganizma ile desteklenmiş gıdalara bütçe ayıranların oranı % 59 olarak tespit edilmiştir (Anonymous 2015). Tüm bu reel gerçekler ışığında değerlendirildiğinde diyet takviyelerine, yiyecek ve içeceklerle artan tüketici talepleri sektörün büyümesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. 2022'de probiyotik piyasasında yıllık bileşik büyüme oranının % 7,7 ve tahmini kazancının ise 57,4 milyar dolara ulaşması öngörülmektedir (Anonymous 2018). Probiyotik pazarında en büyük paya sahip olan Asya-Pasifik ülkelerinin 2024 yılına kadar pazar payını % 7'nin üzerinde büyüteceği; piyasada ikinci sırada yer alan Kuzey Amerika ülkelerinin ise aynı sürede % 6'dan fazla büyümeye şahit olacağı öngörülmektedir. 2017 yılında Fransa, İspanya, İtalya ve Almanya'nın başı çektiği Avrupa pazarının 630 milyon ABD dolarını aştığı rapor edilmektedir. Avrupa probiyotik pazarının, Asya-Pasifik ve Kuzey Amerika pazarına göre yavaş büyüme sağlaması, Avrupa Birliği ülkelerinin sağlık açısından kabul edilebilir kanıt göstermeyen ürünler için koyduğu kesin sınırdan kaynaklanmaktadır. Bu noktada probiyotik pazar büyüme hızını belirleyen başlıca faktör 'muhtemel etkinlikler' ki; bu durum tüketicilerin probiyotik ürün markaları arasında en iyisini arama eğilimidir (Anonymous 2018). Probiyotiklerin gelecekteki vizyonunu; beyin faaliyetleri üzerindeki muhtemel etkilerini gösteren bilimsel çalışmalar, kilo yönetiminde probiyotik kullanımı ile süt ürünleri dışındaki diğer probiyotik gıdalar oluşturmaktadır, bu da tahmini pazar büyüme oranlarında muhtemel bir artışa neden olacaktır.

Dünyada fonksiyonel gıda pazarının hızla gelişen bir segmenti olan probiyotik ürünlerle ilgili Çanakkale özelinde ülkemizdeki tüketici algısını belirlemek üzere planlanan çalışmanın temel amacı i) Çanakkale il ve ilçelerinde yaşayan bireylerin probiyotik ürünler hakkında farkındalık düzeylerinin ii) probiyotik tüketim alışkanlıklarının belirlenmesidir.

## MATERYAL VE METOT

Tarama modelinin kullanıldığı bu araştırmada yaş, cinsiyet, eğitim ve gelir düzeyleri ayırt edilmeksizin Çanakkale ili ve ilçelerinde yaşayan insanların probiyotik ürünler hakkında farkındalık düzeylerinin ve tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doğru veri elde etme kolaylığının sağlanması ve bu bölgede daha önce benzer bir çalışma yapılmaması nedeni ile araştırmanın evrenini; Çanakkale il ve ilçelerinde yaşayan ve tesadüfi örnekleme yolu ile seçilen; 150'si öğrenci, 150'si sağlık kurumları çalışanları ve 199'u yerel halk olmak üzere toplam 499 kişi oluşturmaktadır. Araştırma verileri, veri toplama aracı olarak geliştirilen 31 soruluk anket formlarının katılımcılara yüz yüze anket tekniğinin uygulanmasıyla araştırmacılar tarafından toplanmıştır. Anket formu katılımcıların demografik özelliklerini; probiyotik ürünler hakkında farkındalık düzeylerini ve tüketim alışkanlıklarını belirleyen başlıca üç grupta toplanabilen sorular içermektedir.

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS istatistik (version 24, IBM, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programından faydalanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Anket katılımcılarının demografik özelliklerine Tablo 1'de yer verilmiştir. Ankete 255'i kadın (%51.1), 244'ü erkek (%48.9) olmak üzere toplam 499 kişi katılmıştır. Katılımcıların demografik özellikleri incelendiğinde %40.7'si 17-25 yaş (203 kişi), %32.4'nün 25-40 yaş (162 kişi) ve %26.9'unun ise 40 yaş ve üzeri (134 kişi) olduğu; %7.8'inin ilk veya ortaokul (39'ar kişi)' %28.9'unun lise mezunu (144 kişi) olduğu' %55.5'nin ise üniversite öğrencisi veya mezunu (277 kişi) olduğu görülmektedir. Genel tüketici profillerini belirlemek üzere katılımcılara "Markasız/etiketsiz gıda tüketir misiniz?", "Daha ucuzsa markasız/etiketsiz gıda tüketir misiniz?" ve "Tükettiğiniz gıdaların etiketinde yer alan bilgileri inceler misiniz?" soruları sorulmuş ve katılımcıların %79.6'sı (397 kişi) markasız/etiketsiz gıda tüketmeyeceğini, %24.6'sı (123 kişi) ise ancak daha ucuzsa markasız/etiketsiz gıda tüketebileceğini ifade etmiştir. Katılımcıların dikkate değer bir oranı (%71.3) gıdaların etiketinde yer alan bilgileri incelediklerini ifade etmiştir. Bu soruya evet yanıtı veren 356 kişinin 185'i kadın (%52), 171'i ise (%48.0) erkek katılımcıdır. Katılımcılara herhangi bir sağlık sorunu olup olmadığı sorulduğunda 274 katılımcı bu soruya yanıt vermiş; 79 katılımcı sindirim sistemi bozuklukları, 62 katılımcı sık hasta olma, 53 katılımcı sürekli kabızlık, 52 katılımcı laktöz intoleransı, 15 katılımcı sürekli ishal şikâyetlerini belirtirken 13 katılımcı da serum kolesterol düzeyinin yüksek olduğunu ifade etmiştir. Katılımcıların probiyotiklerin sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkilerle ilgili farkındalık düzeylerini belirlemek üzere "Probiyotikler hakkında bilginiz var mı?" diye sorulduğunda 143 katılımcı (%28.7) bilgisi olmadığını belirtirken; 167 katılımcı (%33.5) bağışıklık sistemi bozukluklarına iyi geldiğini, 98 katılımcı (%19.6) bağırsak ve mide sorunlarına iyi geldiğini, 89 katılımcı (%17.8) ise kabızlık, ishal ve şişkinlik gibi sindirim sistemi bozukluklarına iyi geldiğini belirtmiştir (Tablo 2).

Latince bir edat olan pro (için veya destek anlamında) ile Yunanca bir isim olan bios (biyotik veya yaşam anlamında) kelimelerinden türetilen probiyotik terimi, "yaşam için" veya "yaşamı destekleyen" anlamına gelmektedir. Lilly ve Stillwell'in 1965'de yaptıkları ilk tanımdan sonra probiyotik tanımı farklı araştırmacıların katkılarıyla geliştirilmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü probiyotikleri, "yeterli miktarlarda tüketildiğinde, konakta bir sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar" olarak tanımlamıştır (FAO, 2009). Probiyotiklerin mikroorganizmaların başta gastrointestinal sistem hastalıkları olmak üzere pek çok hastalığın engellenmesi ve tedavisinde ve normal bağırsak mikroflorasının oluşumunda önemli bir rol oynadığı klinik denemelerle belirlenmiştir. Özellikle çocuklarda görülen akut diyare ve antibiyotik kullanımına bağlı diyarenin tedavisinde etkin kullanım potansiyeli taşıyan probiyotik preparatları geliştirilmiştir (Uymaz, 2010). Bu çalışma sonuçları katılımcıların probiyotik ürünlerin sağlık etkileri farkındalık düzeylerinin şaşırtıcı düzeyde yüksek olduğuna işaret etmektedir.

**Tablo 1.** Katılımcıların demografik özellikleri

		Kadın		Erkek		Toplam	%
		Frekans	%	Frekans	%		
Yaş	17-25 arası	118	46.3	85	34.3	203	40.7
	25-40 arası	71	27.8	91	37.3	162	32.4
	40 ve üzeri	66	25.9	68	27.9	134	26.9
	<b>Toplam</b>	<b>255</b>	<b>100</b>	<b>244</b>	<b>100</b>	<b>499</b>	<b>100</b>
Eğitim düzeyi	İlkokul	19	7.5	20	8.2	39	7.8
	Ortaokul	15	5.9	24	9.8	39	7.8
	Lise	75	29.4	69	28.3	144	28.9
	Üniversite	146	57.3	131	53.7	277	55.5
	<b>Toplam</b>	<b>255</b>	<b>100</b>	<b>244</b>	<b>100</b>	<b>499</b>	<b>100</b>

**Tablo 2** Katılımcıların sağlık durumları ve katılımcıların probiyotiklerin sağlık üzerinde gösterdikleri olumlu etkilerle ilgili farkındalık düzeyleri

		Frekans	%
Belirtilen sağlık sorunlarınız var mı?	Sindirim sistemi bozuklukları	79	% 15.8
	Sık hasta olma	62	% 12.4
	Sürekli kabızlık	53	% 10.6
	Laktoz intoleransı	52	% 10.4
	Sürekli ishal	15	% 3.0
	Yüksek serum kolesterol düzeyi	13	% 2.6
Probiyotikler hakkında bilginiz var mı?	Bağıışıklık sistemi bozukluklarına iyi gelir	167	% 33.5
	Bağırsak ve mide sorunlarına iyi gelir	98	% 19.6
	Kabızlık, ishal ve şişkinlik gibi sindirim sistemi bozukluklarına iyi gelir	89	% 17.8
	Bilgin yok	143	% 28.7

Katılımcıların probiyotik mikroorganizmalarla ilgili bilgi düzeylerini belirlemek üzere “Probiyotik ürünlerdeki mikroorganizmaları biliyor musunuz?”, “Probiyotik ürünlerde yer alan mikroorganizmaların canlı olması gerektiğini biliyor musunuz?”, “Probiyotikler hakkında sahip olduğunuz bilgileri hangi kaynaklardan elde ettiniz?” soruları sorulmuştur. Katılımcıların %78.4’ü (391 kişi) probiyotik ürünlerde mikroorganizma bulunduğunu bilmediğini ifade ederken; bu mikroorganizmaların canlı olması gerekliliğini bilenlerin oranı ise %38.7 olarak belirlenmiştir. 157 katılımcı (%31.5) probiyotikler hakkında bildiklerini televizyon/reklamlar aracılığıyla öğrendiğini belirtirken; 108 katılımcı (%21.6) internetten, 104 (%20.8) katılımcı okuldan öğrendiğini ifade etmiştir (Tablo 3).

**Tablo 3** Katılımcıların probiyotik mikroorganizmalarla ilgili bilgi düzeyleri

		Frekans	%
Probiyotik ürünlerdeki mikroorganizmaları biliyor musunuz?	Evet	101	% 20.2
	Hayır	391	% 78.4
Probiyotik ürünlerde yer alan mikroorganizmaların canlı olması gerektiğini biliyor musunuz?	Evet	193	% 38.7
	Hayır	306	% 61.3
Probiyotikler hakkında sahip olduğunuz bilgileri hangi kaynaklardan elde ettiniz?	Televizyon/Reklamlar	157	% 31.5
	İnternet	108	% 21.6
	Okul	104	% 20.8
	Hepsi	46	% 9.2

FAO/WHO ve farklı bilim adamları tarafından yapılan probiyotik tanımında vurgulandığı gibi; probiyotik mikroorganizmaların beklenen sağlık etkisini gösterebilmesi için, bu hücrelerin canlı olması ve yeterli miktarda tüketilmesi gerekmektedir. Genel olarak, ülkeden ülkeye değişmekle birlikte, bu miktar  $10^6$  - $10^8$  kob/gr veya  $10^8$ - $10^{10}$  kob/doz olarak bildirilmektedir. Bu bağlamda ilaç veya gıda üretiminde kullanılacak olan probiyotik kültürün hem çevresel ve teknolojik süreçlere dirençli olması, hem de üretimden başlayarak son tüketim tarihine kadar canlılığını ( $> 10^6$  kob/g) devam ettirmesi gerekmektedir (Morales ve Ruiz, 2016). Çalışmada elde edilen bu veriler doğrultusunda değerlendirildiğinde anket katılımcılarının önemli bir bölümünün probiyotik ürünlerde faydalı mikroorganizmaların bulunduğunu ve bu mikroorganizmaların canlı olması gerektiğini bilmediği sonucuna ulaşılmaktadır. Bu çalışmada her ne kadar probiyotik ürünlerle ilgili farkındalık düzeyi yüksek bulunmuş olsa da fonksiyonel gıdaların probiyotik segmenti ile ilgili akademik anlamda hala önemli bir eksiklik söz konusudur.

Probiyotik ürün pazarının da araştırıldığı çalışmamızda katılımcıların probiyotik ürün tercihleri, tüketim sıklığı ve bu ürünler için yaptıkları aylık ortalama harcama tutumları belirlenmiştir (Tablo 4). Katılımcıların sadece %14.8'i (74 kişi) market reyonlarında yer alan probiyotik gıdaların hiçbirini tüketmediğini belirtirken; %12.0'si (60 kişi) ise eczanelerde satışa sunulan probiyotik kapsüllerden tükettiğini ifade etmiştir. Fonksiyonel gıdaların probiyotik segmentinin ülkemizde pazar payı bulması uzun bir geçmişe sahip olmasına rağmen, çalışmadan elde edilen veriler, probiyotik mikroorganizmaların kapsüller ve/veya tozlar şeklinde nutrasötik olarak tüketiminin görece yeni bir kavram olduğunu göstermektedir. Katılımcıların %14.8'i (74 kişi) her gün düzenli bir şekilde probiyotik ürün tükettiğini ifade ederken; katılımcıların %25.3'ü probiyotik ürünler için aylık bütçe ayıramadığını belirtmiştir.

Katılımcıların cinsiyeti, yaşı, eğitim durumları ile probiyotik ürünlerin tüketiminin gerekliliği hakkındaki düşünceleri ile bu ürünler için yaptıkları ortalama harcamaları arasındaki ilişki hem korelasyon analiziyle hem de student t-testi ile değerlendirilmiş olup sonuçlara Tablo 5 ve Tablo 6'da yer verilmiştir. Katılımcıların yaş ile probiyotik ürün tüketiminin gerektiğini düşünenler ve probiyotik ürünler için harcama yapanlar arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Anket katılımcılarının yaşı arttıkça probiyotik ürünlere harcamalarında da bir artış gözlemlenmiştir. Benzer şekilde katılımcıların eğitim düzeyleri ve aylık harcama tutumları arasındaki ilişki anlamlı ( $P<0.05$ ) bulunmuş ve aralarında pozitif yönde çok kuvvetli bir korelasyon belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada katılımcıların eğitim düzeyleri ile probiyotik ürün tüketim gerekliliği olgusu arasında belirlenen negatif ilişki, Hacıoğlu ve Kurt (2012) tarafından fonksiyonel gıdalara yönelik farkındalığın belirlendiği bir çalışmada da gösterilmiş; yüksek eğitim düzeyine sahip bireylerin bile fonksiyonel gıda terimini daha önce duymadıklarını belirtmiştir.

**Tablo 4** Katılımcıların probiyotik ürün tercihleri, tüketim sıklığı ve ortalama aylık harcama tutumları

		Frekans	%
Marketlerde satışa sunulan probiyotik gıdalardan hangisini/hangilerini satın alıyorsunuz?	Kefir	202	%40.5
	Probiyotik yoğurt	59	%11.8
	Probiyotik süt	13	%2.6
	Bebek maması	19	%3.8
	Hepsi	128	%25.7
	Hiçbiri	74	%14.8
Eczanelerde satışa sunulan probiyotik kapsüllerden satın alıyor musunuz?	Evet	60	%12.0
	Hayır	434	%87.0
Probiyotik ürünleri ne sıklıkta tüketiyorsunuz?	Her gün	74	%14.8
	Haftada 2-3 gün	304	%60.9
	Hiç tüketmiyorum	117	%23.4
Probiyotik ürünler için ortalama aylık harcamanız ne kadar?	Hiç	126	%25.3
	10-20 TL	104	%20.8
	20-30 TL	103	%20.6
	30-40 TL	68	%13.6
	40 TL ve üzeri	93	%18.6

**Tablo 5** Korelasyon tablosu

	Cinsiyet	Yaş	Eğitim düzeyi	Probiyotik ürünlerin tüketiminin gerekliliği	Probiyotik ürünler için yapılan ortalama harcama
Cinsiyet	1				
Yaş	0.083	1			
Eğitim düzeyi	-0.049	-0.293	1		
Probiyotik ürünlerin tüketiminin gerekliliği	0.109	0.0138	-0.208	1	
Probiyotik ürünler için yapılan ortalama harcama	-0.059	0.094	0.242	-0.193	1

**Tablo 6** Student t-testi tablosu

	*Cinsiyet=1		*Cinsiyet=2		t-testi
	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma	
Probiyotik ürün tüketim gerekliliği	1.209	±0.408	1.305	±0.462	-
Probiyotik ürünler için yapılan ortalama harcama	2.877	±1.421	2.705	±1.464	2.447** 1.326

\*Cinsiyet=1: Kadın; Cinsiyet=2: Erkek

Katılımcıların cinsiyeti ile probiyotik tüketiminin gerekliliği ve harcama tutumları üzerine verdikleri cevaplar student t-testi ile değerlendirildiğinde; kadınların probiyotikler için yaptıkları aylık harcamanın ortalaması erkeklerden daha yüksek bulunmuştur. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamsızdır. T-testine göre dikkat çeken bir sonuç ise probiyotik ürün tüketiminin gerekliliğini düşünen erkek katılımcı ortalamasının kadın katılımcı ortalamasından daha fazla olmasıdır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu durum korelasyon tablosunda cinsiyet ile probiyotik tüketiminin gerekli olduğunu düşünenler arasındaki pozitif ilişki ile gösterilmiştir. Erkek katılımcılarda probiyotik tüketiminin gerekli olduğuna dair düşünce yüksek bulunmasına rağmen, ortalama aylık harcama düzeylerinin düşük kalması bir çelişki gibi görülebilir. Çanakkale bölgesinde geleneksel gıdaların yoğun tüketilme eğilimiyle açıklanabilir. Bu durum ülkemiz tüketicilerinin sosyo-ekonomik yapıları baz alınarak geleneksel gıdaları tüketme alışkanlıkları ile probiyotik ürünlerin fayda boyutu göz önünde bulundurularak sonraki çalışmalarla derinleştirilmelidir.

## SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde Çanakkale ili ve ilçelerinde yaşayan bireylerin probiyotik ürünlere karşı farkındalık düzeyinin, özellikle televizyon ve internet reklamları gibi kaynaklardan dolayı, yüksek olduğu söylenebilir ancak; fonksiyonel gıdaların bu segmenti ile ilgili akademik anlamda hala önemli bilgi eksikliğinin söz konusu olduğu düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Yurtsev UYMAZ, Melek SÜNNETÇİ, Esra BERBEROĞLU, Ezgi İŞBİLEN ve Ayşenur GÖÇ'e teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

Anonymous 2015. Web sitesi: <https://www.slideshare.net/DuPont/probiotics-infographics>, Erişim tarihi 03.03.2019.

Anonymous 2018. Web sitesi: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/probiotics-market>, Erişim tarihi 03.03.2019.

Anukam K, Reid G 2007. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. In: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed: A. Mendez-Villas, Formatex, pp: 466-474.

- FAO 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the evaluation of probiotics in foods. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Gogineri VK, Morrow LE, Gregory PJ, Maleskar MA 2013. Probiotics: History and Evolution. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 1(2): 1-7.
- Hacıoğlu G, Kurt G 2012. Tüketicilerin fonksiyonel gıdalara yönelik farkındalığı, kabulü ve tutumları: İzmir ili örneği. *Business and Economics Research Journal*, 3(1), 161-171.
- Morales ME, Ruiz MA 2016. Microencapsulation of prebiotic cells: Applications in nutraceutic and food industry. In: *Nutraceuticals*, Ed: Grumezescu A, Academic press, pp: 627-657.
- Türkmen, N., Akal, C., Barbaros Özer, B. (2019). Probiotic dairy-based beverages: A review. *Journal of Functional Foods*, 53, 62-75.
- Uymaz B 2010. Probiyotikler ve kullanım alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104.

## Struvite precipitation assessment in the presence of methionine and serine

Sevgi Polat\*, Perviz Sayan

Marmara University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department, Istanbul, TURKEY.

\*Corresponding author e-mail: sevgi.polat@marmara.edu.tr

### Abstract

Struvite (ammonium magnesium phosphate) is a member of the hydrated phosphates family and it contains magnesium, ammonium, and phosphate. Struvite precipitation has become an interested subject from many different aspects especially in medical applications as kidney stones. Therefore, the structure, morphology, functional group, and particle size of the struvite crystals were evaluated in this study. The experiments were conducted in the absence and the presence of the additives. As the additives, methionine and serine were selected. The struvite crystals were characterized through scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and particle size analysis in the absence and then the presence of methionine and serine amino acids. The results showed that both additives exerted significant effects on struvite precipitation.

**Keywords:** Struvite, precipitation, additive, morphology

### INTRODUCTION

The formation of urinary calculi is a serious problem in all societies throughout the world (Chauhan and Joshi, 2008). A large number of people are suffering from urinary stone problem all over the world. Not only the humans but animals and birds also suffer from the urinary stone problem (Chauhan et al., 2009). Majority of the calculi are composed of calcium salts, oxalates and phosphates. Among these, ammonium magnesium phosphate, struvite, is known as infection stone or urase stone (Jayaramaiah et al., 2013). In recent years, many studies on crystallization and morphology of struvite have been investigated by different researchers, and they have pointed out that many natural modulators have a stimulatory or inhibitory influence on the crystallization and retention of stones in body fluids. On the other hand, to prevent damage of the epithelium of the internal renal walls of body, struvite morphology should be control. Morphological variations of struvite crystals may depend on the physicochemical factors such as the pH, supersaturation ratio, temperature, and mixing, and also the existence of foreign ions, modulators or inhibitors (Manzoor et al., 2018). Structure, morphology and physical properties of the stone influence greatly on the diagnosis and treatment planning. Struvite stones may grow rapidly over a period of weeks to months and, if not adequately treated, can develop into a large stone that fills the entire intra-renal collecting system. Therefore, it is very much necessary to study the morphology change and growth-inhibition of struvite crystals (Prywer and Torzewska, 2010). Herein, amino acids such as methionine and serine were chosen as model biological additives to examine their effects on the growth and morphological development of struvite.

### MATERIALS AND METHODS

Struvite crystallization was performed in a batch system by using analytical grade magnesium chloride hexahydrate ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) and ammonium dihydrogen phosphate ( $NH_4H_2PO_4$ ) in the absence and the presence of different amino acids used as the additives. The experiments were conducted at constant additive concentrations of 100 and 250 ppm.

The crystallization experiments were conducted in a double-jacketed glass crystallizer with 1L volume.  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  and  $NH_4H_2PO_4$  solutions with equal concentrations were fed to the crystallizer via peristaltic pumps. The amino acids used as additives were added to the crystallizer using a syringe pump. The temperature of the crystallizer was kept constant at 37 °C by means of a thermostat. During the experiment, the pH value of the suspension was kept at 7.4 pH by using dilute sodium hydroxide solution. After completing the reaction, the struvite crystals were separated from the mother liquor by filtration and then washed with water before being dried. The prepared crystals were characterized with various characterization techniques.

The structure of the crystals was determined by Bruker D2 Phaser tabletop diffractometer. SEM images of the end-products were recorded by using Zeiss EVO LS 10 scanning electron microscope. The FTIR spectra of

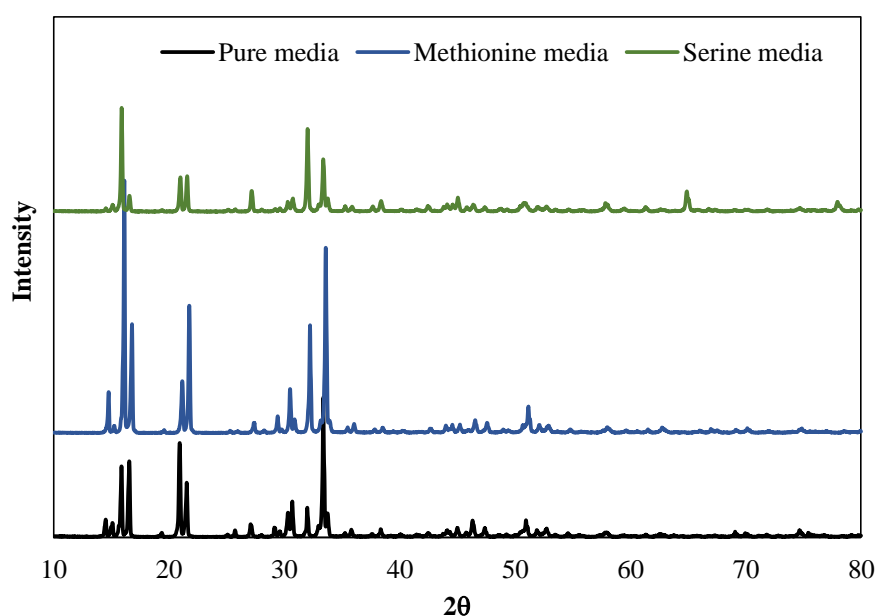
the crystals were obtained in the transmission mode between 4000 and 600  $\text{cm}^{-1}$  using a Shimadzu IR Affinity-1 Fourier Transform Infrared Spectrometer.

## RESULTS and DISCUSSION

### XRD Analysis

Figure 1 shows the XRD profiles of the struvite crystals obtained in the absence and the presence of the additives. The main peaks for the crystals obtained in pure media were determined at  $2\theta=14.58$ ,  $20.88$ , and  $33.30^\circ$ , which were agreement with the literature (Chauhan and Joshi, 2013). These peaks were also indicative of the orthorhombic structure of the struvite. When examining the XRD profiles for struvite precipitated in the presence of methionine and serine, the characteristic peaks were similar to the peaks obtained in pure media. Yet, it was observed that the intensities of XRD peaks changed with the presence of the amino acids in the media.

The a, b and c unit cell parameters were 6.957 Å, 6.138 Å and 11.220 Å for pure media, and these values were determined to be 6.974 Å, 6.145 Å and 11.227 Å; 6.956 Å, 6.143 Å and 11.267 Å for methionine and serine media, respectively. This result shows that the peak was slightly shifted due to the adsorption of the additives on the crystal surface.

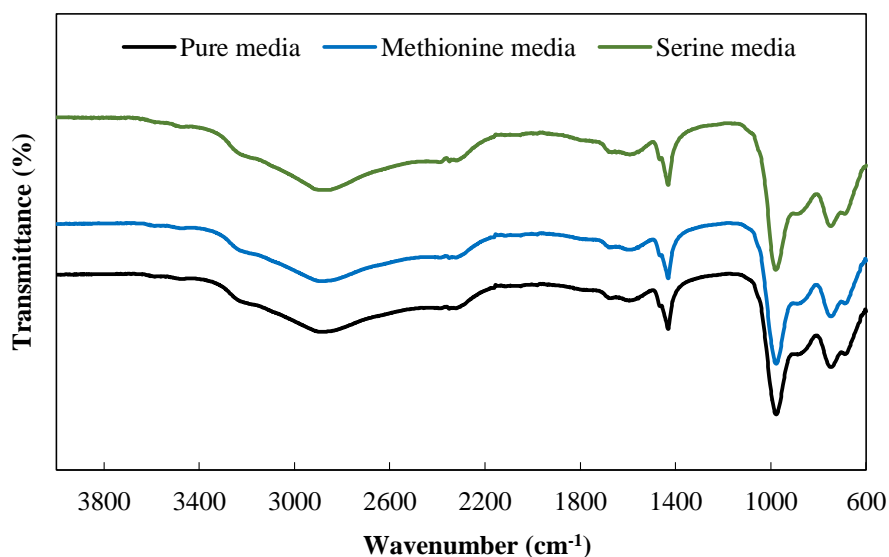


**Figure 1.** XRD profiles of struvite precipitated with and without additives.

### FTIR Analysis

FTIR spectra for the crystals obtained from different amino acids media are shown in Figure 2. The broad peak between 3500 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  was due to the stretching vibrations of H–O–H of water molecules. The peaks around 2980 and 980  $\text{cm}^{-1}$  were corresponded to the N–H and P–O stretching vibrations, respectively. The peak at  $\sim 1435$   $\text{cm}^{-1}$  can be ascribed to N–H stretching vibrations. The FTIR spectrum was found to be consistent with the literature (Foletto et al., 2013). The FTIR analysis results pointed out that the amino acids adsorbed to the surface of the crystals with the weak Van der Waals bonds, physically.

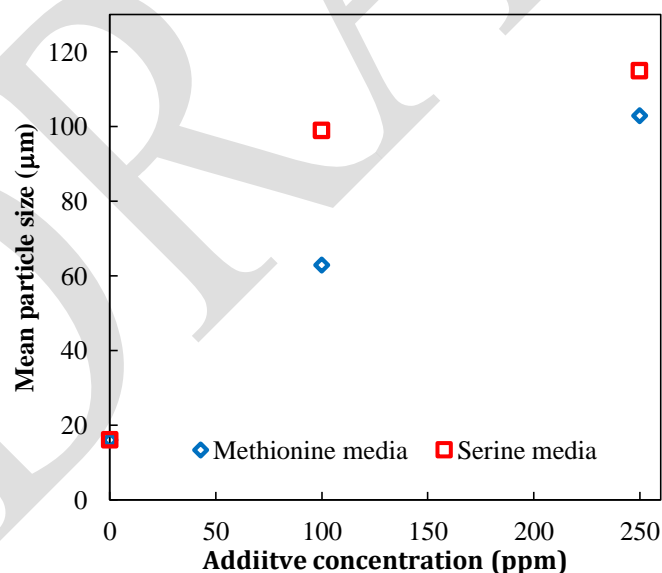




**Figure 2.** FTIR spectra of struvite precipitated with and without additives.

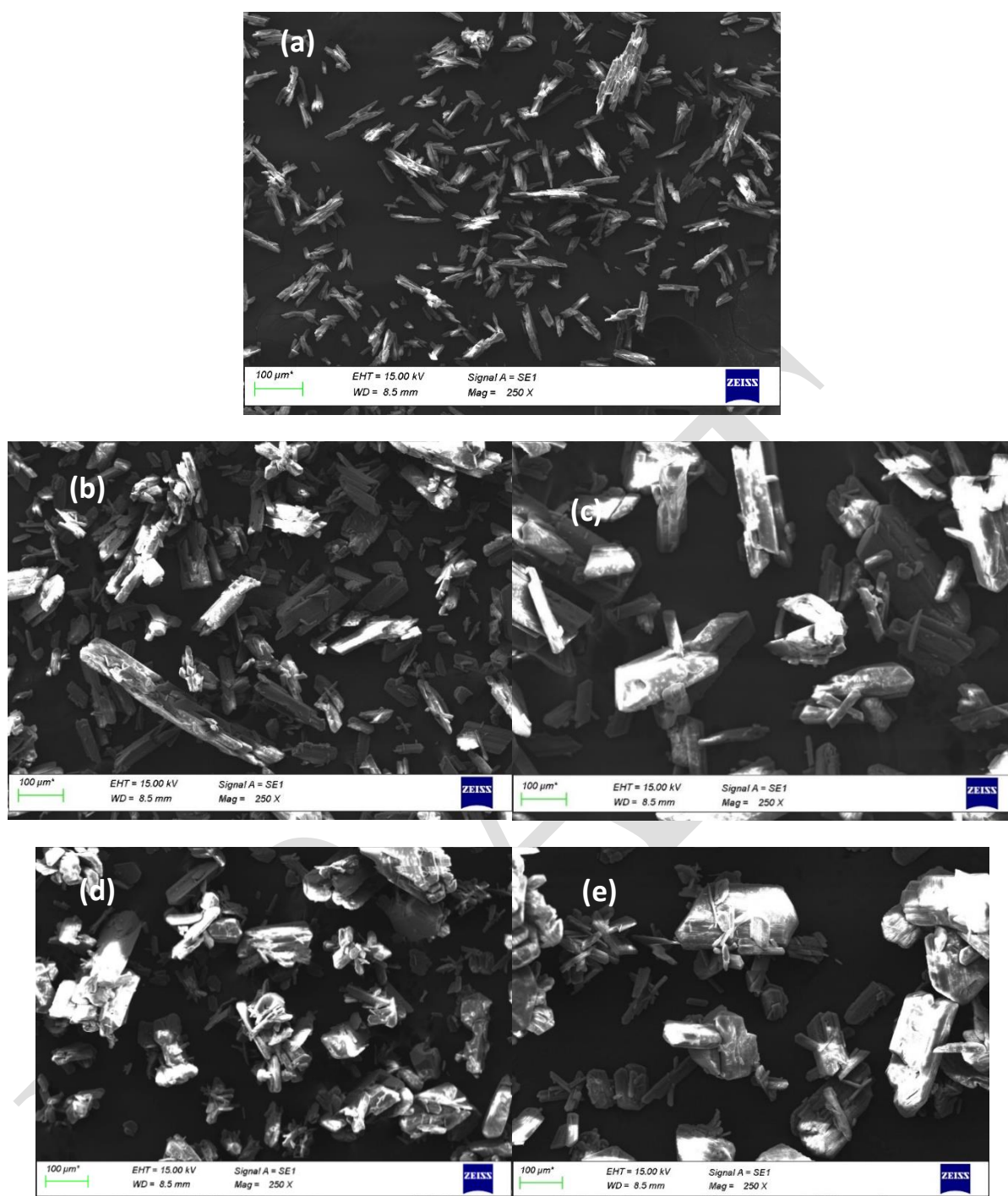
### SEM Analysis

The SEM images of struvite precipitated in pure and non-pure media are given in Figure 4. The main outcome from Figure 4a was that the crystals precipitated in vitro conditions were in rod-like form with homogenous-looking and regular form agreement with the literature (Le Corre et al., 2005). The mean particle size of the crystals was determined to be 16  $\mu\text{m}$  (Figure 3). The struvite precipitated in pure media had the tendency of growing on each other and their aspect ratio was 0.176. The crystals were in the characteristics of being broken with the effect of hydrodynamic conditions of the medium.



**Figure 3.** The value of mean particle size of the struvite precipitated with and without additives.

SEM images taken for determining the effect of methionine and its concentration on the morphology of struvite crystals are given in Figure 4b and 4c, respectively.



**Figure 4.** SEM images of struvite crystals obtained in pure media (a), in the presence of 100 ppm (b) and 500 ppm (c) methionine and in the presence of 100 ppm (d) and 500 ppm (e) serine.

The using of methionine as the additive caused a significant change on the surface morphology of the struvite. The crystals produced in the presence of 100 ppm methionine grew considerably compared to the pure media. The mean particle size of the crystals and their aspect ratio were 63 µm and 0.38, respectively. Additionally, the crystals were broken intensely and they created crystals without any distinct shape by acting like an independent crystal. The struvite had the tendency of growing on each other similar to the pure media and agglomeration tendency was observed. It was also seen that the sizes of crystals increased, they got more thickened and gained a prismatic form with increase in the concentration. While the mean particle size of the crystals for 250 ppm methionine concentration was measured to be 103 µm, their aspect ratios were 0.4. It was also pointed out that an active change occurred in the morphology with increase in concentration. The change in methionine concentration resulted in marked deformations and defects on the surface. The additive used caused the different sized hollow formation with a rough surface morphology. These hollows took place along the crystal and their diameters did not show a regular homogeneity. The hollow seen at the center of crystals

reduced the strength of crystals, thus, it caused crystals to be broken with the effect of hydrodynamic conditions of the media.

To figure out the morphological changes occurring on the struvite in serine media, SEM images are shown in Figure 4d and 4e, respectively. The difference of the surface morphology of the pure media and additive media can be clearly observed from the SEM images. The crystals precipitated in the presence of 100 ppm serine had the tendency of agglomeration intensely. While the main morphology of the crystals formed in rod-like crystals, there was a great quantity of crystal deformation and the crystals formed did not have a distinct shape. This was witnessed more specifically in higher serine concentration. Moreover, the struvite had the tendency of growing in the form of layers with disorganized and rough surface. The crystals were broken easily with hydrodynamic effect due to their weak form, and the fragments broken from the main crystal created their own growth form by acting as if they were independent crystals. The mean particle size of the crystals were 99  $\mu\text{m}$  and 115  $\mu\text{m}$  for 100 and 250 ppm concentrations, respectively.

## CONCLUSION

The effects of the struvite produced in pure media and in the presence of methionine and serine media were given in this study. The structure and surface morphology of the struvite were determined. XRD results showed that the struvite crystals prepared were in the orthorhombic structure. SEM analysis illustrated that significant changes in the struvite morphology were detected in methionine and serine media. When compared to the pure media, the mean particle size of the crystals was increased from 16  $\mu\text{m}$  to 103  $\mu\text{m}$  and 115  $\mu\text{m}$  in the presence of methionine and serine media, respectively. The FTIR results indicated that the additives were adsorbed on the crystal surface, physically.

## Acknowledgements

This work was supported by the Marmara University Scientific Research Projects Commission under the funding FEN-A-110718-0396.

## REFERENCES

- Chauhan CK, Joshi MJ 2008. Growth inhibition of Struvite crystals in the presence of juice of *Citrus medica* Linn. Urol. Res., 36: 265–273.
- Chauhan CH, Joshi, MJ 2013. In vitro crystallization, characterization and growth-inhibition study of urinary type struvite crystals. J. Cryst. Growth, 362: 330–337.
- Chauhan CK, Joshi MJ, Vaidya ADB 2009. Growth inhibition of Struvite crystals in the presence of herbal extract *Commiphora wightii*. J. Mater. Sci: Mater Med., 20: 85-92.
- Foletto, EL, dos Santos, WRB, Mazutti, MA, Jahn, SL, Gündel, A 2013. Production of Struvite from Beverage Waste as Phosphorous Source. Mat. Res., 16: 242-245.
- Jayaramaiah KK, Anturlikar SD, Viswanatha GL, Agadihiremath T, Patki, PS, Rafiq M 2013. Cystone, a well-known herbal formulation, inhibits struvite crystal growth formation in single diffusion gel growth technique. J. Exp. Integr. Med., 1: 51-55.
- Le Corre KS, Valsami-Jones E, Hobbs P, Parsons SA 2005. Impact of Calcium on Struvite Crystal Size, Shape and Purity. J. Cryst. Growth, 283: 514-522.
- Manzoor MAP, Singh B, Agrawal AK, Arun AB, Mujeeburahiman M, Rekha, PD 2018. Morphological and microtomographic study on evolution of struvite in synthetic urine infected with bacteria and investigation of its pathological biomineralization. PLoS ONE, 13(8): e0202306.
- Prywer J, Torzewska A 2010. Biomineralization of struvite crystals by *Proteus mirabilis* from artificial urine and their mesoscopic structure. Cryst. Res. Technol., 45(12): 1283 – 1289.

## Yaygın olarak kullanılmayan bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi

Metin Konuş, Can Yılmaz, Doğan Çetin\*

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van

\*Sorumlu yazar e-mail: dogan.194@hotmail.com

### Özet

Sirke, mayalanabilir farklı hammaddeler kullanılarak farklı yöntemlerle elde edilen bir fermantasyon ürünüdür. Gıdalarda koruyucu ve aroma verici madde olarak kullanılan sirke ayrıca dezenfektan olarakta kullanılmaktadır. Sirke eski zamanlardan bu yana hastalıkların tedavilerinde de kullanılan geleneksel bir üründür. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasını önleyen ya da radikalleri süpürerek hücrenin hasar görmesini engelleyen ve genellikle yapısında fenolik grup taşıyan moleküllere denmektedir. Bu çalışmada ticari olarak satılan alıç, enginar, ve karadut sirkesi olmak üzere üç sirkenin antioksidan özellikleri DPPH ve Galvinoxil antioksidan kapasite yöntemleriyle belirlendi. Kullanılan her iki antioksidan yöntemi de serbest radikal ile antioksidan maddenin tepkimesi sonucu meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Sonuçlar standart madde olarak kullanılan askorbik asit (DPPH yöntemi için) ve troloks (Galvinoxil yöntemi için) ile karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda antioksidan kapasite Galvinoxil yöntemi için alıç sirkesi > enginar sirkesi > karadut sirkesi ve DPPH yöntemi için alıç sirkesi > karadut sirkesi > enginar sirkesi olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar, Antioksidan kapasite, Serbest radikaller, Sirke

### Abstract

Vinegar is a fermentation product obtained by different methods using different fermentable materials. Vinegar, which is used as a preservative and flavoring agent in foods, is also used as a disinfectant. Vinegar is a traditional product used in the treatment of diseases since ancient times. Antioxidants are known as molecules which prevent the formation of free radicals or prevent the damage of the cell by sweeping the radicals and generally carry the phenolic group in the structure. In this study, antioxidant properties of three vinegar, commercially sold hawthorn, artichoke, and black mulberry vinegar, were determined by DPPH and Galvinoxil antioxidant capacity methods. Both antioxidant methods used are based on the principle of spectrophotometric measurement of the color change resulting from the reaction of the free radical and the antioxidant. The results were compared with ascorbic acid (for DPPH method) and trolox (for the Galvinoxil method), which were used as standard substances. As a result of the study antioxidant capacity for Galvinoxil method hawthorn vinegar > artichoke vinegar > black mulberry vinegar and for DPPH method hawthorn vinegar > black mulberry vinegar > artichoke vinegar was found as.

**Keywords:** Antioxidants, Antioxidant capacity, Free radicals, Vinegar

### GİRİŞ

Serbest radikaller son yörüngelerinde eşlenmemiş elektronlara sahip olduklarından yüksek oranda reaktiftirler (Sohal, 1993). Serbest radikaller eşlenmemiş elektronlarından dolayı kararsız moleküllerdir ve kararlı hale geçmek için diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunurlar. Böylece organizmada indirgeyici ya da yükseltgeyici rol alabilirler (Çaylak, 2011). Bu moleküller istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına neden olarak organizmada protein, lipit ve nükleik asit gibi moleküllere zarar verirler. (Memişoğulları, 2005). Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerini engelleyen moleküllerdir. Antioksidan moleküller vücut tarafından üretilebilir yada gıdalar aracılığıyla vücuda alınabilmektedir (Yavaşer, 2011).

Sirke mayalanabilir karbon kaynağına sahip farklı hammaddelerden elde edilebilen bir fermantasyon ürünüdür (Öztürk ve ark., 2009). Eskiden beri dünya uygarlıkları tarafından kullanılan sirke birçok işleve sahiptir. Mutfaklarda tatlandırma ve dezenfekte amacıyla kullanılmakla birlikte doktorlar tarafından tedavi amaçlı da kullanılmıştır ( Altunbağ ve Zincir, 2018).

Sirke içerisinde barındırdığı çeşitli fenolik bileşikler, aminoasitler, vitaminler, organik asitler ve melanoidinler sayesinde antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik ve antikarsinojenik özellikleri ile sağlık üzerinde birçok etkiye sahiptir (Şengün ve Kılıç, 2018).

Bu çalışmada bazı ticari sirke çeşitlerinin antioksidan kapasiteleri DPPH ve Galvinoxil metotlarıyla belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

Blois (1958)'un DPPH yöntemi modifiye edilerek sirkelerin radikal süpürme kapasiteleri belirlendi. DPPH, kahverengi şişeler içerisinde konsantrasyonu 400 µM olacak şekilde saf etanol ile çözdürüldü. Tamamen çözünmesi için DPPH ultrasonikatör içerisinde 30 dakika bekletildi. Test edilen sirkeler etanol ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyon hazırlandı. Standart olarak askorbik asit kullanıldı. Her konsantrasyon ve kör (blank) için üçer örnek hazırlandı. Her örnek 100 µM DPPH içeren ortamda 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra UV/VIS spektrofotometrede 517 nm'de referansa (etanol) karşı okundu. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. Tüm ölçümler üçer tekrar olarak gerçekleştirildi. Radikal yakalama aktivitesi (% RSA) aşağıdaki formülde belirtildiği gibi hesaplanarak askorbik asit ile karşılaştırıldı.

$$\% \text{ RSA} = ((\text{KörAbs} - \text{ÖrnekAbs}) / \text{KörAbs}) \times 100$$

### Galvinoksil Yöntemi

Shi ve Niki (1998) galvinoksil metodu optimize edilerek uygulandı. Bu yöntemde 160 µM olacak şekilde galvinoksil solüsyonu etanol ile hazırlandı. Test edilen sirkeler ve standart olarak kullanılan troloks saf etanolde çözülerek beş farklı konsantrasyon olacak şekilde saf etanol ile seyreltmeler yapıldı. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı. Her tüpe farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış maddelerden eklenerek 8 µM galvinoksil çözeltisi içinde 20 dakika karanlık ortamda inkübasyona alındı ve spektrofotometrede 428 nm'de referansa (etanol) karşı okuma yapıldı. Tüm ölçümler üç tekrar olarak gerçekleştirildi. % Radikal yakalama aktivitesi DPPH yönteminde kullanılan formül ile hesaplanarak örneklerin antioksidan potansiyelleri troloks ile karşılaştırıldı.

## SONUÇ

Tablo 1'de DPPH yöntemi kullanılarak test edilen sirke örneklerinin radikal süpürme aktiviteleri (%RSA) görülmektedir. Seyreltme oranı arttıkça çözeltideki madde miktarı azalacağından dolayı seyreltme oranı arttıkça antioksidan aktivite artacaktır. Alıç sirkesinin 80,64 kat seyreltilmiş hali, enginar sirkesinin 25,92 kat seyreltilmiş hali ve karadut sirkesinin 26,57 kat seyreltilmiş hali DPPH radikalının %50'sini inhibe ederken, 6,21 µg/ml askorbik asit (C vitamini) benzer etkiyi gösterdi. Buna göre test edilen sirkelerin antioksidan kapasiteleri alıç sirkesi > karadut sirkesi > enginar sirkesi şeklindedir.

**Tablo 4.** Farklı konsantrasyonlardaki sirkelerin DPPH radikal süpürme aktiviteleri

Test Edilen Sirke	Seyreltme Faktörü*	%RSA**
Alıç Sirkesi	533,33	10,14
	266,67	17,66
	133,33	30,17
	66,67	52,04
	33,33	79,81
Enginar Sirkesi	533,33	5,15
	266,67	15,05
	133,33	24,25
	66,67	41,84
	33,33	71,72
Karadut Sirkesi	355,52	5,54
	177,76	8,76
	88,88	17,71
	44,44	32,38
	22,22	58,49

% RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi  
\*: Ticari olarak satılan ürünün seyreltme oranı  
\*\*: Tablodaki değerler üç farklı deneme sonucunun ortalamasıdır.

Tablo 2'de galvinoksil yöntemi kullanılarak test edilen sirke örneklerinin radikal süpürme aktiviteleri görülmektedir. Radikal süpürme aktiviteleri sabit tutulduğunda seyreltme oranı arttıkça antioksidan kapasite artacaktır. Sonuçlara bakıldığında alıç sirkesinin 204 kat seyreltilmiş hali, enginar sirkesinin 75,76 kat seyreltilmiş hali ve karadut sirkesinin 43,17 kat seyreltilmiş hali Galvinoksil radikalının %50'sini inhibe

ederken, 0,4 µg/ml troloks (E vitamini analogu) benzer etkiyi gösterdiği görülmektedir. Buna göre örneklerin antioksidan kapasiteleri DPPH yönteminde olduğu gibi alıç sirkesi > enginar sirkesi > karadut sirkesi olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.** Farklı konsantrasyonlardaki sirkelerin galvinoksil radikali süpürme aktiviteleri

Test Edilen Sirke	Seyreltme Faktörü*	%RSA**
Alıç Sirkesi	2285,71	7,62
	1142,86	15,18
	571,43	24,19
	285,71	40,76
	142,86	63,18
Enginar Sirkesi	1122,81	3,37
	561,40	7,69
	280,70	17,16
	140,35	31,10
	70,17	51,62
Karadut Sirkesi	561,40	6,52
	280,70	13,42
	140,35	22,95
	70,17	37,24
	35,09	56,98

% RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi  
\*: Ticari olarak satılan ürünün seyreltme oranı  
\*\*: Tablodaki değerler üç farklı deneme sonucunun ortalamasıdır.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada DPPH ve Galvinoksil yöntemleriyle ticari olarak satılan alıç, enginar ve kuşburnu sirkelerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar DPPH yöntemi için askorbik asitle (C vitamini), Galvinoksil yöntemi için troloks ile (E vitamini analogu) karşılaştırıldı. Çalışmanın sonucunda antioksidan kapasite DPPH yöntemi alıç sirkesi > karadut sirkesi > enginar sirkesi ve Galvinoksil yönteminde alıç sirkesi > enginar sirkesi > karadut sirkesi olarak bulunmuştur.

## KAYNAKLAR

- Altunbağ, E., & Zencir, E. (2018). Türk Ve Akdeniz Yemeklerinde Sirke Kullanımı. *Journal Of Gastronomy, Hospitality And Travel*, 1(2), 45-54.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617): 1199.
- Çaylak, E. 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
- Öztürk, A., Özdemir, Y., & Göksel, Z. (2009). Elma Sirkesi Ve Teröpatik Etkileri. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, (1), 155-158.
- Shi, H., Niki, E. 1998. Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. *Lipids*, 33 (4): 365.
- Sohal, R. S. 1993. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clinical and Experimental Research*, 5 (1): 3-17.
- Şengün, İ. Y., & Kılıç, G. (2018). Dut Sirkesinin Mikrobiyolojik, Fiziksel, Kimyasal, Antiradikal ve Antimikrobiyal Özellikleri. *Akademik Gıda*, 16(2), 168-175.
- Yavaşar, R. 2011. *Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi) Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Aydın, Türkiye.

## Hümik asidin yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*) ve iğde (*Elaeagnus angustifolia*) fidanlarının kök boğazı çapı ve fidan boyuna etkileri

Bülent Toprak<sup>1\*</sup>, Oktay Yıldız<sup>2</sup>, Murat Sargıncı<sup>2</sup>, Bilal Çetin<sup>2</sup>, Burçin Soysaldı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Ormancılık Meslek Yüksekokulu, Ormancılık Bölümü, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Düzce, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: bulenttoprak@duzce.edu.tr

### Özet

Türkiye’de kurak sahalarda gerçekleştirilen ağaçlandırma çalışmalarının başarısı oldukça düşüktür. Kurak sahalarda fidanların tutma oranlarının düşük olması ve tutan fidanların da yavaş büyümesi maliyetleri arttırmaktadır. Kurak sahalardaki ağaçlandırma başarısını arttırmada kaliteli fidan kullanımı önemlidir. Bu sebeple çalışmanın amacı İç Anadolu’daki ağaçlandırma çalışmalarında kullanılacak kaliteli fidan üretimine katkı sağlamaktır. Çalışmada humik asit, Yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*) ve iğde (*Elaeagnus angustifolia*) fidanlarının tohumlarına uygulanmıştır. Kontrol fidanlarına göre humik asit uygulanan akasya fidanları %21 daha kalın çapa ve iğde fidanları ise %38 daha uzun boya sahip olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Hümik asit, yalancı akasya, iğde

### Effects of humic acid on the root collar diameter and shoot height of Black locust (*Robinia pseudoacacia*) and Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*) seedlings

### Abstract

Afforestation practices in arid and semi-arid lands have been resulted limited success so far. Low survival rates and slow growth of surviving seedlings increases the cost of afforestation efforts. It is important to use quality seedlings to increase the success of afforestation in arid areas. Thus, the aim of the study is to contribute to the production of high-quality seedlings that can be used in afforestation in Central Anatolia. In this study, humic acid was treated to the seeds of Black locust (*Robinia pseudoacacia*) and Russian olive (*Elaeagnus angustifolia*). Seedling diameter on humic acid treated acacia seedlings were 21 % larger than that of control seedlings. Shoot height of humic acid treated Russian olive seedlings were 38 % taller than that of control seedlings.

**Keywords:** Humic acid, Black locust, Russian olive

### GİRİŞ

Türkiye’de ekolojik, sosyal ve teknik açıdan ağaçlandırmaya uygun 5,25 milyon hektar potansiyel ağaçlandırma sahası var olup, mevcut ağaçlandırma sahalарının büyük bir bölümünde vejetasyon döneminde su açığı ortaya çıkmaktadır. Kurak sahalarda başta su stresi olmak üzere başarısızlığı oluşturan diğer stres koşullarına karşı koyabilecek kaliteli fidan yetiştirilmesi kurak ve yarı kurak alanlardaki başarının artırılmasında önemlidir.

Hümik asit toprağın su tutma kapasitesini, anyon ve katyon değişimini artırması, toprak tanecikleri arasında gevşeme sağlaması ve toprak sıcaklığını dengelemesi ile bitki gelişimini desteklemektedir (Stevenson, 1994). Hümik asit, susuzluk, tuzluluk ve bazı toksik elementlerin neden olduğu stres faktörlerine karşı kullanılmaktadır (Akıncı, 2017). Humik asitlerin uygun olmayan sıcaklık, tuzluluk, pH gibi abiyotik koşullarda strese karşı bitkilerin direnç göstermesini sağlamaktadır (Kulikova ve ark., 2005; Xudan, 1986). Bunun yanı sıra hümik asitler, katyon değişim kapasitesini (KDK) ve toprağın verimliliğini arttırabilmektedir. İç Anadolu’nun pek çok yerinde olduğu gibi yüksek pH değerindeki topraklarda kalsiyumla kolayca bileşik yapıp iyon formundan çıkan fosfor gibi besinlerin şelat oluşumuyla alımının artmasını sağlamaktadır (Akıncı, 2011). Türkiye’de kurak ve yarı kurak alanlarda yapılan erozyon kontrol çalışmaları çok riskli olması nedeniyle doğru tür seçimi önem arz etmektedir. Tür belirlenirken yetiştirme yeri özellikleri dikkate alınmalıdır. Türün adaptasyon özelliğinin yüksek olması ile birlikte toprak özelliklerini iyileştirici ve ıslah edici nitelikte olması gerekmektedir (Yüksek ark., 2007). Yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*) ve iğde (*Elaeagnus angustifolia*) kurak sahalarda en çok kullanılan yapraklı türler arasında olup kurak taban arazilerde iyi gelişim göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı İç Anadolu'daki ağaçlandırma çalışmalarında kullanılacak kaliteli fidan üretimine katkı sağlamaktır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada soğuk ve kuraklığa dayanıklı oldukları için karasal bölgelerde yetişebilen Yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia*) ve iğde (*Elaeagnus angustifolia*) türleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan Yalancı akasya tohumları Isparta-Davraz, iğde tohumları ise Konya-Ereğli orijindir.

Fidanların yetiştirildiği harç % 70 toprak + % 10 perlit + % 20 torf toprak karışımından oluşmuştur. Tohumların yetiştirildiği harç ortamında yer alan mikroorganizmaların etkinliğini ortamdaki kaldırmak için yetiştirme ortamına 120 °C'de 2 atmosfer basınçta 2 saat boyunca otoklavda sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

Çalışmada bir kilogram tohuma 1.5 gr K-Humat uygulanarak tohum ekimleri yapılmıştır. K-Humat ürünü toplam %80 hümitik+fulvik asit, toplam % 25 organik madde, %10 potasyum oksit ve %25 maksimum nem içermektedir. Ürünün pH'sı (%10'luk çözeltide) ise 9-11 arasındadır.

Her bir işlem için 100 adet fidan yetiştirilmiş olup iki tür için uygulanacak 4 işlemde toplam 400 adet fidan elde edilmiştir. İşlemler aşağıda belirtildiği gibi olmuştur.

1.1.Kontrol+Akasya (KA)

1.2.Kontrol+İğde (Kİ)

2.1.Hümitik Asit + Akasya (HAA)

2.2.Hümitik Asit + İğde (HAİ)

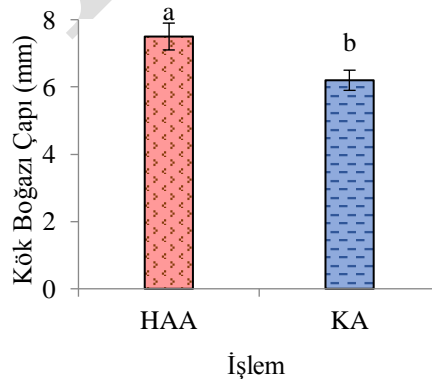
Vejetasyon dönemi sonunda her bir türde yapılan ölçümler için kullanılan fidan sayısı 2 işlem (hümitik asit ve kontrol) x 30 adet fidan = 60 adettir. Fidanların kök boğazı çapları 0,001 mm duyarlılıkta dijital çap ölçer (Mitutoyo absolute digimatic caliper) ile mm olarak belirlenmiştir. Fidanların boy ölçümleri  $\pm 1$  mm duyarlılıktaki metre yardımıyla yapılmıştır.

Veriler tesadüfi parseller deneme desenine göre analiz edilmiştir. Sonuçların  $p < 0.05$  düzeyinde istatistiki olarak önemli olduğu kabul edilmiştir. İşlemlerin istatistiki olarak önemli farklılıklar oluşturduğu değişkenler için ortalamaları ayırma işlemi olarak Tukey'in HSD testi  $\alpha = 0,05$  düzeyinde uygulanmıştır. Bütün istatistiki analizler için SAS (Statistical Analysis Software 1996) programından yararlanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Hümitik Asidin Akasya Fidanlarının Kök Boğazı Çapına Etkisi

Akasya fidanlarına uygulanan hümitik asit işleminin kök boğazı çaplarını etkilediği belirlenmiştir ( $P$ -değeri 0.0145). En kalın kök boğazı çapı HAA ünitesindeki fidanlarda tespit edilmiştir. HAA ünitesindeki fidanların KBC' si KA ünitesindekilerden yaklaşık %21 daha kalın olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). El-Khateeb ve ark. (2011) tarafından Giza/Mısır'da bir yaşındaki akasya (*Acacia saligna* Labill.) fidanlarının bulunduğu her bir fidan torbasına 4 g hümitik asit uygulanarak yapılan çalışmadaki ile benzer olarak bu çalışmada da hümitik asit uygulanan fidanların çapları kontrol fidanlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

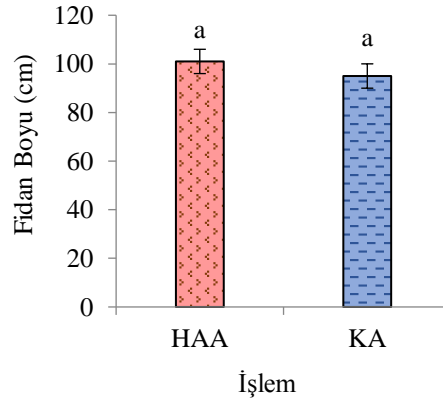


**Şekil 1.** Hümitik asit (HAA) uygulanmış ve uygulanmamış (KA) ünitelerdeki Yalancı Akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) fidanlarının kök boğazı çapı ortalamaları  $\pm$  standart hataları (Ortak harfe sahip ortalamalar  $\alpha = 0,05$  düzeyinde birbirlerinden farklı değildir).



### Humik Asidin Akasya Fidanlarının Boyuna Etkisi

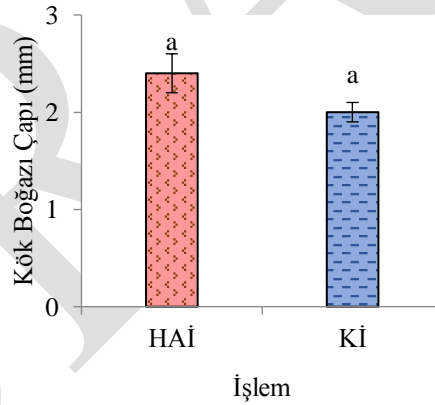
Akasya fidanlarına uygulanan hümik asit işleminin fidan boyunu etkilemediği belirlenmiştir. Her iki üniteadaki fidanların ortalama boyu 98 cm'dir (Şekil 2). Hümik asit uygulamasının fidan boyunu arttırdığı bilinmektedir (Tattini ve ark., 1990). Fakat bu çalışmada hümik asit uygulaması yapılan akasya fidanları kontrol fidanlarına göre boyda üstünlük kuramamıştır.



**Şekil 2.** Hümik asit (HAA) uygulanmış ve uygulanmamış (KA) ünitelerdeki Yalancı Akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) fidanlarının boy ortalamaları  $\pm$  standart hataları (Ortak harfe sahip ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde birbirlerinden farklı değildir).

### Humik Asidin İğde Fidanlarının Kök Boğazı Çapına Etkisi

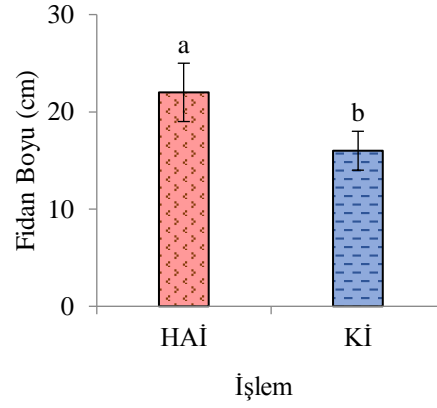
İğde fidanlarına uygulanan hümik asit işleminin, fidanların kök boğazı çaplarını etkilemediği belirlenmiştir. Her iki üniteadaki fidanların ortalama kök boğazı çapı 2.2 mm'dir (Şekil 3). Hümik asit uygulanan Yalancı akasya fidanlarında kök boğazı çapında kontrole göre daha fazla artış olmasına rağmen iğde fidanlarında böyle bir sonuç elde edilememiştir. Fakat diğer vejetasyon dönemi sonunda iğdelerin kök boğazı çapında kontrole göre fark oluşturabileceği beklenmektedir.



**Şekil 3.** Hümik asit (HAİ) uygulanmış ve uygulanmamış (Kİ) ünitelerdeki İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) fidanlarının kök boğazı çapı ortalamaları  $\pm$  standart hataları (Ortak harfe sahip ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde birbirlerinden farklı değildir).

### Humik Asidin İğde Fidanlarının Boyuna Etkisi

İğde fidanlarına uygulanan hümik asit işleminin fidan boylarını etkilediği belirlenmiştir (*P*-değeri 0.0493). HAİ işleminin uygulandığı fidanların boyları kontroldekilerden daha uzun olduğu tespit edilmiştir. HAİ ünitesindeki fidanların boyları Kİ ünitesindekilerden yaklaşık %38 daha uzun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalar da hümik asit uygulamasının fidan boyunu arttırdığını ortaya koymaktadır (Fagbenroa ve ark., 1991; Ismail ve Kardoush, 2011).



**Şekil 4.** Hümik asit (HAI) uygulanmış ve uygulanmamış (KI) ünitelerdeki İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) fidanlarının boy ortalamaları  $\pm$  standart hataları (Ortak harfe sahip ortalamalar  $\alpha=0,05$  düzeyinde birbirlerinden farklı değildir).

## SONUÇ

Hümik asit uygulaması Yalancı akasya fidanlarının kök boğazı çaplarının ve iğde fidanlarının boylarının gelişiminde önemli katkısı olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma fidanlıklarda hümik asidin akasya ve iğde üretiminde kullanılmasını önermektedir. Çalışmadan elde edilen veriler kurak ve yarı kurak sahalardaki ağaçlandırma çalışmalarında kullanılabilir kaliteli fidan üretimine althık oluşturmada fakat hümik asitin farklı dozlarda kullanılması neticesinde ortaya çıkacak sonuçlarında belirlenmesine dair çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2160014 No'lu "Arbusküler Mikorizal Mantar ve Hümik Asitin Yalancı Akasya (*Robinia Pseudoacacia*) ve İğde (*Elaeagnus Angustifolia*) Fidanı Üretiminde Kullanımı" adlı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akıncı, Ş. (2011). Hümik Asitler, Bitki Büyümesi ve Besleyici Alımı. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 23(1), 46-56.
- Akıncı, Ş. (2017). Humik asitlerin stres altındaki bitkilerin büyümesine ve besleyicilerin alınmasına etkileri I: Tuzluluk. Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 29(4), 137-150.
- El-Khateeb, M. A., El-Leithy, A. S., Aljemaa, B. A. 2011. Effect of mycorrhizal fungi inoculation and humic acid on vegetative growth and chemical composition of *Acacia saligna* Labill. seedlings under different irrigation intervals. Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants, 3(3), 283-289.
- Fagbenro, J. A., Agboola, A. A. 1993. Effect of different levels of humic acid on the growth and nutrient uptake of teak seedlings. Journal of Plant Nutrition, 16(8), 1465-1483.
- Ismail, O. M., Kardoush, M. 2011. The impact of some nutrients substances on germination and growth seedling of *Pistacia vera* L. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5), 115-120.
- Kulikova, N.A., Stepanova, E.V. ve Koroleva, O.V. (2005). Mitigating activity of humic substances: Direct Influence on Biota. In: Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice, NATO Science Series IV: Earth and Environmental Series, Perminova, I.V. (Eds). Kluwer Academic Publishers, USA, pp. 285-309.
- SAS Institute, Inc. 1996. SAS/STAT Users Guide, Version 6.12. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.
- Stevenson, F.J. (1994). Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions. John Wiley and Sons, New York.
- Tattini, M., Bertoni, P., Landi, A., Traversi, M. L. 1990. Effect of Humic Acids On Growth And Biomass Partitioning Of Container-Grown Olive Plants. In II Symposium on Horticultural Substrates and their Analysis, XXIII IHC 294 (pp. 75-80).
- Xudan, X. (1986). The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and wheat yield. Australian Journal of Agricultural Research, 37: 343-350.

## Endokrin Bozucu Kimyasalların Tüketime Sunulan Kuzu Eti ve Yağında Gaz Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Tespiti ve Cinsiyetin Etkisi

Özgür Kuzukıran<sup>1\*</sup>, Ayhan Filazi<sup>2</sup>, Pınar Arslan<sup>3</sup>, Begüm Yurdakök-Dikmen<sup>2</sup>, İlker Şimşek<sup>4</sup>, Yağmur Turgut<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, Çankırı, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

<sup>4</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Çankırı, Türkiye

\*ozgurkuzukiran@hotmail.com

### Özet

Vücuttaki endokrin reseptörlerine bağlanıp bunları aktive veya bloke ederek doğal hormonların sentez/parçalanmasını değiştiren endokrin bozucu kimyasallarla ilgili çalışmaların geçmişi 1950'li yıllara kadar gitmektedir. Şu anda yasaklı olan ama bir dönem yoğun olarak kullanılan organik klorlu pestisitler, PCB ve PBDE'ler stabilitelelerinin yüksek olması ve yağda birikme özellikleri nedeniyle doğada uzun süre kalmaktadırlar. Biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon nedeniyle besin zincirine girdikten sonra miktarları sürekli artmaktadır. İnsanların bu kimyasallara maruziyetinin %90'ı bulaşık gıdalarla olmaktadır. Bu çalışmada 14 OCP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -heksaklorosikloheksan, heksaklorobenzen, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT, heptaklor, aldrin, dieldrin,  $\alpha$ -endosülfan,  $\beta$ -endosülfan, metoksiklor), 7 PCB (PCB28, PCB30, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180) ve 6 PBDE (PBDE17, PBDE47, PBDE66, PBDE100, PBDE153, PBDE183)'nin kuzu eti ve yağdaki miktarları ve cinsiyetin buna olan etkisi araştırılmıştır. Kullanılan yöntem SANCO 12571/2013 ve EUROCHEM 2014 Validasyon Kılavuzu'na göre valide edilmiştir. Toplamda erkek hayvanlara ait örneklerin %75'inde, dişilerininkinin ise %33,3'ünde kalıntıya rastlanmıştır. Araştırılan örneklerin tamamında PCB tespit edilmiştir. Heksaklorosikloheksan ve 4,4'-DDT ile PCB52, kendi grupları içinde en sık rastlanılan kimyasallar olurken PBDE'lerden sadece PBDE17 tespit edilmiştir. Kalıntı görülme sıklığı erkeklerde daha fazla iken tespit edilen miktarların dişi hayvanlara ait örneklerde daha yüksek olduğu görülmüştür. Bulunan tüm kalıntıların seviyeleri Türk Gıda Kodeksi ve Avrupa Birliği'nin ilgili yönetmeliklerinde belirtilen seviyelerin altındadır.

**Anahtar Kelimeler:** Endokrin bozucu kimyasal, PBDE, PCB, Organik klorlu pestisitler, GC-MS, Kuzu eti

### Determination of Endocrine Disrupting Chemicals by Gas Chromatography Mass Spectrometry in Consumed Lamb Meat and Fat and the Effect of Gender

#### Abstract

The history of endocrine disrupting chemicals that alter the synthesis/degradation of natural hormones by binding or activating endocrine receptors in the body goes back to the 1950s. organochlorine pesticides, PCBs and PBDEs, which are currently banned but are used extensively for a period, remain in nature for a long time due to their high stability and oil deposition properties. Due to bioaccumulation and biomagnification, the amounts are constantly increasing after entering the food chain. People's exposure (90%) to these chemicals comes from foods. We investigated the contamination of 14 OCPs ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -), 7 PCBs (PCB28, PCB30, PCB52, PCB101, PCB118, PCB138, PCB153, PCB180) and 6 PBDEs (PBDE17, PBDE47, PBDE66, PBDE100, PBDE153, PBDE183) in lamb meat and fat and the effect of sex on their levels. The method used was validated according to SANCO 12571/2013 and EUROCHEM 2014 Verification Manual. Residues were found in 75% of males and 33.3% of females samples. The residual contents of the PCBs detected in all of the samples. While HCB, 4,4'-DDT and PCB52 were the most common residues among the their groups, whereas only PBDE17 was detected in the PBDEs. Although the incidence of residues is higher in the male animals, the detected amount is higher in the female animals. All residues levels found below the level specified The Codex Alimentarius Turkey and The European Union Regulations.

**Keywords:** Endocrine disrupting chemical, PBDE, PCB, organochlorinated pesticides, GC-MS, lamb meat.

## 1. Giriş

Endokrin bozucu kimyasallar (EBK), Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (US-EPA) tarafından, homeostazis, üreme, gelişim ve /veya davranışın korunmasından sorumlu olan doğal hormonların sentezlenmesi, salgılanması, taşınması, bağlanması veya ortadan kaldırılmasına müdahale eden insan üretimi veya doğal olarak bulunabilen bileşenler olarak tanımlanmıştır (Kavlock ve ark., 1996). Bu kimyasallar vücuttaki endokrin reseptörlerine bağlanıp bunları aktive veya bloke ederek doğal hormonların sentez/parçalanmasını değiştirmektedirler. Böylece normal endokrin fonksiyonlarının artmasına veya azalmasına neden olmaktadır (Zoeller ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalarda tür, yaş ve cinsiyetin hayvansal dokulardaki EBK birikiminde farklılıklara neden olabileceği belirtilmiştir. Bu etkenlerin kuzu dokularındaki kalıntı düzeylerini de değiştirebileceği düşünülmektedir. Bilgilerimize göre kuzu dokularında EBK birikim miktarları ile cinsiyet ve yaşa bağlı farklılıkları ortaya koyan sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Türkiye’de ise kuzu eti ve yağ dokusundaki EBK’ların durumunu göstermeye yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Böylece düşük yağ içeriği ve lezzet açısından özellikle tercih edilen ve beslenmede Türkiye’de önemli bir yer tutan kuzu eti ile hayvansal gıda ürünlerinin imalatında kullanılan kuzu yağlarında, insan sağlığı açısından risk oluşturabilecek EBK’ların miktarı ve cinsiyete bağlı farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem:

### 2.1. Örnekler ve Kimyasallar:

Çalışma için Ankara ilinde yetiştirilen ve kesim için kesimhaneye getirilen 12 aydan küçük 12 erkek ve 12 dişi karışık ırk kuzudan 100 g’den az olmayacak şekilde kas dokusu ve böbrek çevresi yağı alınmış, toplamda 24 kas dokusu ve 24 yağ dokusu olmak üzere 48 adet örnek analiz edilmiştir. Örnekler analiz edilene kadar derin dondurucuda -20 °C’de saklanmıştır.

Bütün kimyasallar analitik saflıkta seçilmiş olup, analitik standartların hepsi %100’e yakın saflıkta temin edilmiştir.

### 2.2. Ekstraksiyon:

Örneklerin ekstraksiyonunda Kuzukıran ve ark. (2018)’nin yumurtadaki bazı kalıcı organik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan yöntem laboratuvara uygulanmış olup, analitik ölçümler GC-MS ile yapılmıştır.

Kullanılan yöntem Avrupa Komisyonu Sağlık ve Tüketici Koruma Genel Müdürlüğü’nün (SANCO) 12571/2013 sayılı “Gıda ve Yemlerde Pestisit Kalıntılarının Analizi İçin Analitik Kontrol ve Validasyon Prosedürleri Kılavuzu” ve EUROCHEM’in 2014 yılında güncellediği “Yöntem Validasyonu ve İlişkili Konular Kılavuzu”nda belirtilen kriterlere göre valide edilmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Toplamda 24 hayvana ait 48 örnekten yapılan analizde erkek hayvanların %75’i, dişilerin ise %33,33’üne ait örnekte kalıntıya rastlanmıştır. Tespit edilen kalıntı sıklıkları Şekil 1’de verilmiştir.

Grup olarak incelendiğinde erkek hayvanlarda OCP görülme sıklığı %41,67 iken dişi hayvanlarda bu oran %16,67’dir. OC’lerden  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, 4,4’-DDD, 2,4’-DDT hiçbir örnekte tespit edilememiştir. OC’lerden HCB, 2 erkek ve 2 dişi hayvana ait kas ve yağ örneğinde (%16,67) tespit edilmiştir. HCB görülme sıklığında cinsiyet farklılığı görülmemiştir.

Erkek hayvanlarda kas örneklerinin %25’inde, yağ örneklerinin %8,33’ünde tespit edilen 4,4’-DDE’nin en sık tespit edilen OCP olduğu görülmüştür. Kas örneklerinin %16,67’inde, yağ örneklerinin %8,33’ünde tespit edilen 4,4’-DDT ise en sık tespit edilen ikinci OCP’dir.

Dişilerde en sık tespit edilen OCP HCB’dir. İkinci en sık tespit edilen OCP ise %8,33 ile 4,4’-DDT’dir. Dişilerde 4,4’-DDE tespit edilememiştir. Erkeklerde 4,4’-DDT görülme sıklığı, dişilerde ise miktarı daha fazladır. DDE’nin canlı organizmalarda DDT’nin deklorinizasyonu ile oluştuğu, doğadaki DDT’nin DDE’ye dönüştürülmesinin çok uzun zaman alan bir süreç olduğu bildirilmiştir (Aguilar, 1984).

PBDE’lerden PBDE47, PBDE66, PBDE100, PBDE153 ve PBDE 183 hiçbir örnekte tespit edilememiştir. Sadece PBDE17 erkek hayvanlara ait tek bir kas dokusunda ve 2 yağ dokusunda, dişilerde ise 2 kas dokusu örneğinde ve 1 yağ dokusunda tespit edilmiştir. Erkek hayvanlarda PBDE görülme sıklığı %16,67 ile dişilerle aynıdır. Fakat miktar olarak incelendiğinde dişilerde erkeklere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Cinsiyete bağlı metabolizma farklılığı bu durumu açıklayabilmektedir.

PCB tespit edilen örneklerde tek tek veya birlikte olmak üzere ve farklı miktarlarda 7 PCB de tespit edilmiştir. Erkek hayvanlara ait örneklerin %50’inde, dişilere ait olanların ise %33,33’ünde PCB bulunmuştur. Erkeklerde en sık tespit edilen PCB kas ve yağ dokularının %50’inde tespit edilen PCB118 ve PCB52 iken dişilerde, örneklerin %25’inde tespit edilen PCB52’dir.

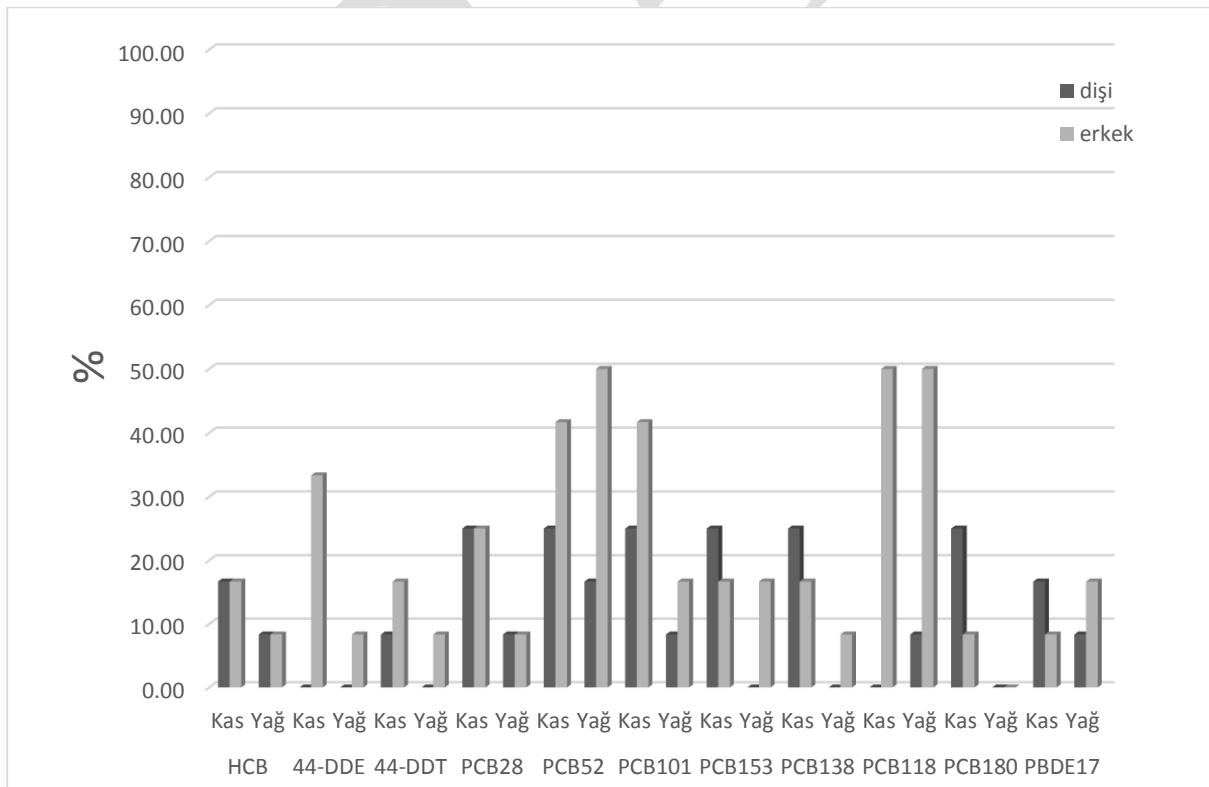
“Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği (25.11.2016 tarih ve 29899 sayılı Resmi Gazete) ve Avrupa Parlamentosu ve Komisyonunun yayınladığı EU 149/2008 sayılı yönetmelikte belirtilen küçükbaş hayvan etinde yağda çözülmüş halde bulunmasına izin verilen en yüksek kalıntı limiti DDT’lerin toplamı için 1000 ng/g, HCB için 200 ng/g olarak belirtilmiştir. Tespit edilen HCB ve toplam DDT değerleri bu yönetmeliklerde belirtilen limitlerin altındadır.

EFSA’nın 2010 yılında yayınladığı bilimsel raporda indikatör olarak belirtilen 6 PCB (PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153 VE PCB180)’nin küçükbaş hayvan eti ve yağında bulunmasına izin verilen en yüksek kalıntı limiti Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği (29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete) ve Avrupa Parlamentosu ve Komisyonunun yayınladığı EU 1259/2011 sayılı yönetmelikte belirtilmiş olan 40 ng/g/yağ’dır. Tespit edilen toplam indikatör PCB miktarları bu yönetmeliklerde belirtilen limitlerin altındadır.

Resmi Gazete’de 29.07.2015 tarih ve 29429 sayı ile yayınlanarak yürürlüğe giren 2015/32 sayılı “Türk Gıda Kodeksi Belirli Gıdalarda Dioksinlerin, Dioksin Benzeri Poliklorlu Bifenillerin ve Dioksin Benzeri Olmayan Poliklorlu Bifenillerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği” ile Avrupa Parlamentosu ve Komisyonunun yayınladığı EU 589/2014 sayılı yönetmelikte PCB118 için toksik eşdeğerlik faktörü (TEF) 0,00003 olarak belirtilmiştir. EU 1881/2006 sayılı yönetmelikte ise koyun eti ve yağında bulunmasına izin verilen PCB118 miktarın 4,5 pg/g yağ olduğu bildirilmiştir. Buna göre tespit edilen PCB118 miktarları belirtilen limitin altındadır.

EPA’nın PBDE’ler için 2017 yılında yayınlamış olduğu kronik oral referans dozları PBDE47 için  $1 \times 10^{-4}$  mg/kg/gün, PBDE153 için  $1 \times 10^{-4}$  mg/kg/gün, pentaBDE’ler (PBDE100) için  $2 \times 10^{-3}$  mg/kg/gün olarak belirtilmiştir (EPA, 2017). PBDE17, PBDE 60 ve PBDE183 için belirtilmiş bir değer bulunamamıştır. Bu değerler göz önüne alındığında analize alınan örneklerde sağlık açısından riskli miktarda PBDE tespit edilmemiştir.

Yapılan çalışma ile kuzuların etlerinin OCP, indikatör PCB ve PBDE kontaminasyon seviyelerinin resmi otoritelerce belirtilen üst sınırların altında olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında erkek hayvanlarda ve yağ dokularında EBK görülme sıklığının fazla olduğu gözlemlenmiştir. Miktar yönünden incelendiğinde ise dişi hayvanların ve onların yağ dokularının daha yüksek seviyelerde kalıntı içerdiği görülmüştür. Dişilerde tespit edilen kalıntı miktarlarının daha yüksek olması nedeniyle tüketimde erkek hayvanların tercih edilmesi uzun dönemde ortaya çıkabilecek olumsuz etkilerin önüne geçilmesi açısından faydalı olacaktır.



Şekil 1. Erkek (n=9) ve dişi (n=4) hayvanlara ait örneklerde tespit edilen analitlerin sıklığı.

## KAYNAKLAR

- EFSA. (2010). Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. EFSA Journal., 8: 1701.
- EU 149/2008. (2008). amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto.
- EU 589/2014. (2014). laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012.
- EU 1881/2006. (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- EPA. (2017). Regional Screening Level (RSL) Summary Table. www.epa.gov/risk/regionalscreening-levels-rsls-generic-tables-may-2016.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., et al., 1996. Research needs for the assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. Environ. Health Perspect. 104 (4), 715–740.
- Kuzukiran, O., Yurdakok-Dikmen, B., Sevin, S., Sireli, U. T., Iplikcioglu-Cil, G., Filazi, A. (2018). Determination of selected endocrine disruptors in organic, free-range, and battery-produced hen eggs and risk assessment. Environmental Science and Pollution Research, 25(35), 35376-35386.
- SANCO. (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. [http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_Sanco\\_2013\\_12571.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf). Erişim: 03.01.2019.
- TGK. (2011). Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. 28157 sayılı Resmi Gazete.
- TGK (2015). 2015/32 sayılı “Türk Gıda Kodeksi Belirli Gıdalarda Dioksinlerin, Dioksin Benzeri Poliklorlu Bifenillerin ve Dioksin Benzeri Olmayan Poliklorlu Bifenillerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği”, 29429 sayılı Resmi Gazete.
- TGK. (2016). Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 29899 sayılı Resmi Gazete.
- Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. Endocrinology. 2012;153(9):4097– 4110.

## Rapamycin reverses kidney injury in DOCA-salt induced hypertensive rats: Contribution of mTOR

Meryem Temiz-Resitoglu<sup>1</sup>, Demet Sinem Guden<sup>1</sup>, Sefika Pinar Senol<sup>1</sup>, Ozden Vezir<sup>2</sup>, Nehir Sucu<sup>3</sup>, Bahar Tunctan<sup>1</sup>, Seyhan Sahan-Firat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Mersin University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Mersin, Turkey.

<sup>2</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Mersin State Hospital, Mersin, Turkey.

<sup>3</sup>Mersin University, Faculty of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery, Mersin, Turkey.

\*seyhansahan06@gmail.com

### Abstract

Oxidative stress, inflammation, and immune system, and hypertrophic responses are major important processes in the initiation and maintenance of hypertension and significantly contributes to associated pathophysiological changes and mortality. The administration of DOCA to rats following removal of one kidney induces a renin-independent model of hypertension based cardiovascular and renal remodelling characteristic of human volume-overload-induced hypertension, especially hypertrophy, fibrosis, and oxidative stress. It has also been recognized that renal inflammation with immune cells like lymphocytes and macrophages localizing to regions of injury, hypertrophy, and cell proliferation are importantly associated with hypertension and kidney injury in rat models of hypertension. As known, a serine/threonine protein kinase, mTOR has emerged as a key regulator in a wide range of cellular processes ranging from cell proliferation, immune responses and inflammation, and oxidative stress. The present study focused on the role of mTOR in hypertension and associated renal pathophysiological changes produced by DOCA (30 mg/kg; per week, s.c.) with 1 % NaCl + 0,1 % KCl in drinking water to uninephrectomized rats for 6 weeks. DOCA-salt administration increased systolic blood pressure (SBP). A selective mTOR inhibitor, rapamycin injection (1 mg/kg; every 2nd day; i.p.) initiated at the 4<sup>th</sup> week of DOCA-salt treatment reversed increased SBP and rpS6 activity in the kidney. Rapamycin also inhibited the increases in NOX2 expression and NADPH oxidase, ERK1/2, and p38 MAPK activity, kidney hypertrophy, and prevented the increase in urine output, urinary protein, blood urea nitrogen and the decrease in creatinine clearance associated with DOCA-salt administration. These pathophysiological changes induced by DOCA-salt administration associated with increased mTOR activity were all inhibited by rapamycin. These data suggest that mTOR contributes to DOCA-salt hypertension and associated kidney injury, most probably as a result of increased oxidative stress, inflammation, and hypertrophic response.

**Keywords:** mTOR, DOCA-salt hypertension, kidney injury, oxidative stress, inflammation, hypertrophy

### INTRODUCTION

Hypertension, or high blood pressure, is a very common and serious condition that can lead to or complicate many health problems such as cardiovascular and renal failure (Siyad, 2011). Despite the fact that mechanisms underlying hypertension are not yet fully elucidated, a large amount of evidence shows that oxidative stress, inflammation, remodeling, and stiffening may play a central role in its pathophysiology (Gonzalez et al., 2014). Additionally, oxidative stress has gained attention as one of the fundamental mechanisms responsible for the development of hypertension (Paravicini and Touyz, 2006). Several animal models have been developed to investigate the molecular mechanisms of hypertension and to evaluate new therapeutic approaches and drugs. The administration of DOCA, in combination with salt loading in the diet to Wistar rats following surgical removal of one kidney, induces renin independent model of hypertension, a characteristic of human volume-overload induced hypertension based cardiovascular and renal remodeling [Selye et al., 1943; Gavras et al., 1975; Brown et al., 1999]. This is particularly important because increased oxidative stress plays a major role in this model of hypertension [Chen et al., 2013; Fujii et al., 2006]. Recent data indicate that DOCA-salt administration also causes inflammation and fibrosis in the kidney and cardiovascular system. Renal inflammation is a common feature of experimental and clinical hypertension, with immune cells localizing to regions of renal injury (Ebringer and Goyle, 1970; Hashmat et al., 2016). It has also been recognized that renal hypertrophy and cell proliferation are importantly associated with hypertension and kidney injury in rats (Yang et al., 2013; de Miguel et al., 2011).

As an intracellular serine/threonine protein kinase, mammalian target of rapamycin (mTOR), is ubiquitously expressed in mammalian cells and a central regulator of translation, transcription, differentiation, and metabolism thereby controlling cell growth, survival, proliferation, and metabolism (Liu, 2006). mTOR plays as a master growth regulator that senses and integrates diverse intracellular and extracellular signals, such as

insulin/insulin-like growth factor, amino acids, energy status, and stress and thus promotes several cellular processes, such as cell proliferation, hypertrophy, immune cells activity (Avruch et al., 2005). Therefore, it has attracted a broad research interest as it is involved in many research fields such as inflammation, cancer, diabetes, neurodegeneration, and aging (Sulaimanov et al., 2017). Although mTOR activation is involved in several forms of kidney injury such as fibrosis, glomerular hypertrophy, the contribution of mTOR and related signaling pathways in the DOCA-salt hypertension and associated kidney injury manifested by oxidative stress, inflammation, and hypertrophy is still unknown. Therefore, the present study was conducted to determine whether the selective inhibition of mTOR by rapamycin prevents hypertension and associated kidney injury may be due to oxidative stress, inflammation, and hypertrophy in DOCA-salt hypertensive rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

Rapamycin and DOCA were purchased from Gold Biotechnology (St. Louis, MO, USA) and Sigma Aldrich (St. Louis, MO), respectively. rpS6, phosphorylated rpS6, and ERK1/2 (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA), phosphorylated, ERK1/2, phosphorylated p38, p38, and gp91<sup>phox</sup> (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) were obtained. Secondary antibodies (sheep anti-mouse IgG-horseradish peroxidase and goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase) and ECL Prime Western Blotting Detection Reagents were also obtained from Amersham Life Sciences (Cleveland, OH, USA). NADPH oxidase ELISA kit was purchased from MyBiosource (San Diego, CA, USA).

### **In vivo study**

The male Wistar rats, weighing approximately 200-300 g (n = 32), were purchased from Research Center of Experimental Animals, Mersin University, Mersin, Turkey. All animal experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Rats were housed on a 12-h light/dark cycle and were given standard rat chow. The study protocols were approved by the Ethics Committee of Mersin University School of Medicine.

Rats were anesthetized and subjected to left unilateral nephrectomy (UNX). And then, rats were randomly divided into four groups containing UNX (n = 8), DOCA-salt hypertension (n = 8), UNX + rapamycin (n = 8), and DOCA-salt hypertension + rapamycin (n = 8). DOCA-salt hypertension was induced as previously described by Sahan-Firat et al. (2010). Animals received a weekly injection of DOCA (30 mg/kg, 0.2 ml) suspended in sesame oil and were supplied with tap water containing 1 % NaCl and 0.1 % KCl for 6 weeks. UNX control rats received vehicle without DOCA and salt. To study the contribution of mTOR to DOCA-salt hypertension, we administered rapamycin, a selective mTOR inhibitor, intraperitoneally every second day beginning at week 4. SBP was measured by using the tail-cuff method every week.

### **Measurement of kidney hypertrophy and dysfunction**

Kidney weight (KW)-to-body weight (BW) ratio was measured as an indicator of kidney hypertrophy. To analyze renal function, we measured urine output, protein content, blood urea nitrogen (BUN), serum and urine creatinine, and creatinine clearance. The protein content was measured by using Bradford method. For the measurement of urine output, rats were individually placed in metabolic cages for 24 h. At the end of the experiments, rats were anesthetized and perfused with saline via left ventricle puncture. Serum and urine creatinine concentration was analyzed with QuantiChrom creatinine assay kit and QuantiChrom BUN assay kit according to the manufacturer's instructions for calculation of creatinine clearance.

### **Measurement of NADPH oxidase activity**

NADPH oxidase activity in tissue samples was analyzed by ELISA following the kit manufacturer's instructions.

### **Western blotting**

rpS6, phosphorylated rpS6, ERK1/2, phosphorylated ERK1/2, p38, phosphorylated p38, gp91<sup>phox</sup>, and  $\beta$ -actin proteins were performed according to the immunoblotting method described previously (Temiz-Resitoglu et al., 2017; Tunctan et al., 2012). Briefly, an equivalent amount of total protein was loaded into each well and separated them by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBST) buffer at room temperature for 1 h, and incubated with specific primary antibodies in TBST including 5% bovine serum albumin (BSA) at 1:500–1:20,000 dilutions overnight at 4 °C. After incubation with secondary antibodies in TBST including 0.1% BSA at 1:1000 for 1 h at room temperature, protein bands were visualized with ECL Prime Western blotting detection reagent. The protein levels were analyzed by using ImageJ analysis software version 1.46 (National Institutes of Health, USA).



## Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Student's t test was used to determine the difference between the two groups when appropriate. Quantitative data were presented as the means  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was accepted for  $P$  values  $< 0.05$ . GraphPad Prism 5.0 Version for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA) was applied in performing the statistical analyses.

## RESULTS

### Effects of rapamycin on systolic blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats

DOCA-salt administration for 6 weeks caused an increase in SBP and the selective mTOR inhibitor rapamycin reversed this increase to normal levels in UNX rats ( $P < 0.05$ ) (Table 1). Rapamycin alone or its vehicle did not alter SBP in any of the treatment groups ( $P > 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** Rapamycin normalized increased systolic blood pressure (SBP) in DOCA-salt hypertensive rats.

	Vehicle	DOCA-salt	RAPA	DOCA-salt + RAPA
Systolic Blood Pressure (mmHg)	121.9 $\pm$ 0.5806	192.6 $\pm$ 2.045*	123.1 $\pm$ 0.8115	122.8 $\pm$ 1.424 <sup>#</sup>

Uninephrectomized (UNX) rats were injected with DOCA (30 mg/kg per week, 0.2 ml, s.c.) and given 1 % NaCl and 0.1 % KCl in tap water for 6 wk, and UNX rats received vehicle without DOCA or salt. Rapamycin (1 mg/kg, i.p.) was given every second day beginning from week 4, and SBP was measured every week by tail-cuff method. The values are presented as the means  $\pm$  S.E.M. (n = 8). \* $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs DOCA-salt-treated group.

### Rapamycin attenuates the activation of rpS6 by DOCA-salt administration

As shown in Table 2, the administration of DOCA-salt activated mTOR signaling in rats. DOCA-salt administration caused an increase in phosphorylation of rpS6, a major downstream target of mTOR in the kidney ( $P < 0.05$ ). Rapamycin administration significantly reversed these changes induced by DOCA-salt administration. Rapamycin alone did not alter the basal activity of rpS6 in any of the groups (Table 1) ( $P > 0.05$ ).

### Effects of rapamycin on NADPH oxidase activity and expression in DOCA-salt hypertensive rats

As shown in Table 2, DOCA-salt administration induced a significant increase in NADPH oxidase activity and expression of gp91<sup>phox</sup>, a subunit of NADPH oxidase enzyme system, in the kidney ( $P < 0.05$ ). Rapamycin treatment inhibited the increases in expression and activity of NADPH oxidase. Rapamycin alone had no effect on the basal level of NADPH oxidase activity or expression of its subunits in any of the treatment groups ( $P > 0.05$ ).

### Effects of rapamycin on DOCA-salt induced changes in the activities of ERK1/2 and p38 MAPK

To determine the effect of rapamycin on ERK1/2 and p38 activities we measured phosphorylation of these kinases in the kidney. DOCA-salt administration to rats increased phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPK whereas which was diminished with rapamycin while it had no effect on its protein expression in the kidney (Table 2). Rapamycin alone had no effect on the expression and phosphorylation of these kinases in any of the treatment groups (Table 2) ( $P > 0.05$ ).

**Table 2.** Rapamycin ameliorates increased activity of rpS6, ERK1/2, and p38 MAPK as well as NADPH oxidase system activity.

	Vehicle	DOCA-salt	RAPA	DOCA-salt + RAPA
Phosphorylated rpS6/rpS6 ratio (Arbitrary units)	1.00	1.273 $\pm$ 0.048*	1.025 $\pm$ 0.084	1.035 $\pm$ 0.054 <sup>#</sup>
Phosphorylated ERK1/2/ERK1/2 MAPK ratio (Arbitrary units)	1.00	1.215 $\pm$ 0.045*	0.99 $\pm$ 0.064	0.93 $\pm$ 0.034 <sup>#</sup>
Phosphorylated p38/p38 MAPK ratio (Arbitrary units)	1.00	1.468 $\pm$ 0.073*	1.023 $\pm$ 0.039	1.015 $\pm$ 0.064 <sup>#</sup>
NOX2 protein expression (Arbitrary units)	1.00	1.248 $\pm$ 0.04*	0.9650 $\pm$ 0.056	0.9025 $\pm$ 0.038 <sup>#</sup>
NADPH oxidase (ng/mg protein)	46.3 $\pm$ 0.666	56.0 $\pm$ 0.577*	42.0 $\pm$ 3.873	42.6 $\pm$ 2.421 <sup>#</sup>

Data are means  $\pm$  SEM (n=4-5). \*  $P < 0,05$ , UNX vs. DOCA-salt. <sup>#</sup>  $P < 0,05$ , DOCA-salt vs. DOCA + RAPA.

### Effects of rapamycin on kidney hypertrophy and function in DOCA-salt hypertensive rats

Table 3 shows the KW/BW ratio and renal function parameters. DOCA-salt administration to rats caused an increase in KW/BW ratio, an index of renal hypertrophy which was mitigated with rapamycin treatment ( $P < 0.05$ ). Urine output, protein content, BUN, and serum creatinine concentration were enhanced, while creatinine clearance was decreased in DOCA-salt hypertensive rats ( $P < 0.05$ ). Also, the changes in these parameters were attenuated by rapamycin treatment ( $P < 0.05$ ). Rapamycin alone did not alter these parameters in any of the treatment groups ( $P > 0.05$ ).

**Table 3.** Rapamycin reverses kidney hypertrophy and reduces changes in renal function in DOCA-salt hypertensive rats.

	Vehicle	DOCA-salt	RAPA	DOCA-salt + RAPA
KW/ BW (mg/g)	5.325 ± 0.154	6.131 ± 0.093*	5.348 ± 0.088	5.684 ± 0.092 <sup>#</sup>
Urine output (mL/day)	5.1 ± 0.5788	10.1 ± 0.2915*	5.9 ± 0.6205	6.3 ± 0.5831 <sup>#</sup>
Urine protein levels (mg/day)	35.80 ± 4.179	68.36 ± 1.513*	38.82 ± 4.312	40.16 ± 4.435 <sup>#</sup>
BUN (mg/dL)	47.26 ± 5.674	57.54 ± 4.004*	49.37 ± 6.292	48.93 ± 7.187 <sup>#</sup>
Serum creatinine (mg/dL)	0.9699 ± 0.06	1.247 ± 0.08*	0.7531 ± 0.06	0.9315 ± 0.04 <sup>#</sup>
Urine creatinine (mg/dL)	129.7 ± 12.50	84.04 ± 5.847*	132.6 ± 5.728	123.0 ± 10.32 <sup>#</sup>
Creatinine clearance(ml/min)	0.62 ± 0.04	0.41 ± 0.04*	0.83 ± 0.14	0.59 ± 0.04 <sup>#</sup>

Data are means ± SEM (n=5). BUN, blood urea nitrogen; BW, body weight; KW, kidney weight.\*  $P < 0,05$ , UNX vs. DOCA-salt. <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , DOCA-salt vs. DOCA + RAPA.

### DISCUSSION

The present study indicates that mTOR contributes to DOCA-salt hypertension and related pathophysiological kidney injury associated with increased oxidative stress, inflammatory, and hypertrophic response in rats. This evidence is based on our findings that in DOCA-salt hypertensive rats, rapamycin, a selective mTOR inhibitor, reversed the increased SBP and kidney hypertrophy as well as the elevated urine output, BUN levels, and the decreased creatinine clearance which indicators of renal dysfunction. Because the kidney plays a relevant role in the control of salt and volume balance, with blood pressure, imbalances in renal function could lead to the development of hypertension. Specifically, the DOCA-salt hypertensive models were used to describe the natural history of hypertension and the biochemical and hormonal characteristic of each stage of the disease (Lee et al., 2015). Moreover, DOCA-salt hypertensive rats is an appropriate model for malignant hypertension accompanied by extensive end organ-damage (Nishikimi et al., 2001) such as renal injuries (Hammel et al., 2001). In the literature, previous studies showed that the mean arterial pressure, total peripheral resistance index, cardiac and renal weights, and levels of blood urea nitrogen and serum creatinine levels were increased in DOCA-salt treated rats (Sesoko et al., 1984; Sahan-Firat et al., 2010), consistent with our present findings. Thus, DOCA-salt induced hypertension model is a good model for studying the acute development of renal impairment (Sesoko et al., 1984).

Indeed, there is little information about the role of mTOR in the regulation of blood pressure in the literature (Diekmann et al., 2007; Yang et al., 2007). Kramer et al. (2008) reported that low-dose of rapamycin reversed the increased blood pressure to normotensive values in the experimental model of mesangioproliferative glomerulosclerosis which is induced by anti-thy1 antibody in uninephrectomized rats. Moreover, Kumar et al (2017), demonstrated that inhibition of the mTOR pathway with rapamycin attenuated salt-induced hypertension. In parallel to these studies, we showed that DOCA-salt treatment elevated the blood pressure of UNX rats, but this elevation was significantly attenuated in treatment of DOCA-salt hypertensive rats with rapamycin.

Hypertension and related cardiac, renal, and vascular alterations are closely related to oxidative stress characterized by increased reactive oxygen species production. The involvement of NADPH oxidase in rat models of DOCA-salt hypertension was initially suggested through pharmacological approaches. Subsequently, p47<sup>phox</sup> or gp91<sup>phox</sup> deficient mice have been shown to be resistant to the development of hypertension following DOCA-salt treatment. In our previous studies, it is demonstrated that the activity of NADPH oxidase and expression of NOX1 in kidney was induced with DOCA-salt hypertensive rats (Sahan-Firat et al., 2010). Supporting these previous findings, our results showed that DOCA-salt administration to rats induced NADPH oxidase activity and NOX2 expression in kidney. Rapamycin, a selective inhibitor of mTOR, combination with DOCA-salt administration lowered blood pressure and blunted hypertension-

induced renal NADPH-dependent oxidative stress response. However, the relationship between oxidative stress and mTOR is complicated, since mTOR not only modulates oxidative stress but is also affected by ROS activation. Recent evidence demonstrates that mTOR regulates oxidative stress-induced organ dysfunction. Inhibition of mTORC1 either with rapamycin or by S6K1 silencing inhibits O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in the rat aorta. Also, treatment with rapamycin reduced ROS production in the myofibroblasts in the models of post-MI remodeling. (Schenkel et al., 2012; Rajapakse et al., 2011; Schenkel et al., 2010). In the light of these observations, the protective effects of rapamycin against DOCA-salt induced hypertension and pathological changes in the kidney were most likely due to decreased oxidative stress response related to mTOR inhibition. As expected, the DOCA-salt hypertensive rats showed impaired renal function characterized by decreased glomerular filtration, increased proteinuria. These functional changes were accompanied by renal fibrosis, remodeling, and inflammation as well as an oxidative stress response. (Bae et al., 2010). DOCA-salt rats also developed marked kidney hypertrophy, which are manifested with an elevation in KW/BW ratio and glomerular area, and an increase in glomerular hypertrophy. (Luk et al., 2007). Another important finding in our study was that the increased KW/BW ratio, an indicator of kidney hypertrophy, produced by DOCA-salt administration was normalized by rapamycin administration in the rat kidney. Our previous study supports the present hypothesis that hypertrophy and inflammatory processes may contribute to hypertensive renal injury due to DOCA-salt hypertensive rats. In fact, it has been revealed to stimulate renal hypertrophy and inflammatory response in part through MAPK activation, including ERK1/2 and p38 (Abdata et al., 2003). These pathways are activated by different extracellular stimuli and transmission extracellular signaling into the nucleus, thereby producing a variety of cell-mediated reactions via transcriptional regulation that results in kidney hypertrophy, inflammation led to kidney dysfunction (Remuzzi et al., 2008; Bae et al, 2010). Furthermore, activation of MAPK is essential for the elevation of blood pressure because of its direct effects on the vessel tension (Kim et al., 2004; Kim et al., 2006). The present study shows that activities of ERK1/2 and p38 were increased in DOCA-salt rats compared to UNX rats. Rapamycin administration inhibited ERK1/2 and p38 MAPK activity in DOCA-salt hypertensive rats. In similarly, we also previously demonstrated that the reversal effect of rapamycin on increased MAPK activation and enhanced production of proinflammatory mediators in renal tissue of rats induced by zymosan seems to be related to decreased mTOR activity (Sahan-Firat et al., 2018).

In the continuation of the other findings, we investigated renal function parameters such as urine output, BUN and creatinine levels, and creatinine clearance. We also found that DOCA-salt administration caused renal dysfunction, as indicated by an increase in urine output, increased BUN levels, decreased GFR, as indicated by reduced creatinine clearance, and increased proteinuria which was normalized by rapamycin administration. Thus, the harmony between previously published studies and our present results could be attributed that increased oxidative stress, inflammatory response, and hypertrophy might be the cause of hypertension and related pathological kidney injury in DOCA salt rats. Furthermore, in our study, we demonstrated the beneficial role of rapamycin in DOCA-salt induced hypertension with renal dysfunction as its treatment decreased the development of oxidative stress which was associated with reduced NADPH oxidase system activation and expression of NOX2, ERK1/2, and p38 activation, and attenuated kidney hypertrophy due to blocked mTOR activity in rat kidney.

## CONCLUSION

In conclusion, our results showed that beneficial effects of rapamycin in the DOCA-salt model of hypertension probably as a result of inhibited NADPH oxidase and MAPK activity as well as kidney hypertrophy via inhibiting mTOR activity. Our findings may have relevant implications, not only in terms of lowering blood pressure but also to prevent long term renal modifications associated with hypertension. Furthermore, mTOR could serve as a target for the development of therapeutic agents for the treatment of hypertension and related kidney injury.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Research Foundation of Mersin University in Turkey with Project Number "2018-1-TP3-2813" and the Scientific and Technological Research Council of Turkey (Grant SBAG-118S168).

## REFERENCES

- Abdata AP, Haibara AS, Colombari E 2003. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarius: microinjection study in conscious rats. *American Journal of Physiology*, 285: 891-898.
- Avruch J, Lin Y, Long X, Murthy S, Ortiz-Vega S 2005. Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 8: 67-72.
- Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Kim SW 2010. Rosiglitazone prevents the progression of renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension Research*, 33: 255-262.
- Brown L, Duce B, Miric G, Sernia C 1999. Reversal of cardiac fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats by inhibition of the renin-angiotensin system. *Journals of the American Society of Nephrology*, 10: 143-148.
- Chen QZ, Han WQ, Chen J, Zhu DL, Chen-Yan Y, Gao PJ 2013. Anti-stiffness effect of apocynin in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats via inhibition of oxidative stress. *Hypertension Research*, 36: 306-312.
- De Miguel C, Lund H, Mattson DL 2011. High dietary protein exacerbates hypertension and renal damage in Dahl SS rats by increasing infiltrating immune cells in the kidney. *Hypertension*, 57: 269-274.
- Diekmann F, Rovira J, Carreras J, Arellano EA, Bonon-Maneus E, Ramirez-Bajo MJ, Gutierrez-Dalmau A, Brunet M, Campistol JM 2007. Mammalian target of rapamycin inhibition halts progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *Journals of the American Society of Nephrology*, 18: 2653-2660.
- Ebringer A, Doyle AE 1970. Raised serum IgG levels in hypertension. *British Medical Journal*, 2: 146-148.
- Fujii A, Nakano D, Katsuragi M, Ohkita M, Takaoka M, Ohno Y, Matsumura Y 2006. Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in the deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 552: 131-134.
- Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Vaughan ED, Koss M, Cote LJ, Gavras I 1975. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circulation Research*, 36: 300-309.
- González J, Valls N, Brito R, Rodrigo R 2014. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World Journal of Cardiology*, 6: 353-366.
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Fléjou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P 2001. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *The New England Journal of Medicine*, 344: 418-423.
- Hashmat S, Rudemiller N, Lund H, Abais-Battad JM, Van Why S, Mattson DL 2016. Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 311: 555-561.
- Kim B, Kim J, Bae YM, Cho SI, Kwon SC, Jung JY, Park JC, Ahn HY 2004. p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the diminished aortic contraction by endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 43: 1086-1091.
- Kim J, Lee CK, Park HJ, Kim HJ, So HH, Lee KS, Lee HM, Roh HY, Choi WS, Park TK, Kim B 2006. Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101: 135-143.
- Kramer S, Wang-Rosenke Y, Scholl V, Binder E, Loof T, Khadzhyrov D, Kawachi H, Shimizu F, Diekmann F, Budde K, Neumayer HH, Peters H 2008. Low dose mTOR inhibition by rapamycin attenuates progression in anti-thy1-induced chronic glomerulosclerosis of the rat. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 294: 440-449.
- Kumar V, Wollner C, Kurth T, Bukowy JD, Cowley AW 2017. Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Attenuates Salt-Induced Hypertension and Kidney Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertension*, 70: 813-821.
- Lee LK, Kim MY, Kim JH, Lee JU, Park BS, Yang SM, Jeon HJ, Lee WD, Noh JW, Kwak TY, Lee TH, Kim JY, Kim HY, Hwang BY, Kim B, Kim J 2015. A review of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and its relevance for cardiovascular physiotherapy research. *Journal of Physical Therapy Science*, 27: 303-307.
- Liu Y 2006. Rapamycin and chronic kidney disease: beyond the inhibition of inflammation. *Kidney International*, 69: 1925-1927.

- Luk JM, Wang X, Liu P, Wong KF, Chan KL, Tong Y, Hui CK, Lau GK, Fan ST 2007. Traditional Chinese herbal medicines for treatment of liver fibrosis and cancer: from laboratory discovery to clinical evaluation, *Liver International*, 27: 879-890.
- Nishikimi T, Yoshihara F, Kanazawa A, Okano I, Horio T, Nagaya N, Yutani C, Matsuo H, Matsuoka H, Kangawa K 2001. Role of increased circulating and renal adrenomedullin in rats with malignant hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281: 2079-2087.
- Paravicini TM, Touyz RM 2006. Redox signalling in hypertension. *Cardiovascular Research*, 71: 247-258.
- Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N 2008. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *Journals of the American Society of Nephrology*, 119: 1459-1462.
- Rajapakse AG, Yepuri G, Carvas JM, Stein S, Matter CM, Scerri I, Ruffieux J, Montani JP, Ming XF, Yang Z 2011. Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol. *PLoS ONE*, 6: e19237.
- Sahan-Firat S, Jennings BL, Yaghini FA, Song CY, Estes AM, Fang XR, Farjana N, Khan AI, Malik KU 2010. 2,3',4',5-Tetramethoxystilbene prevents deoxycorticosterone-salt-induced hypertension: contribution of cytochrome P-450 1B1. *The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299: 1891-1901.
- Sahan-Firat S, Temiz-Resitoglu M, Guden DS, Kucukkavruk SP, Tunctan B, Sari AN, Kocak Z, Malik KU 2018. Protection by mTOR inhibition on zymosan-induced systemic inflammatory response and oxidative/nitrosative stress: Contribution of mTOR/MEK1/ERK1/2/IKK $\beta$ /I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Inflammation*, 41: 276-298.
- Schenkel PC, Tavares AMV, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnoli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Belló-Klein A 2010. Redox sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 341: 1-8.
- Schenkel PC, Tavares AMV, Fernandes RO, Diniz GP, Ludke AR, Ribeiro MF, Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Belló-Klein A 2012. Time course of hydrogen peroxide-thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. *Experimental Physiology*, 97: 741-749.
- Selye H, Hall CE, Rowley EM 1943. Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. *Canadian Medical Association Journal*, 49: 88-92.
- Sesoko S, Pegram BL, Willis GW, Frohlich ED 1984. DOCA-salt induced malignant hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 2: 49-54.
- Siyad AR 2011. Hypertension. *HYGEIA-Journal for Drugs and Medicines*, 3: 1-16.
- Sulaimanov N, Klose M, Busch H, Boerries M 2017. Understanding the mTOR signaling pathway via mathematical modeling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 9: 1379.
- Temiz-Resitoglu M, Kucukkavruk SP, Guden DS, Cecen P, Sari AN, Tunctan B, Gorur A, Tamer-Gumus L, Buharalioglu CK, Malik KU, Sahan-Firat S 2017. Activation of mTOR/I $\kappa$ B- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway contributes to LPS-induced hypotension and inflammation in rats. *European Journal of Pharmacology*, 802: 7-19.
- Tunctan B, Sari AN, Kacan M, Unsal D, Buharalioglu CK, Sahan-Firat S, Korkmaz B, Falck JR, Malik KU 2012. NS-398 reverses hypotension in endotoxemic rats: Contribution of eicosanoids, NO, and peroxynitrite. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 104-105: 93-108.
- Yang C, Stingo FC, Ahn KW, Liu P, Vannucci M, Laud PW, Skelton M, O'Connor P, Kurth T, Ryan RP, Moreno C, Tsaih SW, Patone G, Hummel O, Jacob HJ, Liang M, Cowley AW 2013. Increased proliferative cells in the medullary thick ascending limb of the loop of Henle in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension*, 61: 208-215.
- Yang Y, Wang J, Qin L, Shou Z, Zhao J, Wang H, Chen Y, Chen J 2007. Rapamycin prevents early steps of development of diabetic nephropathy in rats. *American Journal of Nephrology*, 27: 495-502.

## Non dairy probiotic products

Esra ŞENTÜRK, Pınar ŞANLIBABA

Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [esra.snturk@gmail.com](mailto:esra.snturk@gmail.com)

### Abstract

A century ago, Elie Metchnikoff postulated that lactic acid bacteria (LAB) offered health benefits capable of promoting longevity. The term “probiotics” was first introduced in 1965 by Lilly and Stillwell; in contrast to antibiotics, probiotics were defined as microbially derived factors that stimulate the growth of other organisms. Probiotics are live microorganisms, generally bacteria but also yeast. Probiotics are readily available to consumers and are commonly found as food probiotics (e.g., yogurts, cheeses, milk-based beverages, fermented fish, meats, and vegetables, among others) and as food supplement probiotics (e.g., tablets, capsules, pills, powders, liquid concentrates in vials, and soft gels, among others). Nowadays, there is an increasing consumer demand for non-dairy based probiotics products. Lactose intolerance, cholesterol content, allergic milk proteins and vegetarianisms are limiting factors in growth of dairy products. A large number of lactic acid fermented traditional products based on non-dairy sources are available and consumed throughout the world. As fermentation process involves mixed cultures such as yeast, LAB and fungi, traditional fermented foods are a plentiful source of microorganism and some of them show probiotic characteristics. A number of food products including beverages products, meat products, cereals products, vegetables and fruits products and bread products have been utilized as delivery vehicles for probiotics. The object of this study is to summarize of non-dairy probiotic foods.

**Keywords:** Probiotic, non-dairy food, fermentation

### INTRODUCTION

Probiotics are living microorganisms that have a beneficial effect on the host when administered in sufficient amounts. Many reports have been published on the health benefits in gastrointestinal infections, antimicrobial activities, antimutagenic and anticarcinogenic properties of probiotics (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Kechagia et al., 2013; Kumar et al., 2015; Saadiya et al., 2018). The positive effects of probiotic microorganisms on human health were first introduced in 1908 by Nobel Prized Russian researcher Elie Metchnikoff. In 1965, the term probiotic was used by Lilly and Stillwell for the first time in terms of “substances released by one microorganism (Kumar et al., 2015). It was described by Parker in 1974 as additional complementary foods with beneficial effects on intestinal microflora. In 1989, Fuller described probiotics as a live microbial nutrient contribution that improves intestinal microbial balance for the benefit of the host animal (Saadiya et al., 2018). As the characteristics of probiotics has been better understood in the following years, this definition has been extended and defined as a nutrient that creates health effects for the benefit of the host by changing the microflora of the host with a sufficient number of living, defined microorganisms (Yeşilova et al., 2010; Awaisheh 2012; Manigandan et al., 2012; Kechagia et al., 2013). The word probiotic means “for life” in Greek, and also today it is defined by the World Health Organization and the Food and Agriculture Organization as living microorganisms that have positive effects on host health when consumed in sufficient quantities (Kechagia et al., 2013; Kumar et al., 2015; Panghal et al., 2018).

### Probiotic Microorganisms and Properties

Probiotics are a group of living microorganisms that have a positive effect on the health of the host when taken at sufficient levels and which improve the microbial balance of the intestinal system so produce beneficial effects (Yangilar 2015).

The most important group of probiotic microorganisms are lactic acid bacteria (LAB). Among these, the most common probiotic microorganisms used and marketed in the world belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (Song et al., 2012; Martins et al., 2013). In addition, species belonging to the genera *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* and *Propionibacterium* can be used due to their health promoting

effects (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Some yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *S. Boulardii* also have potential probiotic properties (Min 2018). Some types of bacteria, yeast and mold species used in the preparation of probiotic products are shown in the Table 1(Song et al., 2012; Ranadheera et al., 2017).

Table 1. Microorganisms used as probiotic cultures (Adapted from Ranadheera et al., 2017)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. essensis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. reuteri</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>P. freudenreichii subsp. shermanii</i>
<i>L. lactis</i>		<i>P. jensenii</i>
<i>L. sporogenes</i>		<i>Pediococcus</i>
		<i>Leuconostoc lactis subsp. cremoris</i>
		<i>L. lactis subsp. lactis</i>
		<i>Clostridium butyricum</i>
		<i>Bacillus cereus</i>

The microorganisms used in the production of probiotics are defined by the FDA as GRAS (generally recognized as safe). LAB has been classified as GRAS due to its general formation in fermented food products as well as being an important part of human commensal microflora (Wang et al., 2018). One of the most important features of a probiotic strain is that being non-pathogenic and GRAS. In addition, for use as a probiotic should have some desirable properties such as low cost, the maintenance of viability during processing and storage, ease of application to products, resistance to physicochemical processes (Prado et al., 2008; Song et al., 2012). The probiotics used must be of human origin, must have been shown to have health effects in clinical studies, have been proven to be safe for food and clinical uses, must have antagonistic activity against pathogens, must be able to attach to the intestinal epithelial cells, be resistant to acid and bile salts, should be able to form antimicrobial compounds, compete with normal flora in the intestinal tract and stabilize intestinal microflora (Prado et al., 2008; Çelikel et al., 2018). Probiotics must be capable of interacting with the host microflora and be able to compete with microbial pathogens, bacteria and viruses (Song et al., 2012).

### Health Effects of Probiotics

Probiotics need to be above a certain number in the intestinal system in order to have a positive effect on health (Çelikel et al., 2018). The minimum number of probiotics required to be present in foods is  $10^6$ - $10^7$  cfu / g, determined by various food organizations around the world in order to have positive health effects of probiotics (Bansal et al., 2016; Min et al., 2018). In addition, the effectiveness of probiotic bacteria depends on the survival of the probiotic bacteria during the storage of the product and their viability in the intestines (Çelikel et al., 2018).

Probiotics have positive effects on the composition of the intestinal microbiota and overall health (Martins et al., 2013). Probiotic bacteria have a positive effect on human health by improving the balance of intestinal microflora and improving mucosal defenses against pathogens. Additional health benefits include increased

immune response, reduction of serum cholesterol, vitamin synthesis, anti-carcinogenic activity and anti-bacterial activity (Karimi et al., 2011).

Many reports have been described the health benefits of these microorganisms on gastrointestinal infections, antimicrobial activity, improvement in lactose metabolism, reduction in serum cholesterol, immune system stimulation, antimutagenic properties, anti-carcinogenic properties, diarrhea preventive properties, improvement of inflammatory bowel diseases and the suppression of *Helicobacter pylori* infections with addition selected species to food products (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010; Kechagia et al., 2013; Kumar et al., 2015; Saadiya et al., 2018). Probiotics have also demonstrated their natural effects in alleviating the symptoms of allergies, cancer, AIDS, respiratory and urinary tract infections. There are stray reports of beneficial effects on aging, fatigue, autism, osteoporosis, obesity and type 2 diabetes (Pandey et al., 2015).

### **Probiotic Products**

Probiotics represent one of the largest functional food markets (Granato et al., 2015). The main probiotic products on the market are milk based products such as fermented milk, cheese, ice cream, butter milk and yogurt (Kechagia et al., 2013). Fermented dairy products are generally the best carrier matrices of probiotic microorganisms (Martins et al., 2013).

Milk-based fermented products and yoghurts have been used as potential probiotic products since ancient times. However, the recent increase in consumer interest in milk alternatives has opened new perspectives for non-dairy probiotic research and development. Various matrices and substrates such as cereals, fruit juices or their mixtures are used to give these beneficial microorganisms (Bansal et al., 2016).

Today, 78% of the world's current probiotic sales are made through yoghurt (Granato et al., 2010; Saadiya et al., 2018). Although most of the probiotic products on the markets are yogurt and dairy products in fermented milk form, it is obligatory to investigate plant-derived probiotics due to vegan probiotic food demand and with lactose intolerance and cholesterol content limitations in milk which are the two main issues in dairy products (Sridharan and Das, 2019).

Recently, fruits, vegetables, cereals and soybean-based drinks have been proposed as new products containing probiotic strains; especially fruit juices have been reported to be a new and suitable environment in terms of the content of nutrients required for probiotics (Perricone et al., 2015).

### **Why non-dairy probiotic products**

Dairy products are the main carriers of probiotic bacteria because they provide a suitable environment for probiotic bacteria to support their development and viability (Song et al., 2012). However, allergy to dairy products adversely affects many people in the world. In addition, traditions and economic reasons limiting the use of dairy products in some developing countries support the idea of reducing milk components as a means for probiotic agents or even replacing milk with other media such as cereals (Granato et al., 2010). The limitations of these products, such as the presence of allergens, high lactose and cholesterol content, and the need for cold storage facilities, is created the need to move towards new probiotic product groups based on non-dairy substrates. Moreover, the increased consumer vegetarianism across developed countries has led to an increasing demand for vegetarian probiotic products, while demand for new food and flavors has started a trend in non-dairy probiotic product development. (Awaisheh 2012; Song et al., 2012; Bansal et al., 2016).

Approximately 75% of the world population shows lactose intolerance (Song et al., 2012). Non-dairy probiotic products are of great importance worldwide due to the continuing trend of vegetarianism and the high frequency of lactose intolerance in many populations around the world (Granato et al., 2010). Lactose intolerance, cholesterol content and allergenic milk proteins are the main disadvantages associated with milk intake. This necessitates of the development of new probiotic foods that do not contain dairy products is caused (Granato et al., 2010; Saadiya et al., 2018). In the last 20 years, a few non-dairy probiotic products have been developed and marketed. Non-dairy probiotic products on the market can be sorted such as fruit and vegetables, fruit juices, non-dairy beverages, cereal-based products, chocolate-based products, meat, etc. (Song et al., 2012).



## Non-dairy probiotic products

As vegetarian and consumer concerns turn to high-value dairy products that do not contain cholesterol and lactose, interest in the development of non-dairy probiotic products is increasing due to the demand for an alternative diet. Vegetables, fruits and cereals are suitable nutrient matrices for probiotic bacteria (Martins et al., 2013).

Important point to be considered in the production of non-dairy probiotic foods; selected probiotic cultures retain viability during storage, but do not cause undesirable changes in sensory properties of the product. The choice of appropriate culture and substrate is therefore important. In addition of probiotic strains to such new products, it is important that the viability of the strains during food processing and storage conditions and compatible of product with the microorganism (Kechagia et al., 2013).

Fruit and vegetables, cereals, soy and meat, which are rich sources of protein, minerals, vitamins, dietary fiber, antioxidants and other bioactive substances, are non-dairy foods studied for the suitability of probiotic survival and stability (Min 2018). Among the new food matrices tested as probiotic carriers, foods such as fruit and vegetable juices, minimally processed fruits, raw and fermented vegetables, olives, artichokes and cereals showed promising results (Martins et al., 2013). Table 2 shows examples of recently developed non-dairy probiotic products (Kumar et al., 2015).

Table 2. List of Some Non-dairy Probiotic Products Developed Recently (Adapted from Kumar et al., 2015)

Fruit and Vegetable based	Cereal based	Soy based
Vegetable-based drinks	Cereal-based puddings	Non fermented soy-based frozen desserts
Fermented banana pulp	Rice-based yogurt	Fermented soymilk drink
Fermented banana	Oat-based drink	Soy-based stirred yogurt-like drinks
Beets-based drink	Oat-based products	Soy based products
Tomato-based drink	Oat milk	Soyghurt
Many dried fruits	Oat, barley, and malt based	Soy curd
Green coconut water	Yosa (oat-bran pudding)	Soy product fermented with Kefir
Peanut milk	Wheat, rye, millet, maize, and other cereals fermented probiotic beverages	
Cranberry, pineapple, and orange juices	Malt-based drink	<b>Other</b>
Ginger juice	Boza (fermented cereals)	Starch-saccharified probiotic drink
Cabbage juice	Malt fermented probiotic beverages	Meat products
Carrot juice	Mixed cereal beverage	Meat based products
Onion	Bread and baked products	Dry-fermented sausages
Probiotic banana puree	Sorghum based 'Sorghurt'	
Non fermented fruit juice beverages	Pseudo cereals (amaranth, buckwheat)	
Plum juice		
Cashew apple juice		
Table olives		
Fruit juices (mango, sapota, grape)		

### Fruit and Vegetable Based Probiotic Products

Fruits and vegetables are considered healthy foods due to the content of functional food components such as minerals, vitamins, dietary fibers and antioxidants. Unlike dairy products, fruits and vegetables do not contain allergens, lactose and cholesterol that adversely affect certain parts of the population. Furthermore, advances in the latest technology allow changes in some structural properties of fruit and vegetable matrices such as pH modification, which can make fruits and vegetables ideal substrates for probiotic bacterial presentation to humans (Granota et al., 2010; Awaisheh 2012; Saadiya et al., 2018).

Accordingly, several types of probiotic fruit and vegetable products such as fruit and vegetable juices, dried fruits, fermented vegetables and vegetarian desserts have been developed and marketed (Awaisheh 2012). In addition to taste and flavor, fruit and vegetable juices are one of the most studied, developed and consumed probiotic fruit and vegetable products with their acceptability by all age and economic groups (Awaisheh 2012; Kumar et al., 2015). A wide range of probiotic strains, in particular *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* species such as *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum*, *L. fermentum* and *B. bifidum* has been widely used in the development of many fruit and vegetable products, especially including fruit juices such as orange, pineapple, blueberry, cashew apple, tomato, cabbage, beet and carrot juice (Awaisheh 2012). The increase in the number of individuals with lactose intolerance, dyslipidemia and vegetarianism reinforces the importance of developing non-dairy probiotic products such as fruits and vegetables. Fruits and vegetables contain nutrients that support the development of probiotic cultures (Martins et al., 2013).

Fruit juices offer many advantages. Firstly, they are a rich source of nutrients and unlike dairy products, eliminate the necessity of using starting cultures and therefore do not compete for foods with probiotic cultures. Secondly, fruit juices also contain sugar to support the development of probiotics. Thirdly, fruit juices spend much less time in the stomach and so that probiotic species spend less time on the hard-acidic environment of the stomach is another advantage (Kumar et al., 2015). Finally, fruit juices have negative effects on some pathogenic microorganisms (Perricone et al., 2015). Fruit, vegetables and mixed vegetable juice are used for this purpose (Kumar et al., 2015). Carrots, beets and cabbage are the most popular vegetable based probiotic products (Sridharan and Das, 2019). Products containing probiotic bacteria have a constantly expanding world market due to consumer demand due to potential health benefits. Products made from fruits and vegetables, such as beverages, purees, fermented vegetables, table olives and minimally processed fruits, have also been used (Martins et al., 2013). Currently, fruit and vegetable based probiotic products are already available in the American and European markets. Commercial products include fermented and non-fermented fruits and vegetables, organic probiotic drinks and dried fruits enriched with these microorganisms. These products have a healthy appeal that attracts consumers (Martins et al., 2013). The idea of combining the natural nutritional content of fruit and vegetables with the added value of probiotics makes these products ideal substrates (Granota et al., 2010; Perricone et al., 2015). These milk-free, soy-free, wheat-free and vegan functional drinks meet an important preference by a large part of the population. Many types of probiotic strains have been used to develop various beverages such as oranges, pineapples, tomatoes, cabbage, beets and carrots (Kumar et al., 2015).

*L. plantarum* LA39, *L. plantarum* C3, *L. casei* A4 and *L. delbrueckii* D7 strains were added to tomato juice and it was stated that tomato juice could be offered to consumers as a healthy and non-dairy-free beverage due to the high number of LABs remaining under storage conditions. In another study on the production of probiotic cabbage juice using *L. plantarum* C3, *L. casei* A5 and *L. delbrueckii* D7, the researchers reported that fermented cabbage juice may be a healthy beverage alternative to vegetarian and lactose allergy consumers (Soyuçok and Kılıç, 2017; Sridharan and Das, 2019). In another study, probiotic culture *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* were added to orange, pineapple and cranberry and their survival time was investigated (Soyuçok and Kılıç, 2017). The suitability of fermented pomegranate juice was tested by using *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, and it was proved that pomegranate juice was a suitable probiotic drink with the observing desired microbial growth and viability (Song et al., 2012).

### Cereal and Soy Based Probiotic Products

The cereals are one of the basic foods consumed daily throughout the world with its complex nutritional composition. In addition, the cereals are good substrates for the development of probiotic strains and can function as a prebiotic that induces the development of probiotic LAB by indigestible components such as dietary fiber and oligosaccharides in the cereal matrix (Kumar et al., 2015).

The cereals and legumes are an important part of the diet and provide essential macro nutrients other than vitamins, minerals and fiber. As an indigestible source of carbohydrate, it can act as prebiotics by selectively stimulating the growth of *Lactobacilli* and *Bifidobacterians* present in the colon (Sridharan and Das, 2019).

The majority of cereal-based fermented foods contain  $\beta$ -glucan-rich oats and/or barley as a medium for probiotic bacteria. The oat-based probiotic beverages are the most common and promising products among cereal products. This is attributed to the presence of the  $\beta$ -glucan component. The addition of pulses and fruit to cereal based products increased the overall nutritional quality and taste. The fruit aroma helps mask the acidic flavor to some degree and thus becomes more acceptable to the consumer. Specifically, cereal-based probiotic products were found to be more acceptable than fruit / vegetable-based products (Sridharan and Das,

2019). The soybean and its derivatives have attracted attention from worldwide researchers, especially because of the quantity and quality of the protein. The soy protein provides as a good amino acid profile. In addition, soy is a source of soluble fiber, magnesium, phosphorus, vitamin K, riboflavin, thiamine and folic acid. Thus, soy products can be a good culture medium for the inoculation and development of probiotic strains. The main probiotic bacteria examined for growth in soy beverages are *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum* and *bifidobacteria* (Granota et al. 2010). The soy milk is suitable for the development of LAB and *bifidobacteria* (Song et al., 2012). The experiments show that soy products such as soybeans, soy-based yogurt, and soy cheese are a good substrate for the growth of probiotic bacteria (Awaisheh 2012). Researches have been shown that probiotic soy based products are successful in preserving probiotic and sensory properties along with fruit juices. These products stand out among non-dairy probiotic products due to their health benefits and positive effects on bacterial populations in the gastrointestinal tract (Granota et al. 2010). The soy is often used as an alternative to milk because it is convenient and inexpensive for the growth of probiotic microorganisms. The soy milk is used both alone and for the development of probiotic drinks by mixing with cereal, vegetable and various substrates (Soyuçok and Kılıç, 2017). The rice is also seen as an economical and useful tool for probiotic foods. (Awaisheh 2012). Many cereals have also been reported to support the development of probiotics. It was found that malt medium promotes the development of *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* and *L. reuteri* strains, and wheat and barley extracts under acidic conditions (pH 2.5) have an important protective effect on the viability of *L. planidium*, *L. acidophilis* and *L. reuteri*. Probiotics have been reported to survive on a corn-based fermented substrate. *L. reuteri*, *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* showed a good improvement in corn mash with barley malt added (Song et al., 2012). There are many studies on the potential of oats used as substrates to develop probiotic products. Non-dairy oat-based products have been shown to improve the survival of probiotic strains such as *L. reuteri*, *L. acidophilus* and *B. bifidum* (Awaisheh 2012).

### Meat Based Probiotic Products

Although probiotic-containing approaches to meat products are not entirely new, only a few producers see fermented meat products as carriers for probiotics. In 1998, several meat products containing probiotics were commercialized. Germany is the first country to produce probiotic salami using the probiotic LAB (Soyuçok and Kılıç, 2017). Meat is a highly nutritious food with a high degree of nutrient bioavailability. Due to its composition and structure, meat is considered an excellent tool for probiotics. It has also been found that meat has a protective effect against the lethal effect of LAB. The most studied and processed probiotic meat products are fermented sausages. In addition to the high nutritional value, the characteristics of this type of meat product have make it an ideal food matrix for probiotic distribution to humans. Probiotic bacteria does not alter the sensory properties of the product and the viability of the probiotic bacteria is not reduced as no heat treatment is applied (Awaisheh 2012).

Commercial application of probiotic bacteria in meat products is not yet common. The food industry is trying to improve the quality characteristics of meat products and to extend the shelf life of probiotic bacteria by maintaining a high level of viable cells. Many factors, such as high curing salt content, low pH, low water activity and heat treatment, may affect the activity of probiotics in fermented meat products. However, the number of studies has proven that it is appropriate to use selected probiotic bacteria as probiotic cultures in fermented sausages (Shori 2015).

Meat is mainly used as an alternative to milk-based probiotic foods in the form of sausages (Kumar et al., 2015). Fermented sausage eaten without cooking is considered a good means of transferring probiotics to the intestines because cells can be embedded in protein and fat in the sausage matrix (Min et al., 2018). Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro (2010) found that the initial inoculum of the probiotic *L. plantarum* 299V strain, which was  $10^5$  CFU / g, increased to  $10^8$  CFU / g after fermentation. *L. gasseri* JCM1131 has been shown to be useful as a potential probiotic strain in application and safety in meat fermentation (Awaisheh 2012). They found that the number of hydroperoxide in dry fermented pork produced by the addition of probiotic *L. acidophilus* was lower than that of synthetic antioxidant added meats. The addition of *E. faecalis* in dry fermented sausage production resulted in a decrease in the number of *Enterobacter* spp. and *S. aureus*, it was also noted that the addition of the same probiotic bacteria to beef minced meat inhibited the growth of *E. coli* O157, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*. It has been observed that uncured fermented sausages containing probiotic culture have proper oxidation activity and this is preserved during storage (Soyuçok and Kılıç, 2017).

## CONCLUSION

Although dairy products constitute the majority of probiotic products today, the trend towards non-dairy probiotic foods is increasing day by day. This is important in the production of new functional foods. Unlike dairy products, fruit juices, vegetables and cereals are new substrates used in the development of probiotic products. It is stated that non dairy based probiotic foods would be beneficial to be consumed by people especially have vegan dietary habit, allergic to milk proteins, lactose intolerance and with high cholesterol. Studies on fruit and vegetable juices have shown that these foods are suitable food matrices for probiotic bacteria. Cereals are an important substrate because they are easily used by probiotics. Oat, barley and malt substrates support the development of probiotic cultures by allowing lactobacilli to tolerate harsh environmental conditions. Soy is widely used in the development of probiotic drinks that are alternative to milk because it is convenient and inexpensive for the growth of probiotic microorganisms. Thanks to such successful candidates, there is a great potential for developing probiotic products that are new non-dairy products.

## REFERENCES

- Awaisheh SS 2012. Probiotic food products classes, types, and processing. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Bansal S, Mangal M, Sharma SK, Gupta RK 2016. Non-dairy based probiotics: A healthy treat for intestine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(11), 1856-1867.
- Çakır İ, Çakmakçı L 2003. Laktobasillus ve bifidobakterlerde bazı probiyotik özelliklerin belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi, Ankara, Türkiye 93s.*
- Çelikel A, Göncü B, Akın MB, Akın MS 2018. Süt ürünlerinde probiyotik bakterilerin canlılığını etkileyen faktörler. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 8(1/2), 59-68.
- Dey G 2018. Non-dairy Probiotic Foods: Innovations and Market Trends. In *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries* (pp. 159-173). Springer, Cham.
- Granato D, Branco GF, Cruz AG, Faria JD AF, Shah NP 2010. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455-470.
- Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JA 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Kandylis P, Pissaridi K, Bekatorou A, Kanellaki M, Koutinas AA 2016. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58-63.
- Karimi R, Mortazavian AM, da Cruz AG 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science & Technology*, 91(3), 283-308.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN nutrition*, 2013.
- Kumar BV, Vijayendra SVN, Reddy, OVS 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52(10), 6112-6124.
- Manigandan T, Mangaiyarkarasi SP, Hemalatha R, Hemalatha VT, Murali NP 2012. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Biomedical & Pharmacology Journal*, 5(2), 295.
- Martins EMF, Ramos AM., Vanzela ESL, Stringheta PC, de Oliveira Pinto CL, Martins JM 2013. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51(2), 764-770.
- Min M 2018. *Survival and sensory assessment of probiotic bacteria on non-dairy foods* (Doctoral dissertation, Lincoln University).
- Min M, Bunt CR, Mason SL, Hussain MA 2018. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-16.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of food science and technology*, 52(12), 7577-7587.
- Panghal A, Janghu S, Virkar K, Gat Y, Kumar V, Chhikara N 2018. Potential non-dairy probiotic products—a healthy approach. *Food bioscience*, 21, 80-89.
- Perricone M, Bevilacqua A, Altieri C, Sinigaglia M, Corbo M 2015. Challenges for the production of probiotic fruit juices. *Beverages*, 1(2), 95-103.
- Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.

- Ranadheera C, Vidanarachchi J, Rocha R, Cruz A, Ajlouni S 2017. Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 67.
- Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y 2010. Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27(1), 1-11.
- Saadiya AR, Tabeen J and Poonam S 2018. Non-Dairy Probiotics – An Emerging Trend in Health Care Products. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 7(10): 131-145.
- Shori AB 2015. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423-431.
- Song D, Ibrahim S, Hayek S 2012. Recent application of probiotics in food and agricultural science. In *Probiotics*. IntechOpen.
- Soyuçok A, Kılıç GB 2017. Non-Dairy Probiotic Foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5(12), 1615-1625.
- Sridharan S, Das KMS 2019. A Study on Suitable Non-Dairy Food Matrix for Probiotic Bacteria–A Systematic Review. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7(1), 05-16.
- Taşdemir A 2017. Probiyotikler, Prebiyotikler, Sinbiyotikler. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 2(1), 71-88.
- Upadhyay N, Moudgal V 2012. Probiotics: A review. *JCOM*, 19(2), 76-84.
- Uymaz B 2010. Probiyotikler ve Kullanım Alanları. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 16(1).
- Wang J, Yang K, Liu M, Zhang J, Wei X, Fan M 2018. Screening for potential probiotic from spontaneously fermented non-dairy foods based on in vitro probiotic and safety properties. *Annals of microbiology*, 68(12), 803-813.
- Yangılar F 2015. Use of Probiotic Microorganisms for Bio-Protective Aims. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 20(1), 119-130.
- Yeşilova Y, Sula B, Yavuz E, Umak D. 2010. Probiyotikler. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, XXI (1):49-56.

## Molecular imprinted voltammetric sensor based on carbon nitride nanotubes for determination of chlorpyrifos

Mehmet Lütfi Yola<sup>1</sup>, Necip Atar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

<sup>2</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey

Corresponding author: e-mail: mehmetyola@gmail.com

### Abstract

In this report, a novel molecular imprinted voltammetric sensor based on carbon nitride nanotubes (C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs) modified glassy carbon electrode (GCE) was presented for determination of chlorpyrifos (CHL). The developed surfaces were characterized using scanning electron microscope (SEM) and x-ray photoelectron spectroscopy (XPS). MEL imprinted GCE was prepared via electropolymerization process of 100 mM phenol as monomer in the presence of phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.0) containing 25 nM CHL. The linearity range and the detection limit of the method were calculated as  $1.0 \times 10^{-10}$  -  $5.0 \times 10^{-9}$  M and  $1.0 \times 10^{-11}$  M, respectively. The stability and reproducibility of the voltammetric sensor were also reported.

**Keywords:** Molecular imprinting; Chlorpyrifos; Carbon nitride nanotubes; Determination

### INTRODUCTION

CHL (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate) is a crystalline organophosphate insecticide. It is used widely in a variety of agricultural and urban pest control scenarios. It has a low water solubility and high soil sorption coefficient (Racke, 1993). CHL as other organophosphate compounds produces toxic effects by inhibiting the acetylcholinesterase enzyme activity, which is responsible for the hydrolysis of acetylcholine (Kumaravel and Chandrasekaran, 2015). CHL is a moderately toxic pesticide when compared to many other pesticides. However, its long-term health effects are the subject of increasing concern in recent years (Cometa et al., 2007; Ray, 1998).

Graphitic carbon nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), the most stable allotrope of carbon nitride materials in ambient environment, has recently attracted great attention. g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> has a layered structure involving weak van der Waals interaction between the adjacent C-N layers. Therefore, inspired by the research of graphene, much work has been conducted for the achievement of the ultra-thin g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) nanosheets for photocatalysis or biosensing (Tian et al., 2013; Zheng et al., 2012). In addition to its merits of high hardness, reliable stability and low cost have endowed g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> as a better material for photocatalysis (Ge et al., 2012; Li et al., 2014b). The molecular imprinting technique is the one of the most effective method in development of sensitive method. The technique is based on polymerization which is formed around the analyte molecule. Due to such a polymerization, the technique forms specific cavities relating to target molecule (Gupta et al., 2014; Yola et al., 2014).

The CHL imprinted voltammetric sensor based on carbon nitride nanotubes was firstly developed in this study and applied to milk samples. The preparation and characterization of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs and utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> were performed. The developed system is sensitive, rapid, and easy and might be preferred to the other methods. In addition, the system provides a novel method for the sensitive determination of CHL in real samples.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

CHL was obtained from Sigma–Aldrich. The stock solutions of CHL (1.0 mM) were prepared by HPLC grade acetonitrile (MeCN) and the stock solution was diluted with 0.1 M PBS (pH 7.0). Phenol, MeCN, ethanol, isopropyl alcohol (IPA) and activated carbon were purchased from Sigma–Aldrich (USA).

#### Instrumentation

All electrochemical experiments were performed using out IviumStat (U.S) equipped with C3 cell stand. Argon gas was passed through the solutions during experiments for about 10 min. PHI 5000 Versa Probe (Φ ULVAC-PHI, Inc., Japan/USA) was utilized for XPS analysis with monochromatized Al K $\alpha$  radiation (1486.6 eV) as an x-ray anode operated at 50 W. SEM is ZEISS EVO 50 analytic microscope (Germany).

#### Preparation of utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs

The bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> was synthesized by direct thermal polycondensation of melamine according to previous report (Zhang et al., 2015). Thereafter, the as-synthesized bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (0.1 g) powder was ultrasonicated for about

12 h in 100 mL water and utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets were obtained. The formed suspension was centrifuged at 5000 rpm to remove the residual unexfoliated g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> particles. Finally, the suspension was dried until the powder was obtained. After preparing the utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> suspension (1.0 mg mL<sup>-1</sup>), the suspension was subject to hydrothermal treatment at 150 °C for 24 h at a heat rate of 1.0 °C/min. The final product was obtained by drying at 60 °C for 24 h and thermal treatment at 120°C for 24 h, respectively. The product was denoted as C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs (Li et al., 2014a).

#### Procedure for the electrode preparation

GCE was cleaned according to our previous reports (Yola et al., 2015). After that, 15 µL of utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs suspensions were dropped onto the clean GCE. Then, the solvent was evaporated by an infrared lamp.

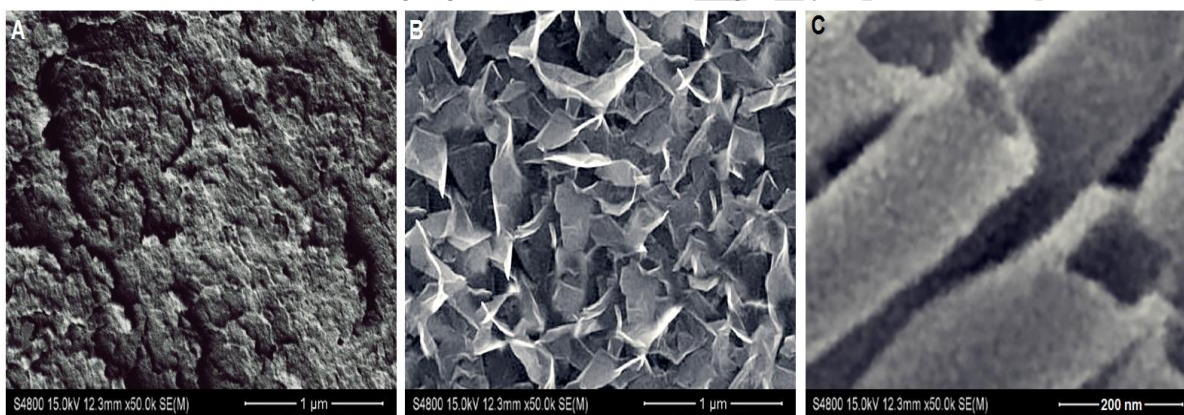
#### Preparation of CHL imprinted voltammetric sensor

The CHL imprinted surface on C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE) electrode was constructed by using CV for 10 cycles in the presence of 100 mM phenol in PBS (pH 7.0) containing 25 nM CHL at a scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup> between 0.0 V and +1.0 V. The CHL non-imprinted surface (NIP) was performed under the same experimental conditions without CHL for a control experiment.

## RESULTS AND DISCUSSION

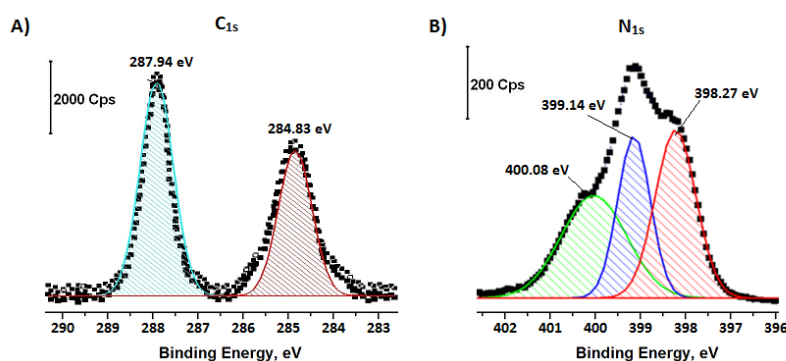
### Characterization of nanomaterials

The bulk layered structure of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> can be observed in Fig. 1A. As expected, the bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> is successfully exfoliated to form utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets after ultrasonic crashing (Fig. 1B). The completed nanotube is shown in the SEM image of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs (Fig. 1C). This finding indicates that the tubular nanostructure is constructed by curling utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets during the hydrothermal treatment.



**Figure 27.** SEM images of the morphological evolution from bulk layered structure into nanotube: (A) bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>; (B) utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets; (C) completed nanotube

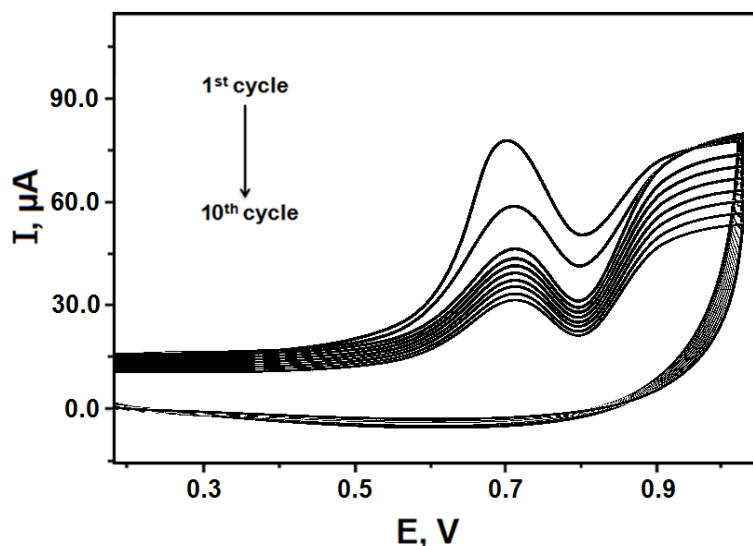
To verify the chemical transformation from melamine to carbon nitride, the high-resolution C<sub>1s</sub> and N<sub>1s</sub> spectra of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs were measured, as shown in Fig. 2. In the case of C<sub>1s</sub> spectrum (Fig. 2A), two distinct peaks occur at the binding energies of 287.94 and 284.83 eV, respectively. The C<sub>1s</sub> peak centered 287.94 eV is assigned to the carbon atom bonded to three nitrogen atoms in the C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs, whereas the 284.83 eV peak corresponds to C-C bond. The N<sub>1s</sub> spectrum (Fig. 2B) can be well deconvoluted into three different peaks at binding energies of 400.08, 399.14 and 398.27 eV, respectively.



**Figure 2.** The narrow region XPS spectra of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs for the deconvolution spectra of the C<sub>1s</sub> and N<sub>1s</sub>

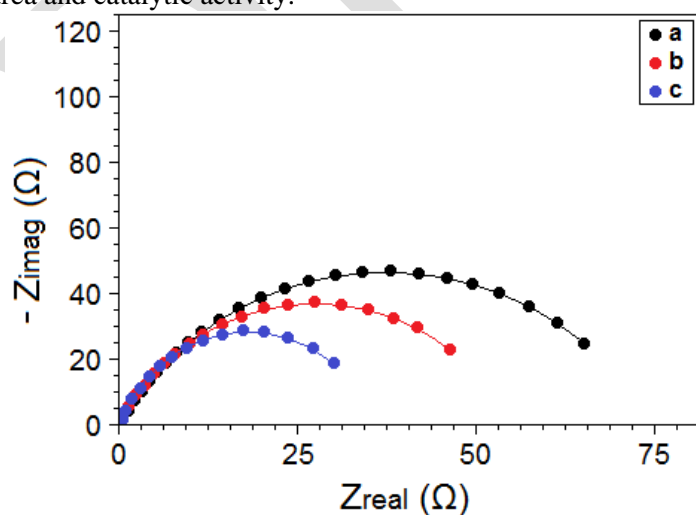
### CV and EIS studies

To form imprinted polymer on the C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, CV experiment was performed in the presence of phenol as monomer and CHL as template according to our previous papers (Yola et al., 2016). Fig. 3 shows that the oxidation potential of phenol was recorded at a peak potential of 0.68 V in first scan. A current signal at about 0.7 V was corresponded to the oxidation of phenol monomer. After the first scan, the oxidation current decreased. When the number of cycles reached at 10, the peaks disappeared. Hence, we can say that the growth of a polymeric film on the C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE was formed. There are the electrostatic interactions and hydrogen bonding between phenol monomer and CHL molecules on the electrode surface. After that, the removal of CHL molecules on the electrode surface was performed by using 1.0 M NaCl solution. Because there are specific nano-cavities for CHL molecules on the electrode surface, the obtained electrode was used as working electrode for CHL detection.



**Figure 3.** Cyclic voltammogram for the electrochemical polymerization of phenol (100 mM) in the presence of CHL (25 nM) in PBS (pH 7.0) at scan rate of 100 mV s<sup>-1</sup> for 10 cycles

The EIS graph (curve a of Fig. 4) demonstrated that the value of charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) of bare GCE was calculated as 72 ohm. When the bare GCE was modified with utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, the value of  $R_{ct}$  was lower (53 ohm) (curve b of Fig. 4). Because of the lower value, we can say that the utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> did not decrease the rate of electron transfer. When the bare GCE was modified with C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs, the value of  $R_{ct}$  of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE was lower than that of utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/GCE (curve c of Fig. 4). Thus, the C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs shows increased the surface active area and catalytic activity.

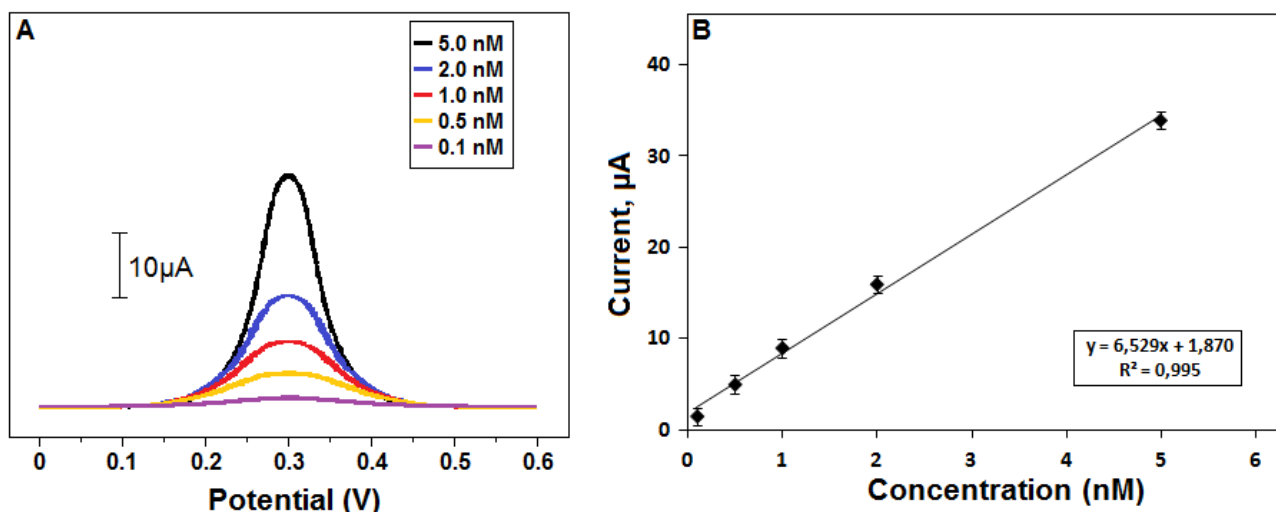


**Figure 4.** EIS of (a) bare GCE; (b) utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/GCE; (c) C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE in 1.0 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> solution in 0.1 M KCl



### Linearity range of proposed sensor

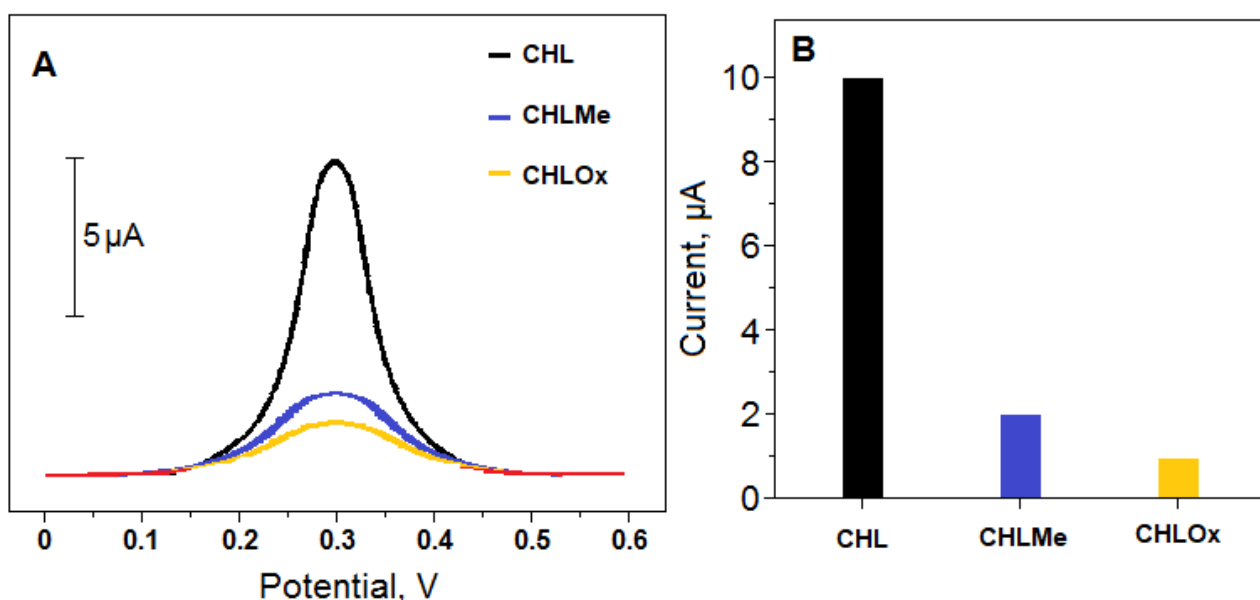
The voltammograms with increasing concentration of CHL (Fig. 5A) show that the signals increased linearly with amount of CHL. The calibration graph was related to the mean value of six measurements. The regression equation of CHL (Fig. 5B) is  $y = 6.529x + 1.870$ . Limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for CHL were obtained as  $1.0 \times 10^{-10}$  M and  $1.0 \times 10^{-11}$  M, respectively.



**Figure 5.** (A) SWVs of the prepared voltammetric sensor against different CHL amount in pH 7.0 of PBS; (B) The calibration curve of CHL

### Selectivity, Stability and Reproducibility of the imprinted voltammetric sensor

The selectivity of CHL imprinted sensor in the presence of chlorpyrifos-methyl (CHLMe) and chlorpyrifos-oxon (CHLOx) as competitors was investigated. CHL imprinted sensor was 5.0 and 10.0 times more selective for CHL than CHLMe and CHLOx, respectively (Fig. 6A and 6B). According to the voltammograms, CHL imprinted sensor has good selectivity. The stability of one MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE was investigated. After 30 days, the signal is 97.14% of the original peak current. This stability shows that MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE can be used in long-term for determination of CHL. The reproducibility was estimated with six MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE electrodes that were fabricated independently by the same procedure. The RSD is 0.34% for peak current measuring in  $5.0 \times 10^{-9}$  CHL which demonstrates the reliability of the fabrication procedure.



**Figure 6.** (A) SWVs of the prepared voltammetric sensors against 1.0 nM CHL, CHLMe and CHLOx; (B) The values of peak current of CHL, CHLMe and CHLOx

## CONCLUSIONS

The CHL imprinted voltammetric sensor based on carbon nitride nanotube was developed for analysis of CHL. The prepared nanomaterials were characterized well by various techniques. The prepared imprinted voltammetric sensor demonstrated high sensitivity towards CHL with a detection limit of  $1.0 \times 10^{-11}$  M. In addition, the prepared MIP sensor is selective and stable. The developed MIP sensor has potential to be applied to the routine analysis of CHL in real samples.

## REFERENCES

- Cometa MF, Buratti FM, Fortuna S, Lorenzini P, Volpe MT, Parisi L, Testai E, Meneguz A, 2007. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice. *Toxicology* 234: 90-102.
- Ge L, Zuo F, Liu J, Ma Q, Wang C, Sun D, Bartels L, Feng P 2012. Synthesis and Efficient Visible Light Photocatalytic Hydrogen Evolution of Polymeric g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Coupled with CdS Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry C* 116: 13708-13714.
- Gupta VK, Yola ML, Atar N, 2014. A novel molecular imprinted nanosensor based quartz crystal microbalance for determination of kaempferol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 194: 79-85.
- Kumaravel A, Chandrasekaran M, 2015. Electrochemical Determination of Chlorpyrifos on a Nano-TiO<sub>2</sub>/Cellulose Acetate Composite Modified Glassy Carbon Electrode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 6150-6156.
- Li K, Yan L, Zeng Z, Luo S, Luo X, Liu X, Guo H, Guo Y 2014a. Fabrication of H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>-doped carbon nitride nanotubes by one-step hydrothermal treatment strategy and their efficient visible-light photocatalytic activity toward representative aqueous persistent organic pollutants degradation. *Applied Catalysis B: Environmental* 157: 141-152.
- Li Q, Zhang N, Yang Y, Wang G, Ng DHL 2014b. High Efficiency Photocatalysis for Pollutant Degradation with MoS<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Heterostructures. *Langmuir* 30: 8965-8972.
- Racke KD, 1993. Environmental Fate of Chlorpyrifos, in: Ware, G.W. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1-150.
- Ray DE 1998. Chronic effects of low level exposure to anticholinesterases — a mechanistic review. *Toxicology Letters* 103: 527-533.
- Tian J, Liu Q, Asiri AM, Al-Youbi AO, Sun X 2013. Ultrathin Graphitic Carbon Nitride Nanosheet: A Highly Efficient Fluorosensor for Rapid, Ultrasensitive Detection of Cu<sup>2+</sup>. *Analytical Chemistry* 85: 5595-5599.
- Yola ML, Atar N, Eren T 2014. Determination of amikacin in human plasma by molecular imprinted SPR nanosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 198: 70-76.
- Yola ML, Eren T, Atar N, 2015. A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide: Application to selective determination of tyrosine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical* 210: 149-157.
- Yola ML, Gupta, VK, Atar N, 2016. New molecular imprinted voltammetric sensor for determination of ochratoxin A. *Materials Science and Engineering: C* 61: 368-375.
- Zhang J, Zhu Z, Di J, Long Y, Li W, Tu Y 2015. A Sensitive Sensor for trace Hg<sup>2+</sup> Determination Based on Ultrathin g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Modified Glassy Carbon Electrode. *Electrochimica Acta* 186: 192-200.
- Zheng Y, Liu J, Liang J, Jaroniec M, Qiao SZ 2012. Graphitic carbon nitride materials: controllable synthesis and applications in fuel cells and photocatalysis. *Energy & Environmental Science* 5: 6717-6731.

## Platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes with molecularly imprinted polymer for determination of bilirubin

Mehmet Lütfi Yola<sup>1</sup>, Necip Atar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

<sup>2</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey

Corresponding author e-mail: mehmetyola@gmail.com

### Abstract

In this report, a new electrochemical sensor based on molecular imprinting polymer (MIP) and platinum nanoparticles (Pt NPs)/carbon nitride nanotubes (C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs) nanocomposite was developed for bilirubin (BR) analysis. Firstly, the structures of prepared nanocomposites and surfaces were characterized by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and x-ray diffraction (XRD). After the characterization studies, BR imprinted glassy carbon electrode (GCE) based on Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanocomposite was developed by 100 mM phenol containing 25 nM BR. The linearity range and the detection limit of the molecular imprinted sensor were calculated as  $1.0 \times 10^{-12}$ – $1.0 \times 10^{-10}$  and  $1.5 \times 10^{-13}$  M, respectively.

**Keywords:** Molecular imprinting; Bilirubin; Carbon nitride nanotubes; Platinum nanoparticles

### INTRODUCTION

BR is yellow pigment and poorly soluble in water. The breakdown of old red blood cells causes BR which is in low concentrations. BR is present in the body as two ways. (i) conjugated, (ii) unconjugated. Because of its poorly soluble, it passes to the liver. Its abnormal amounts cause the decomposition of eye and skin. Generally, BR can not include in human urine. If it is present, the significant health problems may form in the body. Owing to this situation, the monitoring of BR concentration is very important by using sensitive analytical methods (Taurino et al., 2014)

Graphitic carbon nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), the most stable allotrope of carbon nitride materials in ambient environment, has recently attracted great attention. g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> has a layered structure involving weak van der Waals interaction between the adjacent C-N layers. Therefore, inspired by the research of graphene, much work has been conducted for the achievement of the ultra-thin g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) nanosheets for photocatalysis or biosensing (Tian et al., 2013; Zheng et al., 2012). In addition to its merits of high hardness, reliable stability and low cost have endowed g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> as a better material for photocatalysis (Ge et al., 2012; Li et al., 2014b). The molecular imprinting technique is the one of the most effective method in development of sensitive method. The technique is based on polymerization which is formed around the analyte molecule. Due to such a polymerization, the technique forms specific cavities relating to target molecule (Gupta et al., 2014). Owing to technological interest of Pt NPs, their applications were crucial during last years. The films with Pt NPs can be utilized for various applications such as optical applications and catalytic activity (Bell, 2003; Cheung et al., 2004).

Firstly, platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes nanocomposite was prepared by hydrothermal treatment. After that, BR imprinted electrodes were formed on platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes modified electrode by cyclic voltammetry (CV). The prepared sensor was sensitive, selective, fast and cheap.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

BR was obtained from Sigma–Aldrich. The stock solutions of BR (1.0 mM) were prepared by distilled water and the stock solution was diluted with 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.0). Chloroplatinic acid (H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>), phenol, melamine, acetonitrile (MeCN), ethanol, isopropyl alcohol (IPA) and activated carbon were purchased from Sigma–Aldrich (USA).

#### Instrumentation

All electrochemical experiments were performed using IviumStat (U.S) equipped with C3 cell stand. Argon gas was passed through the solutions during experiments for about 10 min. PHI 5000 Versa Probe (Φ ULVAC-PHI, Inc., Japan/USA) was utilized for XPS analysis with monochromatized Al K $\alpha$  radiation (1486.6 eV) as an x-ray anode operated at 50 W. SEM is ZEISS EVO 50 analytic microscope (Germany).

### **Preparation of utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs and Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs**

The bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> was synthesized by direct thermal polycondensation of melamine according to previous report (Zhang et al., 2015). Thereafter, the as-synthesized bulk g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (0.1 g) powder was ultrasonicated for about 12 h in 100 mL water and utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets were obtained. The formed suspension was centrifuged at 5000 rpm to remove the residual unexfoliated g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> particles. Finally, the suspension was dried until the powder was obtained. After preparing the utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> suspension (1.0 mg mL<sup>-1</sup>), the suspension was subject to hydrothermal treatment at 150 °C for 24 h at a heat rate of 1 °C/min. The final product was obtained by drying at 60 °C for 24 h and thermal treatment at 120 °C for 24 h, respectively. The product was denoted as C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs (Li et al., 2014a). Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs was synthesized by one-step hydrothermal treatment. Firstly, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (1.0 g) was dispersed into H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> solution (1.0 mM). After the stirring for 30 min, the suspension was subject to hydrothermal treatment at 150 °C. The suspension was dried at 60 °C and Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs was finally obtained.

### **Procedure for electrode preparation**

GCE was cleaned according to our previous reports (Yola et al., 2015). After that, 15 µL of suspensions were dropped onto the clean GCE. Then, the solvent was evaporated by an infrared lamp.

### **Preparation of BR imprinted voltammetric sensor**

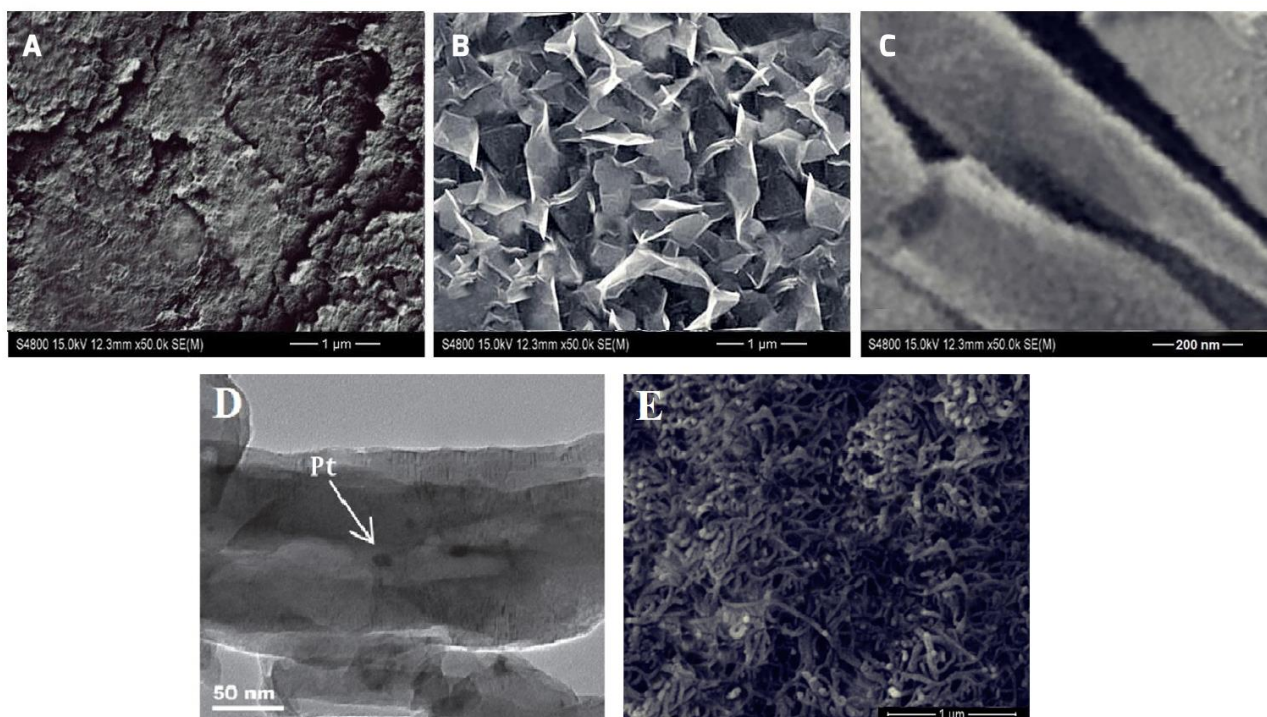
BR imprinted electrochemical sensor (MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE) was prepared by CV for 10 cycles in 100 mM phenol containing 25 nM BR (Supporting electrolyte: 0.1 M, pH 7.0 PBS). In addition, for a control experiment, the imprinted electrochemical sensor without BR (NIP) was prepared.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

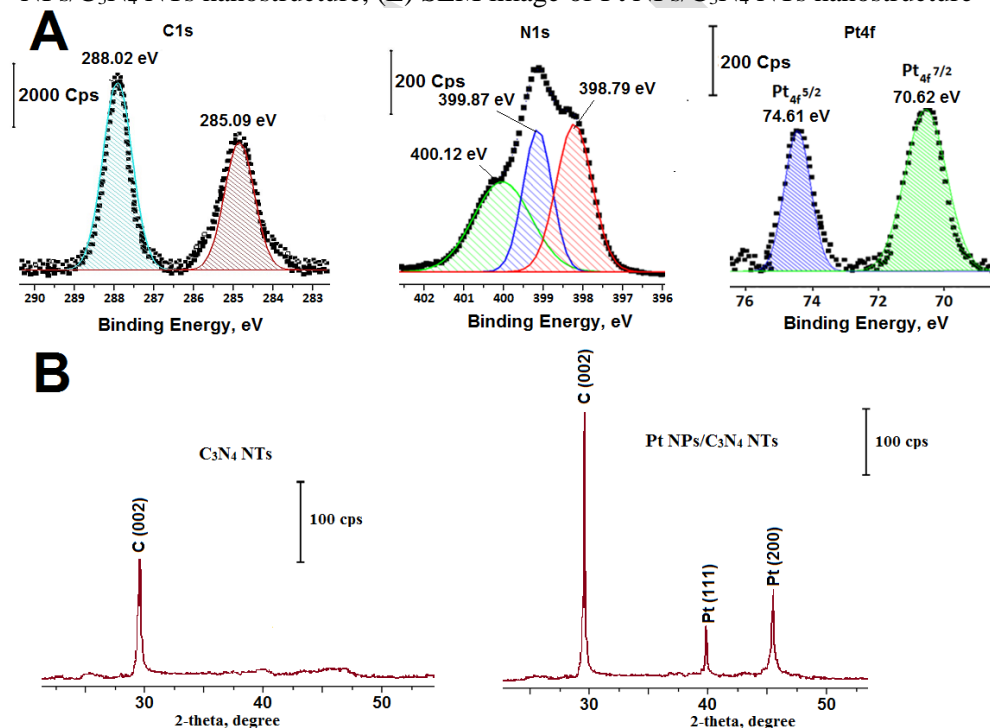
### **Characterization of nanomaterials**

Fig. 1A indicates the bulk structure of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> like graphite structure. In the bulk structure of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, the clear and crisp edges were observed. SEM image of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> shows irregular morphology and varying sizes of the sample. In addition, it suggests that g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> intensively agglomerates about several micrometers in size. After the ultrasonication, the utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> was successfully formed (Fig. 1B). After the hydrothermal treatment of utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> at 150 °C, the formation of tubular carbon nitride occurred. Fig. 1C confirms the hollow and tubular structure of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs. According to Fig. 1C, the hollow and tubular nanostructure was formed by curling utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> at 150 °C. During the hydrothermal treatment, the large quantity of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs in the aligned arrangements occurred. Fig. 1C also showed that C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs had open ends. These C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs have diameters ranging from 75 to 150 nm. The presence of Pt NPs on a lighter and tubular structure is seen clearly (Fig. 1D). The average diameters of spherical Pt NPs as dark dots are 15-20 nm. Hence, we can say that Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure is successfully prepared by one-step hydrothermal treatment. In addition, the formation of Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure was confirmed by SEM image (Fig. 1E). In Figure 1E, a dense layer of spherical Pt NPs was covered on C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure, demonstrating successful combination.

In addition, the XPS analysis of Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure was performed to confirm its structure (Fig. 2A). The two peaks at the binding energies of 288.02 eV and 285.09 eV are seen in the C<sub>1s</sub> spectrum. The peak at 288.02 eV is corresponded to the carbon atom binding with three nitrogen atoms and the peak at 285.09 eV is assigned to C-C bond. The three peaks at 400.12, 399.87 and 398.79 eV in N<sub>1s</sub> spectrum confirms C-N groups of the nanostructure [Electrochim. Acta, 186 (2015) 192-200]. The peaks at 70.62 eV and 74.61 eV were assigned to Pt<sub>4f7/2</sub> and Pt<sub>4f5/2</sub> on Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure. According to XRD analysis (Fig. 2B), C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs show one strong peak at 27.5°, corresponding to the reflection from (002) plane of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs [Energy Environ. Focus, 4 (2015) 107-115]. Compared with C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs, Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanocomposite demonstrates two additional peaks at 40.0°, and 46.1°, corresponding to 111 and 200 faces of platinum, respectively. These results prove that Pt NPs aggregate into C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs during hydrothermal treatment.



**Figure 28.** SEM images of (A) g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>; (B) utg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanolayers; (C) C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs; (D) TEM image of Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure, (E) SEM image of Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs nanostructure



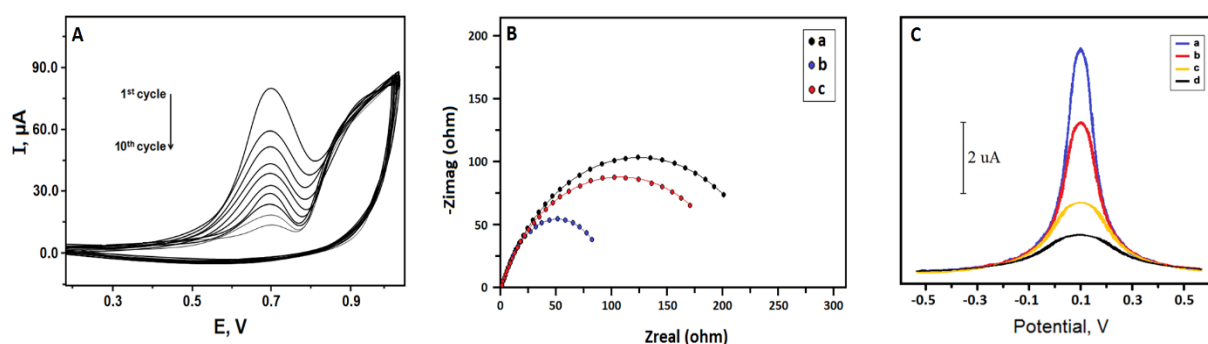
**Figure 2.** (A) Narrow region XPS spectra of Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs, (B) XRD patterns of C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs and Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs

### CV and EIS studies

The polymerization on modified electrode was carried out by CV in 0.1 M PBS (pH 7.0) and the voltammogram is given in Fig. 3A. According to Fig. 3A, the maximum signal was obtained at first cycle. After that, the signals decreased with the cycles. 100 mM phenol containing 25 nM BR was oxidized at 0.72 V. During scanning, the signal began to decrease. This situation showed the formation of imprinted film on Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE.

After the monomer polymerization on Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, charge transfer resistance was obtained as 250 ohm (curve a of Fig. 3B). After performing of desorption of 25 nM BR, the value decreased to 90 ohm (curve b of Fig. 3B). Hence, the formation of imprinted film between active electrode area and redox probe

demonstrates obvious obstruction effect. When the template molecule was rebinded to imprinted film, the value of  $R_{ct}$  is 210 ohm (curve c of Fig. 3B). As a result, the BR molecules block the electrochemical reaction of redox probe. The responses of different imprinted electrodes are compared by SWV (Fig. 3C). The performance of MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (curve a of Fig. 3C) is better than that of the MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (curve b of Fig. 3C) and MIP/GCE (curve c of Fig. 3C). Hence, we can again say that C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/Pt NPs nanocomposite can increase sensitivity and conductivity in comparison with C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs. In addition, NIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE was prepared to investigate the imprinting effect. NIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE shows a small response (curve d of Fig. 3C). The non-specific interaction between monomer and electrode surface resulted in the small response.



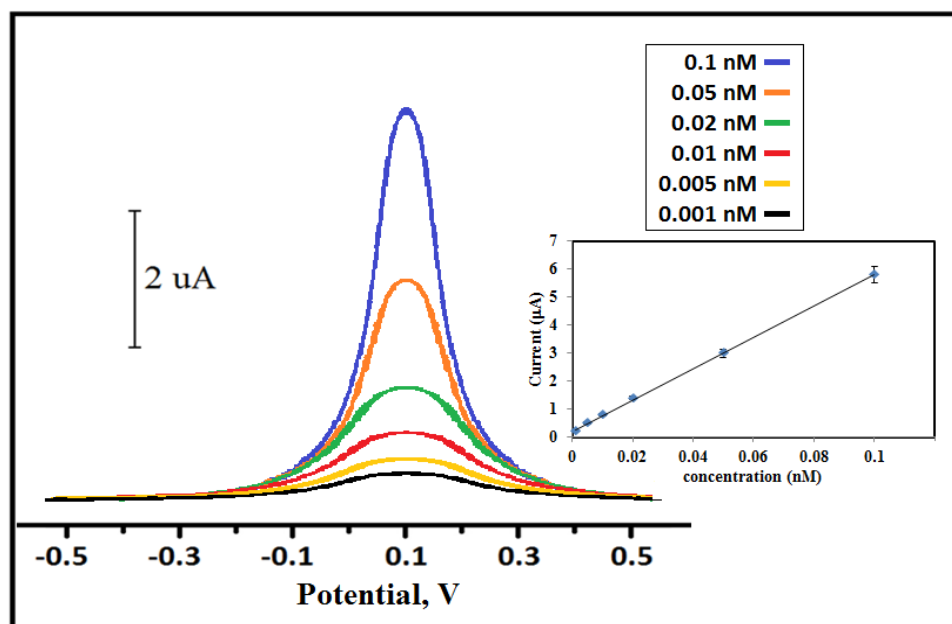
**Figure 3.** (A) The polymerization of 100 mM phenol containing 25 nM BR on Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (Scan rate: 50 mV s<sup>-1</sup>); (B) EIS of (a) MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (with template molecule), (b) MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (removing template), (c) MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (after rebinding of BR) in 1.0 mM [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> solution containing 0.1 M KCl; (C) SWV curves of different imprinted and non-imprinted electrodes in 0.1 M PBS (pH 7.0) after rebinding of 0.1 nM BR (a) MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, (b) MIP/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, (c) MIP/GCE, (d) NIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (frequency of 50 Hz, pulse amplitude of 20 mV, scan increment of 3 mV)

#### Linearity range of proposed sensor

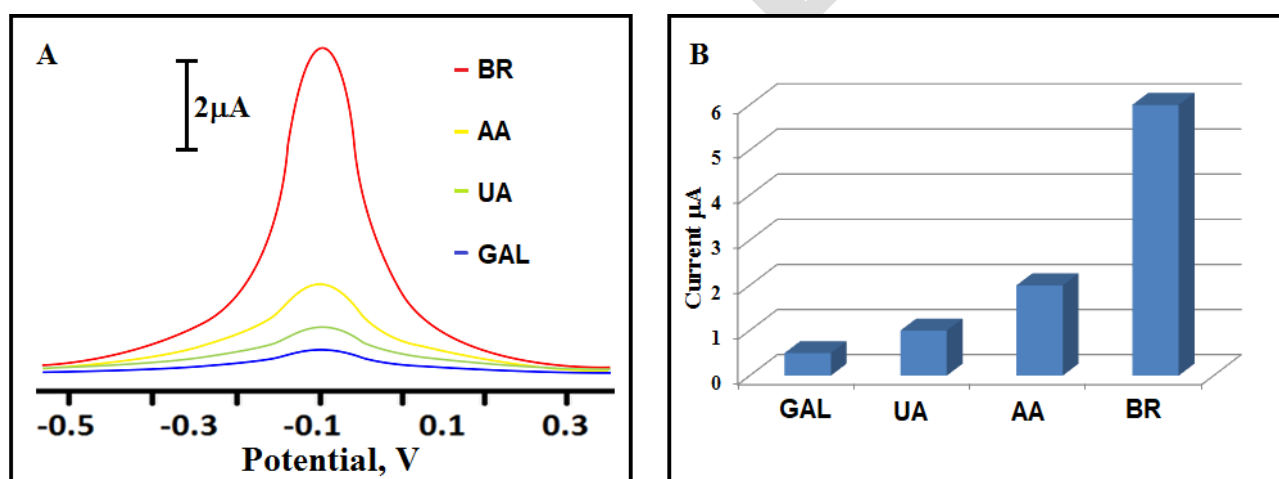
The square wave voltammograms with different concentrations (Fig. 4) show that the signals increase linearly with amount of BR. The calibration graph was related to the mean value of six measurements. The regression equation (inset of Fig. 4) is  $y$  (μA) = 55.923x (nM) + 0.2164. Limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for BR were obtained as  $1.0 \times 10^{-12}$  M and  $1.5 \times 10^{-13}$  M, respectively.

#### Selectivity, Stability, Repeatability and Reproducibility of MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs

To confirm the selectivity of MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, the other experiment in the presence of ascorbic acid (AA), uric acid (UA) galactose (GAL) was performed (Fig. 5A and 5B). BR imprinted electrochemical sensor was more selective at 3.0, 6.0 and 12.0 times for BR than AA, UA and GAL, respectively. The stability of one electrode (MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE) was examined. During 50 days, the signal was frequently measured. The mean value is 98.78% of the first signal. The mean value indicates that MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE is utilized in long-term. In order to show the repeatability of MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE, twenty voltammograms were obtained in the presence of 0.1 nM BR. According to the obtained voltammograms, MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE showed the repeated signals at about 5.8 μA. The reproducibility test was performed with ten different MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs modified electrodes. These imprinted electrodes were fabricated independently by the same procedure. The value of relative standard deviation is 0.21% for current signal in presence of 0.1 nM BR. This situation indicates the reliability of the sensor preparation procedure.



**Figure 4.** (A) SWV curves of MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE (from 0.001 nM BR to 0.1 nM BR in pH 7.0 of PBS: Inset: The calibration curves of BR (frequency of 50 Hz, pulse amplitude of 20 mV, scan increment of 3 mV)



**Figure 5.** (A) SWV curves of the MIP/Pt NPs/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> NTs/GCE for 0.1 nM BR, AA, UA and GAL; (B) The values of peak current of 0.1 nM BR, AA, UA and GAL (frequency of 50 Hz, pulse amplitude of 20 mV, scan increment of 3 mV)

## CONCLUSIONS

In this report, BR imprinted electrochemical sensor based on platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes was prepared. Firstly, platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes nanocomposite was prepared by hydrothermal treatment. In this treatment, the minimal waste formation was observed. After that, BR imprinted electrochemical sensor based on platinum nanoparticles/carbon nitride nanotubes was developed by CV. The linearity range, LOQ and LOD values of proposed sensor were calculated. Finally, the sensor shows high selectivity and sensitivity.

## REFERENCES

- Bell AT 2003. The Impact of Nanoscience on Heterogeneous Catalysis. *Science* 299: 1688-1695.  
 Cheung A, Azevedo GDM, Glover CJ, Llewellyn DJ, Elliman RG, Foran GJ, Ridgway MC 2004. Structural perturbations within Ge nanocrystals in silica. *Applied Physics Letters* 84: 278-280.  
 Ge L, Zuo F, Liu J, Ma Q, Wang C, Sun D, Bartels L, Feng P 2012. Synthesis and Efficient Visible Light Photocatalytic Hydrogen Evolution of Polymeric g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Coupled with CdS Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry C* 116: 13708-13714.

- Gupta VK, Yola ML, Atar N 2014. A novel molecular imprinted nanosensor based quartz crystal microbalance for determination of kaempferol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 194: 79-85.
- Li K, Yan L, Zeng Z, Luo S, Luo X, Liu X, Guo H, Guo Y 2014a. Fabrication of H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>-doped carbon nitride nanotubes by one-step hydrothermal treatment strategy and their efficient visible-light photocatalytic activity toward representative aqueous persistent organic pollutants degradation. *Applied Catalysis B: Environmental* 157: 141-152.
- Li Q, Zhang N, Yang Y, Wang G, Ng DHL 2014b. High Efficiency Photocatalysis for Pollutant Degradation with MoS<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Heterostructures. *Langmuir* 30: 8965-8972.
- Taurino I, Van Hoof V, Magrez A, Forró L, De Micheli G, Carrara S 2014. Efficient voltammetric discrimination of free bilirubin from uric acid and ascorbic acid by a CVD nanographite-based microelectrode. *Talanta* 130: 423-426.
- Tian J, Liu Q, Asiri AM, Al Youbi AO, Sun X, 2013. Ultrathin Graphitic Carbon Nitride Nanosheet: A Highly Efficient Fluorosensor for Rapid, Ultrasensitive Detection of Cu<sup>2+</sup>. *Analytical Chemistry* 85: 5595-5599.
- Yola ML, Eren T, Atar N 2015. A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide: Application to selective determination of tyrosine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical* 210: 149-157.
- Zhang J, Zhu Z, Di J, Long Y, Li W, Tu Y, 2015. A Sensitive Sensor for trace Hg<sup>2+</sup> Determination Based on Ultrathin g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Modified Glassy Carbon Electrode. *Electrochimica Acta* 186: 192-200.
- Zheng Y, Liu J, Liang J, Jaroniec M, Qiao SZ, 2012. Graphitic carbon nitride materials: controllable synthesis and applications in fuel cells and photocatalysis. *Energy & Environmental Science* 5: 6717-6731.



## Graphene oxide with Ag@Au nanoparticles composite for methanol oxidation

Necip Atar<sup>1\*</sup>, Mehmet Lütfi Yola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey

<sup>2</sup>Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

Corresponding author: e-mail: necipatar@gmail.com

### Abstract

In present report, various catalysts based on 2-aminoethanethiol functionalized graphene oxide (AETGO) with bi-metallic nanoparticles such as Ag@Au nanoparticles (Ag@Au NPs) were synthesized. The successful synthesis of nanomaterials and the prepared glassy carbon electrode (GCE) surfaces were confirmed by transmission electron microscope (TEM) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The Ag@Au NPs/AETGO modified GCE also exhibited a higher peak current for methanol oxidation than those of comparable Au NPs/AETGO and Ag NPs/AETGO modified GCE, thus providing evidence for its higher electro-catalytic activity.

**Keywords:** Graphene oxide; Core-shell Nanoparticles; Fuel Cell

### INTRODUCTION

Direct-methanol fuel cells (DMFCs) are proton-exchange fuel cell in which methanol is used as the fuel. The important advantage of these fuel cells is the simplicity of transport of methanol. Methanol as fuel has several advantages such as transport and storage. DMFCs have been used for the production of energy for the several years. A sulfuric acid or perchloric acid as supporting electrolyte is uses in the DMFCs owing to removing of the CO<sub>2</sub> during the electrochemical progress (Gupta et al., 2014).

Especially, various nanomaterials and nanoparticles can be used for the development of energy, sensor and catalytic effect (Sanghavi et al., 2015; Yola and Atar, 2014). In addition, significant progress has been performed in the production of carbon-supported catalysts for fuel cells with suitable cost (Kim et al., 2010). Nevertheless, there are some important problems such as low catalytic performance for methanol and ethanol oxidation. Hence, in order to increase this performance, the novel nanomaterials such as graphene/graphene oxide and carbon nanotubes become very significant (Yola et al., 2014). Recently, graphene/graphene oxide has been considered a “rising star” carbon material because of its unique properties, including superior mechanical strength, low density and high heat conductance. Many applications have been developed based on its mechanical, electrical and chemical properties. Some of these applications are graphene-polymer composites, batteries (Yoo et al., 2008), fuel cells (Seger and Kamat, 2009), drug delivery and biosensors (Niyogi et al., 2006).

In the present report, the preparation and characterization of nanocomposites such as Au NPs/AETGO, Ag NPs/AETGO and Ag@Au NPs/AETGO were performed. After that, GCE surfaces were modified with these nanomaterials by using infrared heat lamp. The developed surfaces were characterized by chronoamperometry (CA) measurements. After the characterizations of the glassy carbon surfaces, these catalysts were investigated their effects in fuel cell applications.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

All chemicals that used in the experiments were reagent grade and were used as received following; graphite powder (Merck, Grmany), sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck, Germany), potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, Merck, Germany), phosphorus pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Merck, Germany), 2-aminoethanethiol (AET, Merck, Germany), potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>, Merck, Germany), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck, Germany), methanol (Merck, Germany), N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimidehydrochloride (EDC, Sigma-Aldrich, USA), ethanol (Sigma-Aldrich, USA), isopropyl alcohol (IPA, Sigma-Aldrich, USA), HAuCl<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, USA), sodium citrate (Merck, Germany), HPLC grade acetonitrile (MeCN, Sigma-Aldrich, USA), perchloric acid (HClO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich, USA), and other chemicals were reagent grade quality and were used as received. The ultra-pure water with resistance of 18.3 MU cm (Human Power 1+ Scholar purification system) was used in the experiments of aqueous media.

#### Instrumentation

All electrochemical experiments were performed using IviumStat (U.S) equipped with C3 cell stand. Argon gas was passed through the solutions during experiments for about 10 min. JEOL 2100 transmission electron microscope (TEM) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

#### **Synthesis of Au NPs/AETGO, Ag NPs/AETGO and Ag@Au NPs/AETGO**

Graphene oxide (GO) was synthesized according to our previous report (Yola et al., 2015a). To carry out the surface activation of carboxylate groups of GO, the GO suspension was interacted with 0.2 M EDC solution for 8 h. Activated GO suspension was mixed well with 1.0 mM AET at a 1:1 volume ratio for 2 h (AETGO). AuNPs and AgNPs were prepared according to our previous report (Yola and Atar, 2014). AgNO<sub>3</sub> was reduced by  $\beta$ -Cyclodextrin in aqueous media. The reaction mixture was heated until the color of solution turned pale yellow. The pale yellow color states the formation of AgNPs. After that, HAuCl<sub>4</sub> solution (1 mM) was added to the colloidal silver solution for the preparation of Ag@AuNPs. Then, the solution was incubated for 15 min at room temperature. After incubation, the solution was heated on a water bath. The color of solution was changed from pale yellow to pink. This situation shows the formation of Ag@AuNPs. The dispersions of AuNPs, AgNPs and Ag@AuNPs in ultra-pure water were mixed with 0.1 mg mL<sup>-1</sup> of AETGO with volume ratio of 1:1. After that the mixtures were kept in ultra-sonicated bath for 15 mins. Finally, the synthesised Au NPs/AETGO, Ag NPs/AETGO and Ag@Au NPs/AETGO nanocomposites were kept under room temperature.

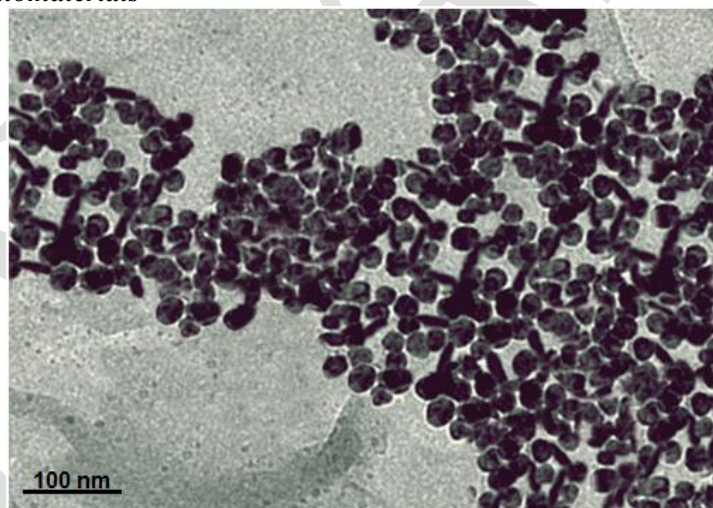
#### **Procedure for the electrode preparation**

GCE was cleaned according to our previous reports (Yola et al., 2015b). 15  $\mu$ L of Au NPs/AETGO, Ag NPs/AETGO and Ag@Au NPs/AETGO suspensions were dropped onto the clean GCE surfaces. Then, the solvent was evaporated by an infrared lamp.

**Electrochemical measurements** Electrochemical oxidation of 0.5 mol L<sup>-1</sup> methanol on bare GCE, Au NPs/AETGO/GCE, Ag NPs/AETGO/GCE and Ag@Au NPs/AETGO/GCE was performed in 0.1 mol L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> by CV between -0.5 and +1.5 V. The Ag/AgCl and Pt wire electrodes were utilized as reference and counter electrode, respectively.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

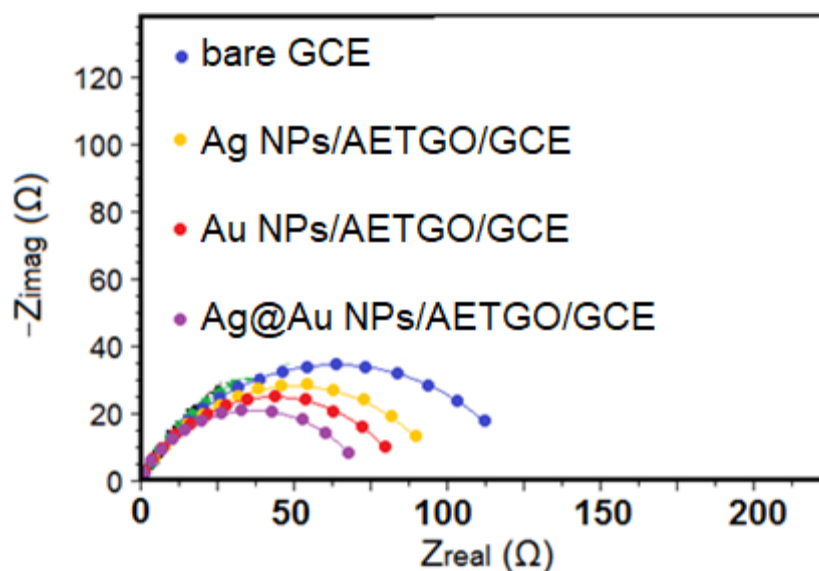
### **Characterization of nanomaterials**



**Figure 29.** TEM image of Ag@Au NPs/AETGO

Fig. 1 shows the TEM images of the Ag@Au NPs/AETGO nanocomposite. Ag@Au NPs are well dispersed and attached on the sidewall of the AETGO. The average particle sizes of the Ag@Au NPs are very similar and the average lengths of the nanoparticles are 10-20 nm from the size distribution of particles.

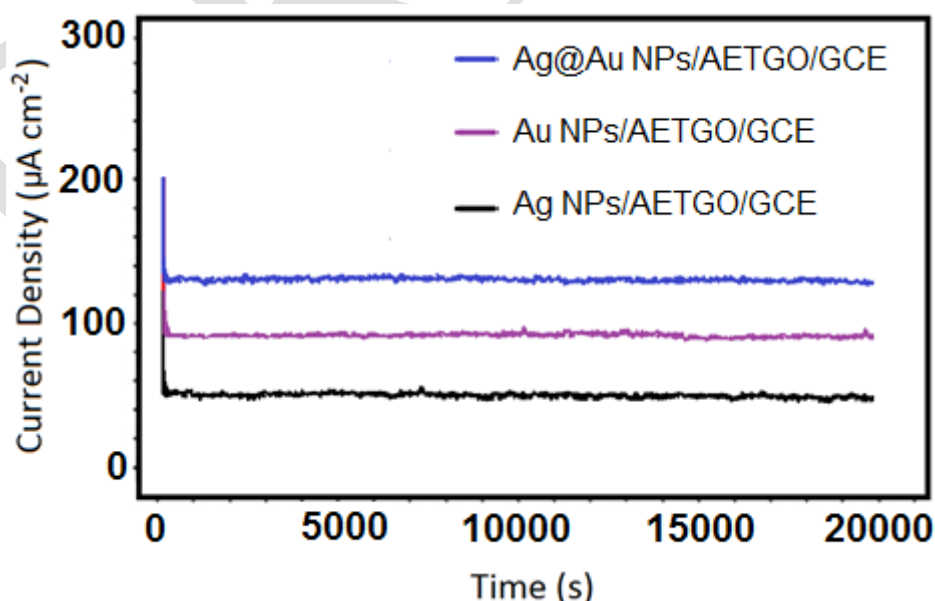
The EIS graph (Fig. 2) demonstrated that the value of charge transfer resistance ( $R_{ct}$ ) of bare GCE was calculated as 110 ohm for [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> redox couple solution. When the bare GCE was modified with Ag NPs/AETGO, the value of  $R_{ct}$  was lower. Because of the lower value, we can say that the Ag NPs/AETGO facilitated the rate of electron transfer between surface and solution. When AETGO nanocomposite was modified with Ag@Au NPs, the value of  $R_{ct}$  of Ag@Au NPs/AETGO was lower than that of AuNPs/AETGO. According to the lower values of  $R_{ct}$ , the highest conductivity was obtained on Ag@Au NPs/AETGO/GCE.



**Figure 2.** Fitting of impedance spectrum for 1.0 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  (1:1) in 0.1 M KCl at bare GCE, Au NPs/AETGO/GCE, Ag NPs/AETGO/GCE and Ag@Au NPs/AETGO/GCE

#### *Electrochemical Performances of Au NPs/AETGO/GCE, Ag NPs/AETGO/GCE and Ag@Au NPs/AETGO/GCE*

The chronoamperometry measurements were carried out to investigate the electrochemical performances of the prepared electrodes at 0.6 V in the presence of methanol. As shown in Fig. 3, all electrodes present current decay before steady current status is attained. The decay is possibly attributed to the fact that once the methanol oxidation reaction begins, some incomplete oxidation products adsorb on the catalyst surface and poison it towards further methanol oxidation, which can also be observed in other studies (Atar et al., 2015; Tong et al., 2015). In the steady-state region, the current density of methanol oxidation on the Ag@Au NPs/AETGO/GCE is highest than that of methanol oxidation on the other electrodes. This indicates that the Ag@Au NPs/AETGO/GCE is a stable and poisoning-tolerance electrocatalyst for methanol oxidation.



**Figure 3.** Chronoamperometry results of 0.5 mol L<sup>-1</sup> methanol in 0.1 mol L<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> at Au NPs/AETGO/GCE, Ag NPs/AETGO/GCE and Ag@Au NPs/AETGO/GCE

## CONCLUSIONS

In this report, 2-aminoethanethiol functionalized graphene oxide (AETGO) with bi-metallic nanoparticles such as Ag@Au nanoparticles (Ag@Au NPs) were synthesized and modified on GCE. Ag@Au NPs/AETGO/GCE showed catalytic activity towards methanol as the fuel, high electro-oxidative activity and superior CO tolerance than the Au NPs/AETGO/GCE and Ag NPs/AETGO/GCE.

## REFERENCES

- Atar N, Eren T, Demirdögen B, Yola ML, Çağlayan MO 2015. Silver, gold, and silver@gold nanoparticle-anchored l-cysteine-functionalized reduced graphene oxide as electrocatalyst for methanol oxidation. *Ionics* 21: 2285-2293.
- Gupta VK, Yola ML, Atar N, Üstündağ Z, Solak AO 2014. Electrochemical studies on graphene oxide-supported metallic and bimetallic nanoparticles for fuel cell applications. *Journal of Molecular Liquids* 191: 172-176.
- Kim S, Sohn HJ, Park SJ 2010. Preparation and characterization of carbon-related materials supports for catalysts of direct methanol fuel cells. *Current Applied Physics* 10: 1142-1147.
- Niyogi S, Bekyarova E, Itkis ME, McWilliams JL, Hamon MA, Haddon RC 2006. Solution Properties of Graphite and Graphene. *Journal of the American Chemical Society* 128, 7720-7721.
- Sanghavi BJ, Wolfbeis OS, Hirsch T, Swami NS 2015. Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs and neurotransmitters. *Microchimica Acta* 182: 1-41.
- Seger B, Kamat PV 2009. Electrocatalytically Active Graphene-Platinum Nanocomposites. Role of 2-D Carbon Support in PEM Fuel Cells. *The Journal of Physical Chemistry C* 113: 7990-7995.
- Tong YY, Gu CD, Zhang JL, Huang ML, Tang H, Wang XL, Tu JP 2015. Three-dimensional astrocyte-network Ni-P-O compound with superior electrocatalytic activity and stability for methanol oxidation in alkaline environments. *Journal of Materials Chemistry A* 3: 4669-4678.
- Yola ML, Atar N 2014. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. *Electrochimica Acta* 119: 24-31.
- Yola ML, Atar N, Eren T, Karimi-Maleh H, Wang S 2015a. Sensitive and selective determination of aqueous triclosan based on gold nanoparticles on polyoxometalate/reduced graphene oxide nanohybrid. *RSC Advances* 5: 65953-65962.
- Yola ML, Eren T, Atar N, 2015b. A sensitive molecular imprinted electrochemical sensor based on gold nanoparticles decorated graphene oxide: Application to selective determination of tyrosine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical* 210: 149-157.
- Yola ML, Gupta VK, Eren T, Şen AE, Atar N, 2014. A novel electro analytical nanosensor based on graphene oxide/silver nanoparticles for simultaneous determination of quercetin and morin. *Electrochimica Acta* 120: 204-211.
- Yoo E, Kim J, Hosono E, Zhou HS, Kudo T, Honma I 2008. Large Reversible Li Storage of Graphene Nanosheet Families for Use in Rechargeable Lithium Ion Batteries. *Nano Letters* 8: 2277-2282.

## A new SPR biosensor for etodolac detection in real samples

Necip Atar<sup>1\*</sup>, Mehmet Lütfi Yola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Denizli, Turkey

<sup>2</sup>Iskenderun Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Biomedical Engineering, Hatay, Turkey

Corresponding author: e-mail: necipatar@gmail.com

### Abstract

A novel and sensitive molecular imprinted surface plasmon resonance (SPR) biosensor was developed for selective determination of etodolac (ETO) in drug. Firstly, the gold surface of SPR chip was modified with allyl mercaptane. Then, ETO-imprinted poly(2-hydroxyethyl methacrylate - methacryloylamidoglutamic acid) [p(HEMA-MAGA)] film was generated on the gold surface modified with allyl mercaptane. The unmodified and imprinted surfaces were characterized by fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and atomic force microscopy (AFM). The linearity range and the detection limit were obtained as 0.005 – 1.0 ng/mL and 0.0015 ng/mL, respectively. The SPR biosensor was applied to determination of ETO in drug sample.

**Keywords:** Etodolac; Drug analysis; Biosensor; SPR

### INTRODUCTION

Etodolac, (±) [1,8-Diethyl-1,3,4,9-tetrahydropyrano (3,4-b)- indole-1 acetic acid] and flurbiprofen, [(1,1-biphenyl)-4- acetic acid-2-fluoro-alpha-methyl] are non-steroidal anti-inflammatory, antirheumatic drugs. Their pharmacological effect is related to the suppression of prostaglandin synthesis. Etodolac is used for the treatment of inflammation and pain caused by osteoarthritis and rheumatoid arthritis (Boni et al., 2000). It is employed in the management of chronic pain such as in patients with inflammatory arthritis. In addition to its anti-inflammatory effect, recent studies observed antitumour/chemopreventive activity of etodolac and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs (Benish et al., 2008; de Souza Thiago et al., 2009; Okamoto et al., 2008).

Recently, SPR sensors have attracted attention (Yola et al., 2014). SPR, an optical phenomenon, occurs when a p-polarized light goes through a prism. Then, it hits a metal layer covering the prism surface at a particular angle (Englebienne et al., 2003). SPR sensors have important applications such as determination of affinity-binding constants (Zhang et al., 2008) and genotype analyzing (Hayashi et al., 2008). In addition, molecular imprinting technique is effective method in terms of specific and selective recognition. The method relies on the molecular recognition. It is a kind of polymerization which is formed around the target molecule. Hence this technique forms specific cavities in the cross-linked polymeric matrices (Yola and Atar, 2019).

In this paper, the ETO-imprinted SPR biosensor was developed for drug analysis. The prepared molecular imprinted polymers were characterized by using FTIR and AFM. The ETO-imprinted SPR biosensor was successfully applied to drug sample for the determination of ETO with high sensitivity and selectivity.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

ETO was purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St.Louis, MO, USA) and used as received. The stock solution of ETO (1.0 mM) was prepared with 50 mL of ultra-pure quality water. The working solutions were prepared by diluting the stock solution with 0.10 M phosphate buffer (pH 6.0). Allyl mercaptane (CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>SH), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), N,N'-azobisisobutyronitrile (AIBN), sodium chloride (NaCl) were obtained from Sigma-Aldrich.

#### Surface modification of the SPR chip

SPR chip modified with CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>SH was prepared according to our previous works. The real time determination of ETO was performed using SPR system (GenOptics, SPRi-Lab, Orsay, France) (Yola et al., 2015).

#### ETO removal from SPR chip surface

There are the electrostatic interactions and hydrogen bonding between the carboxylic acid groups of MAGA monomer and polar groups of ETO molecules. In order to break the interactions, we used 1.0 M NaCl solution in water as a desorption agent. Firstly, the removal study of ETO was performed via batch system.

ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) surface was dipped into 25 mL of desorption agent. The SPR chip was swinged in bath (200 rpm) at room temperature. After ETO removal, the SPR chip was washed with ultra pure quality water and dried with nitrogen gas under vacuum (200 mmHg, 25°C).

### Sample preparation

Ten capsules (Lodine 300 mg) were weighed and powdered. The equivalent amount to one capsule was accurately weighed and transferred to a 100 mL volumetric flask. Ethanol (50 mL) was added and the flask was sonicated for 15 minutes to complete dissolution and diluted to the mark with ultra pure quality water. A 5-mL portion was centrifuged for 10 minutes. Appropriate solutions were prepared from the supernatant by dilution with 0.10 M phosphate buffer (pH 6.0).

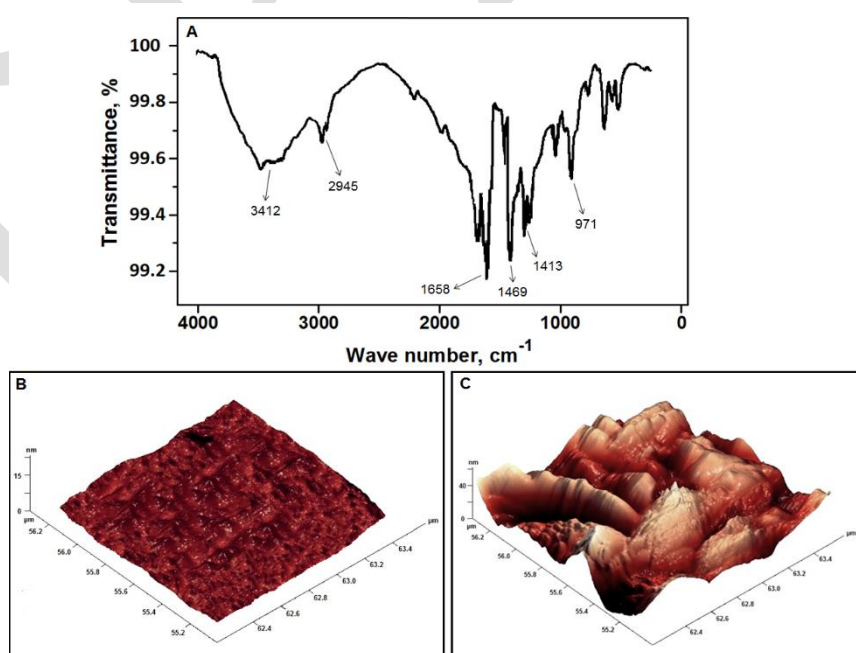
## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization results

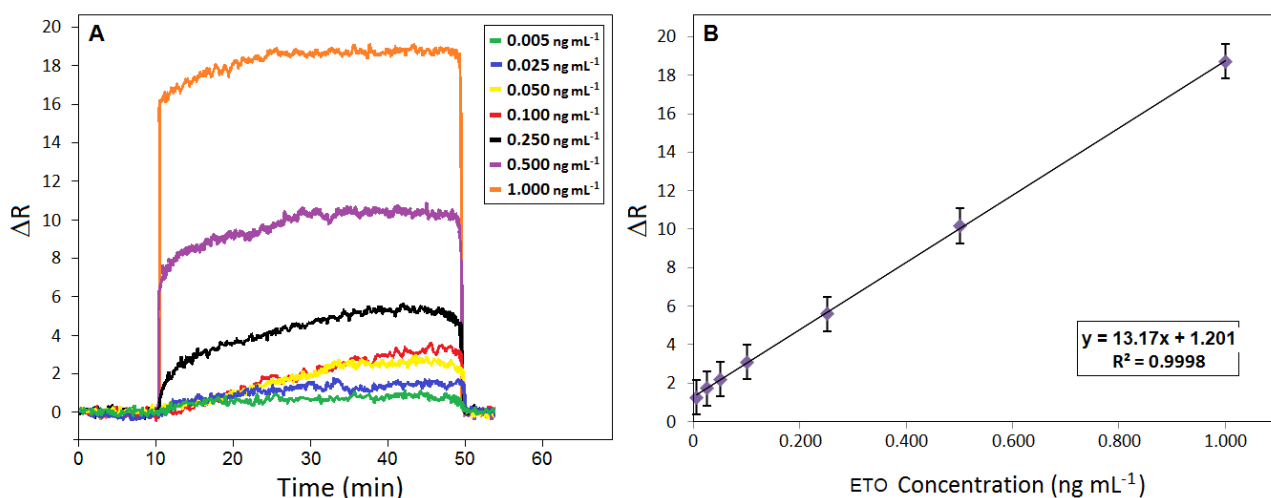
The ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) film was characterized by FTIR spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, USA). Specific bands of the polymeric structure such as O-H stretching of HEMA and MAGA at 3412  $\text{cm}^{-1}$ , saturated C-H stretching of MAGA at 2945  $\text{cm}^{-1}$ , carboxyl-carbonyl stretching of MAGA at 1658  $\text{cm}^{-1}$  have been observed in Fig. 1A. In addition, the absorptions at 1469  $\text{cm}^{-1}$  and 1413  $\text{cm}^{-1}$  are corresponded to  $-\text{COO}$  stretching peaks of MAGA monomer.

AFM images of SPR surfaces were obtained in non-contact mode (Nano Magnetics Instruments, Oxford, UK). The values of surface deepness for non-modified (Fig. 1B) and ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) film on  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$  modified SPR chips (Fig. 1C) are  $4.15 \pm 1.45$  and  $23.24 \pm 1.09$  nm, respectively. These results indicate that the surface deepness of the ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) film on  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$  modified SPR surface increased. These results confirmed that polymerization could be accomplished on the SPR surface.

The SPR sensorgrams with increasing ETO concentration (Fig. 2A) show that the signal of SPR biosensor increased linearly with concentration. The SPR responses are linear with ETO concentrations from 0.005 – 1.000  $\text{ng mL}^{-1}$ . This situation is directly related to basic adsorption phenomena which describes concentration difference between liquid and solid phases. These phases drive ETO molecules through the surface to interact with specific ligands/cavities. The regression equation of CIT (Fig. 2B) is  $y = 13.17x + 1.201$ . Each point of the calibration graph is corresponded to the mean value obtained from 6 independent measurements.

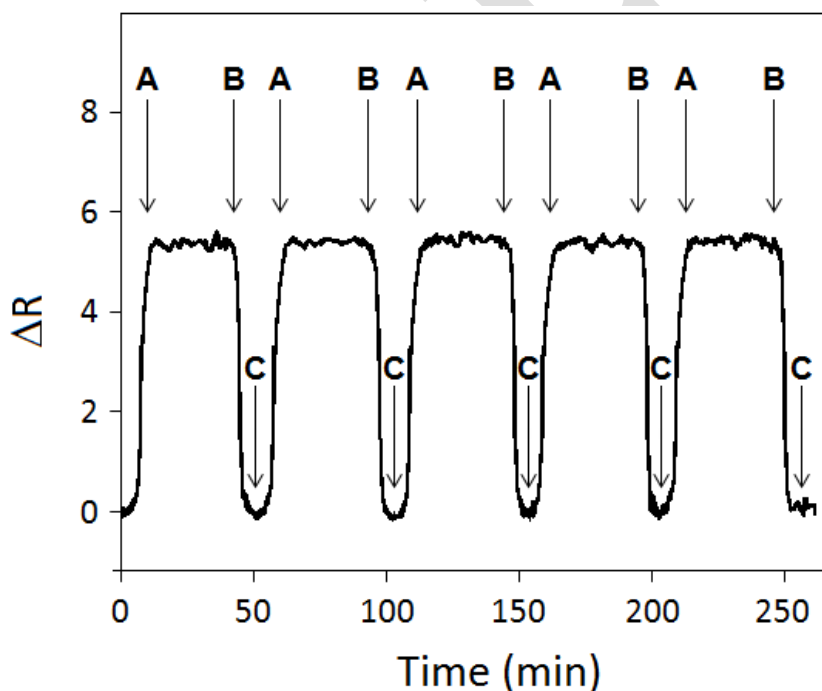


**Figure 30.** (A) FTIR spectra of ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) film; AFM images of (B) non-modified SPR chip; (C) ETO-imprinted p(HEMA-MAGA) film



**Figure 2.** (A) Effect of concentration on SPR response of ETO-imprinted biosensor and (B) The calibration curve of ETO

In order to show the repeatability of ETO-imprinted SPR biosensor, five equilibration-adsorption-regeneration cycles were repeated in presence of 0.250 ng mL<sup>-1</sup> ETO. As seen in Fig. 3, ETO-imprinted SPR biosensor has demonstrated repeated reflectivity response during the cycles.



**Figure 3.** Repeatability of ETO-imprinted SPR biosensor: (A) adsorption; (B) desorption; (C) regeneration.

In addition, the recovery experiments were performed with different ETO concentrations. The results are presented in Table 1. Closeness of the results to 100.00 % showed that recovery of the developed ETO-imprinted SPR biosensor was very good.

**Table 1.** The recoveries of ETO in Lodine samples

Sample	Added ETO (ng/mL)	Found ETO (ng/mL)	Recovery (%)
Lodine	-	0.35 ± 0.01	-
	0.20	0.56 ± 0.02	101.82 ± 0.53
	0.40	0.74 ± 0.03	98.67 ± 0.69
	0.60	0.96 ± 0.05	101.05 ± 0.73

## CONCLUSIONS

A high percentage of recovery shows that the ETO-imprinted SPR biosensor can be used to quantify ETO without interference. In conclusion, the ETO-imprinted SPR biosensor is sensitive, rapid, cheap and easy to use and might be preferred to the other methods. We developed molecular imprinted SPR biosensor for the sensitive determination of ETO. The non-imprinted and ETO imprinted p(HEMA-MAGA) surfaces were characterized by using FTIR and AFM. According to the results, polymerization was accomplished on the SPR surface. The developed imprinted biosensor showed high sensitivity towards ETO with a detection limit of 0.0015 ng/mL.

## REFERENCES

- Benish M, Bartal I, Goldfarb Y, Levi B, Avraham R, Raz A, Ben-Eliyahu S 2008. Perioperative Use of  $\beta$ -blockers and COX-2 Inhibitors May Improve Immune Competence and Reduce the Risk of Tumor Metastasis. *Annals of Surgical Oncology* 15: 2042-2052.
- Boni JP, Korth-Bradley JM, Richards LS, Chiang ST, Hicks DR, Benet LZ 2000. Chiral Bioequivalence. *Clinical Pharmacokinetics* 39: 459-469.
- De Souza Thiago L, Sobral da Costa E, Lopes DV, Borojevic R 2009. Racemic Etodolac is cytotoxic and cytostatic for B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63: 548-551.
- Englebienne P, Hoonacker AV, Verhas M 2003. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *Spectroscopy* 17: 255-273.
- Hayashi G, Hagihara M, Nakatani K 2008. Genotyping by allele-specific I-DNA-tagged PCR. *Journal of Biotechnology* 135: 157-160.
- Okamoto A, Shirakawa T, Bito T, Shigemura K, Hamada K, Gotoh A, Fujisawa M, Kawabata M 2008. Etodolac, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Upregulation of E-Cadherin and Has Antitumor Effect on Human Bladder Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Urology* 71: 156-160.
- Yola ML, Atar N 2019. Development of cardiac troponin-I biosensor based on boron nitride quantum dots including molecularly imprinted polymer. *Biosensors and Bioelectronics* 126: 418-424.
- Yola ML, Atar N, Erdem A 2015. Oxytocin imprinted polymer based surface plasmon resonance sensor and its application to milk sample. *Sensors and Actuators B: Chemical* 221: 842-848.
- Yola ML, Atar N, Eren T 2014. Determination of amikacin in human plasma by molecular imprinted SPR nanosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 198: 70-76.
- Zhang L, Liu J, Wang E 2008. A new method for studying the interaction between chlorpromazine and phospholipid bilayer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373: 202-205.



## Dipirometen esaslı yeni Zn (II) komplekslerinin sentezlenmesi ve karakterizasyonu

Taha Hüseyin İpek, Ahmed Nuri Kurşunlu, Ersin Güler  
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: eguler66@gmail.com

### Özet

Bu çalışma temel olarak iki aşamada gerçekleştirilmiş olup Dipirometen temelli bileşiklerin hazırlanması ve onların absorpsiyon ve emisyon uygulamalarından oluşmuştur. 4-Hidroksibenzaldehit ve fitalimitten çıkılarak Dipirometen esaslı metal kasyonları elde edilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında gerçekleştirilen spektroskopik çalışmalarla hazırlanan dört Dipirometen grubu ile hazırlanan Zn (II) komplekslerinin Uv-vis ve florimetrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Spektroskopik uygulamaların sonunda hazırlanan metal komplekslerinin biyokimyasal uygulama alanlarına uygunluğu tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Dipirometen, Uv-vis, emisyon, kompleks

### Synthesis and characterization of new dipyromethene-based Zn (II) complexes

#### Abstract

This study was mainly carried out in two stages and consisted of the preparation of Dipyrimin-based compounds and their absorption and emission applications. Dipyrimin-based metal cations were obtained from 4-hydroxybenzaldehyde and phthalimide.

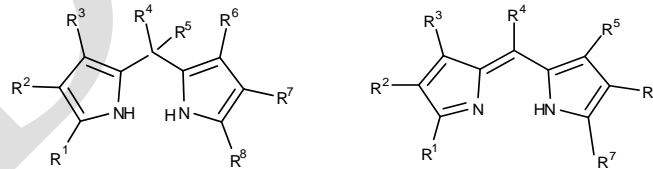
In the second stage of the study, Uv-vis and fluorimetric measurements of Zn (II) complexes prepared with four Dipyrimin groups prepared by spectroscopic studies were performed. At the end of the spectroscopic applications, the suitability of the metal complexes prepared for biochemical applications were discussed.

**Keywords:** Dipyromethene, UV-Vis, emission, complex.

### GİRİŞ

Dipirin araştırmaları geleneksel olarak kendini porfirin sentezlemeye adanmış gruplar tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple dipirinler, 20. Yüzyılın ilk yarısında Hans Fischer tarafından geliştirilmiştir. Dipirin araştırmaların büyük çoğunluğu çeşitli metallere yüklü-nötrale komplekslerin sentezi üzerine odaklanmıştır. Başlangıçta dipirinlerin sentezi karışık ve verimsiz gibi görünüyordu. Ama yine de, dipirometen ve dipirin sentezinin daha basit metotlarla keşfedildiğinden bu yana, dipirin kimyasının bazı büyük avantajlarının olduğu görülmüştür. Çeşitli dipirinato-metal kompleksleri sentezlendi ve geometrileri analiz edilmiştir. Ve enerji transfer kasetleri ve fotonik sistemlerinde dipirinlerin çeşitli potansiyel uygulamaları araştırılmaya başlanmıştır.

İki pirolün birleşiminden oluşan dipirometen doymuş bir metilen köprüsüyle 2,2' pozisyonlarından birbirlerine bağlanmışlardır. Dipirinler resmi olarak dipirometenin oksidasyon ürünleridir ve yapısal olarak onlara benzerler. Fakat dipirinlerde iki pirolik ünite tamamen konjuge durumdadır.



Şekil 1 Dipirometen ve dipirometen (dipirin)

Dipirinlerin tamamen konjuge olması simetrik olarak substitute olduğu zaman iki pirol halkasının aynı ekvalent olduğu anlamına gelir. 2,3' ve 3,3'- dipirin türevleri de sentezlenmesine rağmen araştırmalar daha çok 2,2'-dipirinler üzerine gerçekleştirilmiştir.



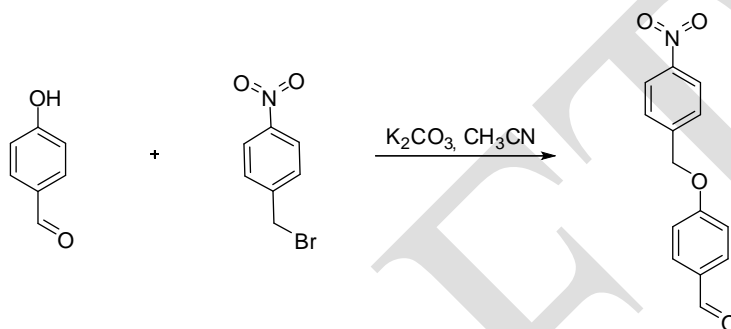
Şekil 2. 3,3-dipirometen ve 2,3-dipirometen

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup ligand karakterli dipirometen türevleri sentezlenmiş ve hazırlanan bu bileşiğin NMR, IR, Kütle vb. cihazlarla karakterize edilmiştir. Daha sonra hazırlanan iki ligandın Zn(II) kompleksleri elde edilmiş ve karakterize edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin erime noktaları için Gallenkamp marka erime noktası tayin cihazından faydalanılmıştır. FTIR spektrumları Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan Perkin Elmer 100 FT-IR (Universal Sampling Accessary) spektrofotometresi ile kaydedildi.

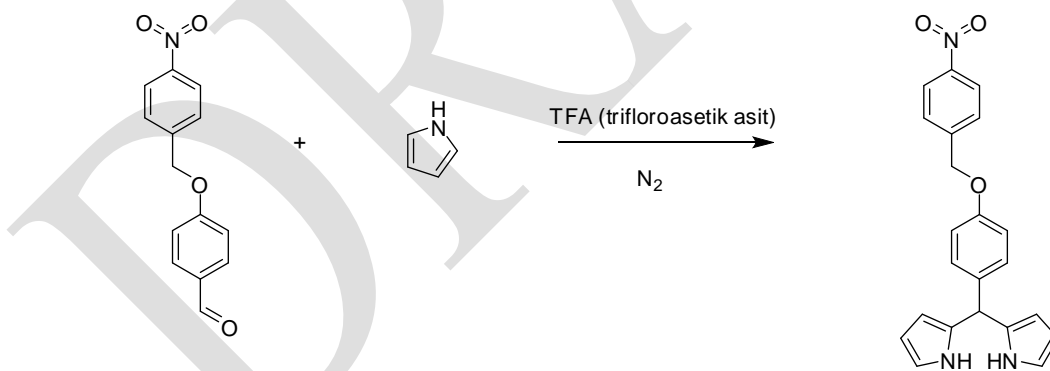
### Bileşiklerin Sentezi

#### 4-(4-nitrobenziloksi)benzaldehit'in Sentezi



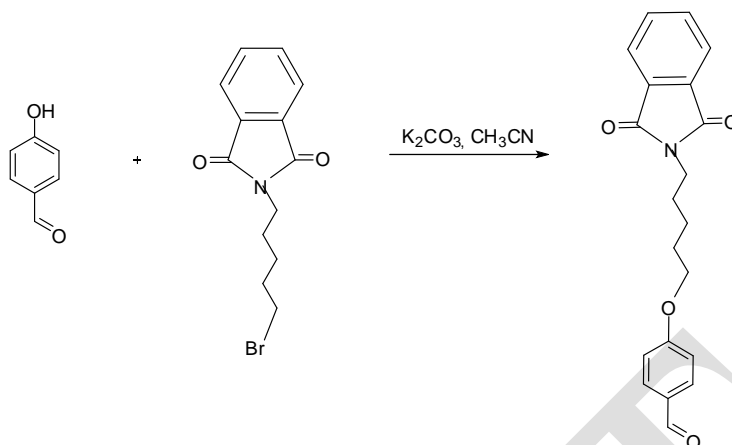
1.22 g (10 mmol) 4-hidroksibenzenaldehit 100 mL asetonda çözüldü. Üzerine 1 ekivalent 1-(bromometil)-4-nitrobenzen (10 mmol, 2,16 gr) ve 5 ekivalent K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildi. 50 ml asetonitril eklenerek 20 saat refluks edildi. Karışım vakumda süzülerek aşağı kısma geçen çözeltinin çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Elde edilen katı madde kolonda n-hekzan/ etilasetat (1\4) eşliğinde saflaştırıldı. Krem renkli bir katı elde edildi.

#### 2,2'-((4-(4-nitrobenziloksi)fenil)metilen)bis(1H-pirol)'ün Sentezi



Distile edilmiş ve zararlı gazlardan arındırılmış 50 ml pirolün içerisine 1.28 g (5 mmol) 4-(4-nitrobenziloksi)benzaldehit ilave edildi. Çözünme gerçekleştikten sonra 0.1 ml trifloroasetik asit ilave edildi. Reaksiyon ışiksiz ve azot atmosferi altında gerçekleştirildi. 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Önce sarımtırak, sonra koyu kırmızıya dönen bir çözelti elde edildi. Elde edilen çözeltideki aşırı pirolü evaporatörde uçurulduktan sonra ¼ etilasetat hekzan karışımı ile kolonda saflaştırıldı. Kolonda turuncu banda görülen band bizim maddemizdir. Elde edilen turuncu renkli çözeltinin çözücüsü uçurulduktan sonra katı madde elde edildi. (Verim %83)

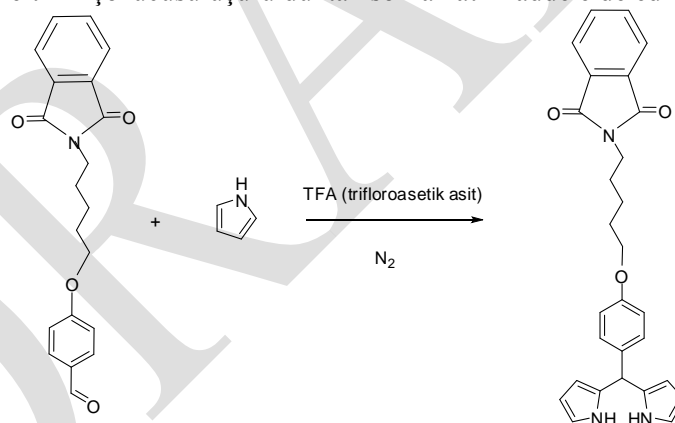
#### 4-(5-pentil fitalimit) benzaldehit'in Sentezi



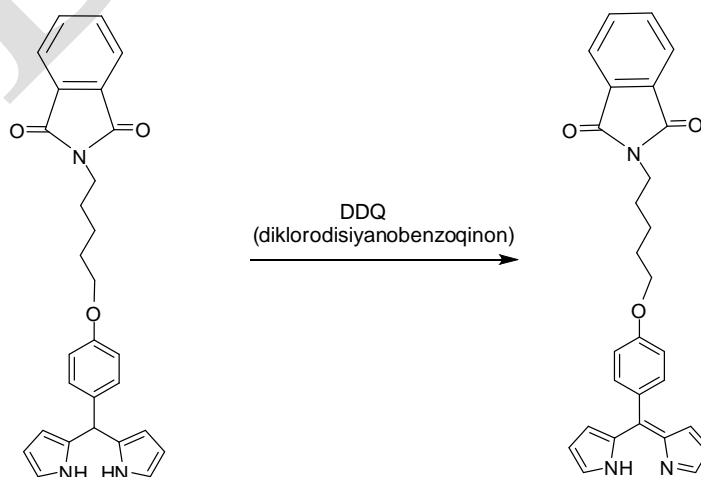
1.22 g (10 mmol) 4-hidroksibenzenaldehit 100 mL asetonda çözüldü. Üzerine N-(5-bromopentil) fitalimit (10 mmol, 3.11 gr) ve 5 ekivalent K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edildi. 50 ml asetonitril eklenerek 20 saat refluks edildi. Karışım vakumda süzülerek aşağı kısma geçen çözeltinin çözücüsü evaporatörde uçuruldu. Elde edilen katı madde kolonda n-hegzan/ etilasetat(1/4) eşliğinde saflaştırıldı. Krem renkli bir katı elde edildi.

#### 4-(di(1H-pirol-2-il)metil)fenol' in Sentezi

Distile edilmiş ve zararlı gazlardan arındırılmış 50 ml pirolün içerisine 1.9 g (5 mmol) 4-(pentil fitalimit) benzaldehit ilave edildi. Çözünme gerçekleştikten sonra 0.1 ml trifloroasetik asit ilave edildi. Reaksiyon ışısız ve azot atmosferi altında gerçekleştirildi. 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Önce sarımtırak, sonra koyu kırmızıya dönen bir çözelti elde edildi. Elde edilen çözeltideki aşırı pirolü evaporatörde uçurulduktan sonra ¼ etilasetat hekzan karışımı ile kolonda saflaştırıldı. Kolonda turuncu banda görülen band bizim maddemizdir. Elde edilen turuncu renkli çözeltinin çözücüsü uçurulduktan sonra katı madde elde edildi. (Verim %80)



#### (Z)-2-(5-(4-((1H-pirol-2-il)(2H-pirol-2-yliden)metil)fenoksi)pentil)izoindolin-1,3-dion Sentezi





## Bodipy temelli floresans Hg (II) sensörünün sentezi ve spektroskopik uygulamaları

Ersin Guler, Emine Bagci, Ahmed Nuri Kursunlu  
Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: eguler66@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada, Bodipy merkezinin, uyarıldıktan sonra aldığı enerjiyi bağlanan metal iyonuna aktarma işlemi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle bir ucu Bodipy ve diğer ucu ligand özelliği gösterebilen bir yapı hazırlanmıştır. Metal iyonunun hazırlanan Bodipy temelli liganda bağlanmasının ardından temel ve uyarılmış hallerinin elektronik geçişleri ve floresan şiddetindeki değişimler araştırılmıştır. Son ürün olarak bir Bodipy türevi hazırlanmıştır. Hazırlanan Bodipy temelli yapının spektroskopik veriler doğrultusunda hangi metal iyonu için seçiciliğin tespiti ve dolayısıyla kemosensör olarak kullanılabilmesinin tartışması yapılmıştır (çalışmada bileşik çözelti halinde çalışılmıştır). Sonuçlara bakıldığında ise Bodipy bileşiğinin Hg(II) iyonu için hassas ve seçici olduğunu ortaya koymuştur ve bu bileşiğin ilgili metal iyonları için floresans kemosensör olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bodipy, kemosensör, floresans

### Synthesis and Spectroscopic Applications of Bodipy Based Fluorescent Hg (II) Sensor

#### Abstract

In this study, the process of transferring the energy received from the Bodipy center to the bound metal ion after the stimulation was investigated. For this purpose, firstly, a structure which has Bodipy end and Ligand end is prepared. After the binding of the metal ion to the prepared Bodipy-based ligand, the electronic transitions of the basic and excited states and the changes in the fluorescence intensity were investigated. A Bodipy derivative was prepared as the final product. The determination of the selectivity for the metal ion and its use as a chemosensor for the Bodipy-based structure prepared according to the spectroscopic data were discussed (the compound was studied as a solution). The results showed that Bodipy compound is sensitive and selective for Hg (II) ion and it can be used as fluorescence chemosensor for related metal ions.

**Keywords:** Bodipy, chemosensor, fluorescent

### GİRİŞ

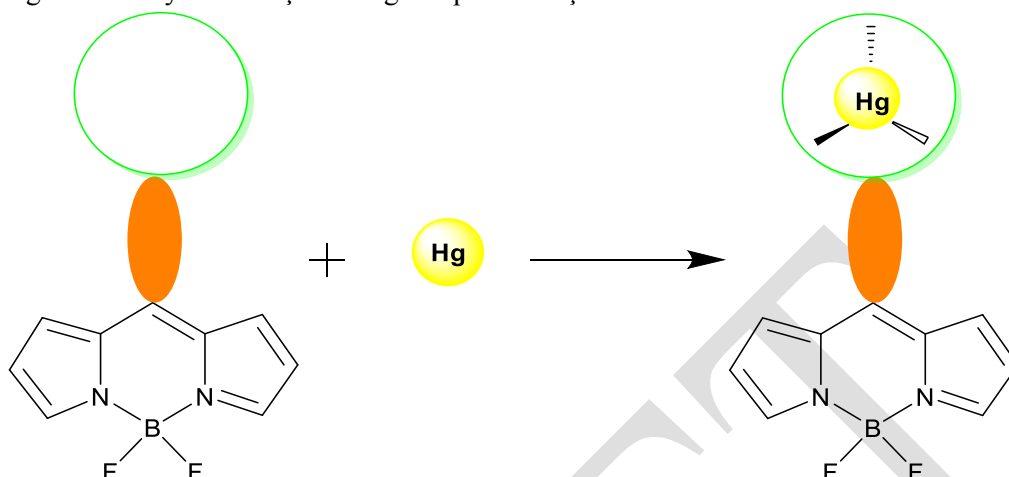
BODIPY (4,4-difloro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indasen) boyaları, absorpsiyon sabiti, keskin floresans emisyonu, yüksek floresans kuantum verimi ve fotofiziksel kararlılığı gibi özellikleriyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir.

Son yirmi yılda klinik biyokimyasında, analitik kimya, sağlık ve çevre kimyası alanlarında floresan bileşiklerine karşı olan ilgi hızla artmıştır. Floresan kavramı flowsitometre, biyoteknoloji, tıbbi teşhis, DNA dizi analizi, adli tıp ve genetik analiz içerisinde sıklıkla kullanılan bir kavramdır. Katyon, anyon, nötral molekül ve gazlar gibi pek çok kimyasal ve biyokimyasal analit floresans metotla tespit edilebilir. Floresan özelliğini kullanarak iyonların tespiti hassas bir olaydır ki bu durum biyokimyasal ölçümler için oldukça zor ve pahalıdır. Son zamanla floresans hücreler ve moleküler görüntüleme olayı kimyasal uygulamalarda floresan görüntüleme artışı ile beraber gözlenmiştir.

Bodipy çekirdeği, çözücü ve pH'a bağlı olarak absorpsiyon ve emisyon değerlerinde önemli değişiklikler göstermemektedir. Ancak Bodipy çekirdeğine bağlanan süstitüe gruplar ile bu çekirdek arasında elektron aktarımı bulunması halinde, bu grubun fotofiziksel özelliklerinin değiştiği bilinmektedir. Bodipy çekirdeğine donör/akseptör özelliği bulunan fonksiyonel gruplar bağlanarak, asit-baz ve anyon/katyon indikatörleri olarak kullanılmak üzere birçok Bodipy bileşiği sentezlenmiştir. Bodipy bileşikleri akıllı devre anahtarları, ışık toplama sistemleri, enerji transfer kasetleri, boyar madde ile duyarlaştırılmış güneş pilleri, polimerler, lazer boyaları ve OLED uygulamalarında kullanılırlar.

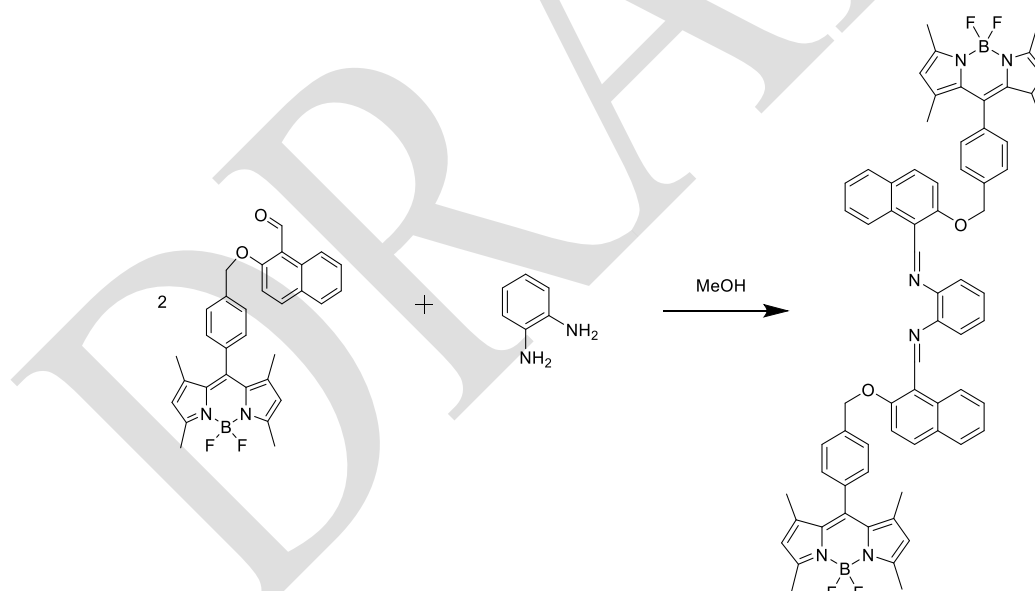
## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada ligand karakterli Bodipy türevi sentezlenmiş ve hazırlanan bu bileşiğin NMR, IR, Kütle vb. cihazlarla karakterize edilmiştir. Belirlenen metal katyonları varlığında hedeflenen Bodipy türevinin absorpsiyon, emisyon ve eksitasyon spektrumları alınmıştır. Veriler doğrultusunda hazırlanan Bodipy türevinin hangi metal katyonuna seçici olduğu tespit edilmiştir.



Bu işlemler için gereken cihazların çoğu Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Spektroskopi Laboratuvarları ve İnorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'ndan alınmıştır.

**1-(2-((4-(5,5-difloro-1,3,7,9-tetrametil-5H-414,514-dipirol [1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzil)oxy)naftalin-1-yl)-N-(2-(((4-(5,5-difloro-1,3,7,9-tetrametil-5H-414,514-dipirol [1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)benzil)oxy)naftalin-1-yl)metilen)amino)fenil) methanimin' in (BODIPY) Sentezi**

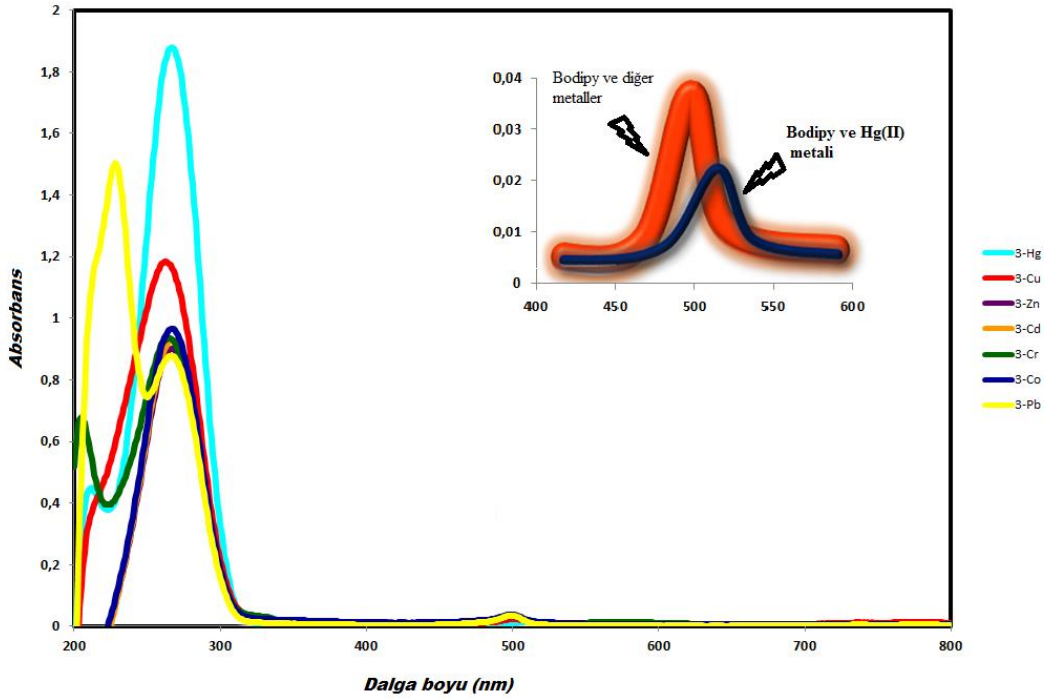


5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-10-(4-(((1-vinylnaphthalen-2-yl)oxy)methyl)fenil)-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine (0.0223 g) ve benzen-1,2-diamin (0.0026 g) 10 mL MeOH ' de 50-60 ° C'de üç gece kaynatıldı. Çözücüsü uçurulup kolon kromatografisiyle (petrol eteri-EtOAc; 4 : 1 oranında) saflaştırıldı ve viskoz kırmızı bir katı halinde elde edildi.

## Tablolar ve Şekiller

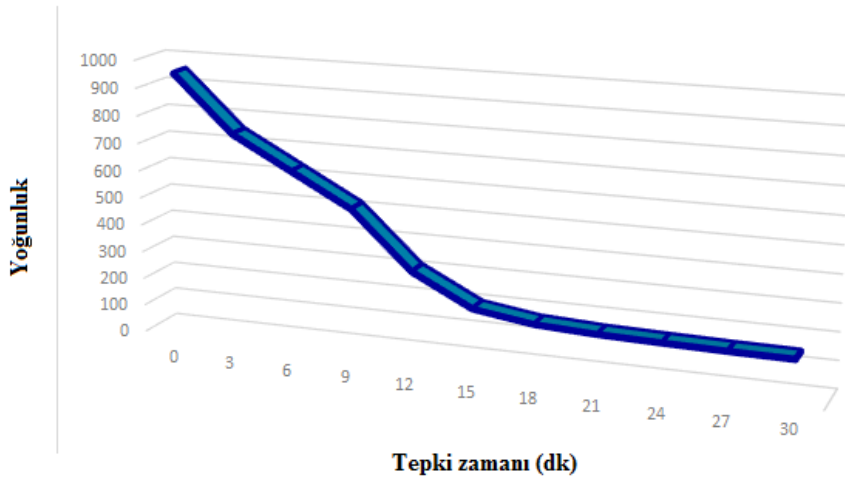
Bodipy bileşiği için yapılan absorpsiyon çalışmasında; metanolde,  $1.10^{-6}$  M konsantrasyonda ligand çözeltisi ve  $1.10^{-5}$  M konsantrasyonda metal tuz çözeltileri hazırlanmıştır. Bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılıp absorpsiyon, emisyon gibi spektroskopik uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Burada metal iyon kaynağı olarak belirlenmiş metal tuzları kullanılmıştır [Cr (III), Co (II), Cu (II), Zn (II), Hg (II), Pb (II), Cd (II)]. Metal tuzlarının ilavesinden sonra cıva (II) iyonu haricinde diğer metal iyonları Bodipy 'nin absorpsiyon

spektrumunda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Fakat Bodipy çekirdeğinden cıvaya doğru bir yük transferi gözlemlenmiş ve Bodipy' nin Hg(II) hassasiyetini ortaya koymuştur.



Bodipy ( $1.10^{-6}$  M) ve metal iyonları ( $1.10^{-5}$  M) varlığında Bodipy 2 için absorpsiyon spektrumları

Hg (II) hassasiyetine sahip Bodipy 'nin cıva iyonu ile etkileşmesinin ne kadar hızlı gerçekleştiğini anlayabilmek için tepki zamanı denemeleri yapılmıştır. Bunun için 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ve 30 dakika süreleri belirlenmiştir. Emisyon şiddeti 15 dakikadan sonra sabit bir değere ulaşmıştır. Böylece Bodipy 'nin Hg (II) hassasiyeti için en doğru sürenin 15 dakika olduğu anlaşılmıştır.



Bodipy ( $1 \times 10^{-6}$  M) zamana bağlı Hg (II) hassasiyet değişimi

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ışın toplama özelliğine (anten) sahip farklı sentez metotları kullanılarak Bodipy türevi bileşik hazırlanmıştır. Bu Bodipy türevinin ise metal sensörü olabilme özellikleri spektroskopik metotlarla araştırılmıştır. Bu bağlamda öncelikle Bodipy çekirdeğini bulunduran temel Bodipy türevi elde edilmiştir. Daha sonra bu temel Bodipy türevi bileşik şelatlaşma etkisi gösterebilecek uygun organik gruplarla yeniden modifiye edilmiştir ve son ürün olarak Bodipy temelli ligand elde edilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan bu floresans bileşiğinin Hg (II) sensörü olarak kullanılabilmesi Sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma için maddi destek Selçuk Üniversitesi BAP tarafından sağlanmaktadır ve minnetle kabul edilmektedir.

## KAYNAKLAR

- G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman (2008) The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(7): 1184-1201.
- Kursunlu, A.N.; Guler, E.; Ucan, H. I., Ross W. B.; 2012, A novel Bodipy-Dipyrrin fluorescent probe: Synthesis and recognition behaviour towards Fe (II) and Zn (II). *Dyes Pigments*, 94, 496-502.
- Kursunlu A. N., Guler E., 2014, The sensitivity and selectivity properties of a fluorescence sensor based on quinoline-Bodipy, *J. Luminescence*, 145, 608-614.

DRAFT



## Obezite ve mikrobiyota ilişkisi

Dilruba Şener<sup>1</sup>, Dilara Yüksel<sup>1</sup>, Ceyda Nur Keskin<sup>1</sup>, Gülben Albayrak<sup>1</sup>, Fatma Mert Biberoglu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü 3. Sınıf öğrencisi, İstanbul, Türkiye

<sup>2\*</sup>İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: fbiberoglu@medipol.edu.tr

### Özet

İnsan bağırsağı çok sayıda bakteri türü içermektedir. Erken yaşamdaki bağırsak mikrobiyotası oldukça dinamiktir ve maternal bağırsak mikrobiyotası, doğum şekli ve emzirme gibi birçok faktör tarafından şekillendirilmektedir. Yetişkin beslenme tarzına geçilmesiyle mikrobiyotadaki bakteri türleri çeşitlenmektedir. Yapılan çalışmalar, obezite ve metabolik sendrom gibi metabolizmayı etkileyen hastalıkların bu bakterilerin sayısından, dağılımından ve çeşitliliğinden etkilendiğini göstermektedir. Diyet bileşimi, prebiyotikler ve probiyotikler, bariatrik cerrahi ve fekal transplantasyon yoluyla yapılan müdahaleler ile yeniden düzenlemeler hem mikrobiyotayı, hem de obezite prevalansını değiştirmektedir. Bu derlemede, bahsedilen müdahalelerin obezite üzerindeki etkileri incelenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Obezite, mikrobiyota, prebiyotik, probiyotik, fekal transplantasyon

### Relationship between obesity and microbiota

#### Abstract

The human intestine contains a large number of bacterial species. The early-life gut microbiota is highly dynamic and shaped by many factors, such as maternal gut microbiota, delivery mode and breastfeeding. The bacterial species in the microbiota are varied after the transition to adult nutrition. Studies show that diseases affecting metabolism such as obesity and metabolic syndrome are affected by the number, distribution and diversity of these bacteria. Studies show that diseases affecting metabolism such as obesity and metabolic syndrome are affected by the number, distribution and diversity of these bacteria. Interventions and rearrangements made by the diet composition, prebiotics and probiotics, bariatric surgery and fecal transplantation alter the prevalence of both microbiota and obesity. In this review, the effects of the interventions on obesity are examined.

**Keywords:** Obesity, microbiota, prebiotic, probiotic, fecal transplantation

#### GİRİŞ

Obezite, bireyin ihtiyacından fazla enerji alması ve bu enerjiyi harcayamaması sonucu oluşan, beraberinde birçok sekonder hastalığın oluşmasına neden olan bir metabolik bozukluktur. Yıllar geçtikçe prevalansı artış gösteren bir sağlık problemidir. Günümüzde dünya genelinde sayısı 700 milyonu aşan obez birey bulunmaktadır. Obezite oluşumunda fiziksel, psikolojik, genetik ve çevresel birçok faktör rol almaktadır (Aygın and Açıl, 2015).

İnsan bağırsağı, içerisinde yararlı ve zararlı olmak üzere çeşitli bakteri grupları bulundurulur, bu bakteri topluluğuna bağırsak mikrobiyotası denmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda insan sağlığı ve bağırsak mikrobiyotası arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar göstermektedir ki, bağırsak mikrobiyotası profili obeziteyi olumlu ya da olumsuz etkileyebilen bir faktördür. Obez ve sağlıklı bireylerin arasındaki en belirgin fark ise, mikrobiyomla ilişkili faktörlerden biri olan, yetişkin bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %90'ını oluşturan *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*'e ait bakteri florası oranındaki değişimdir (John and Mullin, 2016).

#### OBEZİTE

Obezite genetik, çevresel, sedanter yaşam gibi birçok etmene bağlı olan, birçok hastalığı beraberinde getiren ciddi bir halk sağlığı problemidir (Altunkaynak and Özbek, 2006). Obezite en basit haliyle alınan enerjiye denk bir şekilde harcanmaması sonucu yağ dokusunun artmasıdır (Arslan, 2015). Obez bireylerdeki vücut kütle indeksi (VKİ) değerleri Tablo 1.'deki gibidir.

**Tablo 1.** Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Vücut Kütle İndeksi (kg/m<sup>2</sup>) Değerlendirmesi

< 18.5 kg/m <sup>2</sup>	Zayıf
18.5-24.9 kg/m <sup>2</sup>	Normal
25.0-29.9 kg/m <sup>2</sup>	Hafif Şişman (Pre-obezite)
30.0-34.9 kg/m <sup>2</sup>	1. Derece şişman
35.0-39.9 kg/m <sup>2</sup>	2. Derece şişman
> 40 kg/m <sup>2</sup>	3. Derece şişman

Obezite prevalansında endüstrileşme ve teknolojinin gelişmesi ile her ülke ve bölgede belirgin bir artış gözlenmektedir. Özellikle yetişkin kadınlarda erkeklere göre anlamlı bir fark vardır. Obeziteyi genetik etmenler %15 kadar etkilediği için ailesinde obez olanların obezite riski 2-3 kat artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yaptığı çalışmalarda obezite riskli hastalıklar arasında ilk onda yer almaktadır, son çalışmalarda ise kanserle obezite arasında pozitif korelasyon gözlenmektedir. Dünya genelinde obeziteden kaynaklı mortalite en çok ABD'de bildirilmektedir (Uğur and others, 2016). Bin dokuz yüz seksen ile 2008 yılları arasında dünya genelinde obezite prevalansı yaklaşık iki katına ulaştığı gözlenmektedir.

Obezite başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere, hipertansiyon, insülin direnci, diyabet, bazı kanserler, solunum bozuklukları ve psikolojik problemler gibi birçok sağlık sorunlarına yol açan sistemik bir hastalıktır (Uğur and others, 2016). Yüzde 5-10 aralığında kilo kaybı bile sağlıkla ilgili sonuçları önemli ölçüde iyileştirmektedir. Kilo kaybıyla sürdürülebilir hale getirerek obezitenin beraberinde getirdiği sağlık sorunlarını kontrol altına alabilmektedirler (Fruh, 2017).

Obezite, ihtiyaçtan ve kullanılan fazla enerji alma, fiziksel aktivitenin az olması veya hiç olmaması, psikolojik rahatsızlıklar, genetik, metabolik ve hormonal bozukluklardan dolayı gelişebilmektedir. Etiyolojik olarak, geçmiş dönemlerde insanların besine ulaşmasının zor olması, gelişen evrimle birlikte genlerimize yer ettiği teorisi ileri sürülmektedir. Fakat obezitenin asıl ve en önemli nedeni uygulanan beslenme biçimidir. Gereğinden fazla alınan enerji, obeziteye neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda obezite ile ilgili risk faktörlerinin asıl nedeninin tek başına fazla vücut ağırlığı olmadığı, gereğinden fazla olan vücut yağının hangi bölgelerde yayılım gösterdiğine de bağlı olduğu belirtilmektedir. Visseral yağ birikimi, pro-oksidan ve pro-inflamatuvar olayları uyarır. Komorbid gelişiminde oksidatif stresin rolü olduğu bildirilmektedir. Oksidatif stres, beyaz yağ dokusunun birikimini uyarır ve besin alma ihtiyacını artırarak obeziteyi tetikler. Kilo alımının azaltılmasının oksidatif stresi azalttığı bildirilmektedir (Manna and Jain, 2015). Ayrıca yapılan çalışmalarda günde altı veya yedi saatten az uyuyanların obezite riskini arttırdığı bildirilmektedir. Az uyuyan kişilerde leptin konsantrasyonunun düşük, ghrelin konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmektedir. Bu hormonlardaki değişiklikler, obezite riskini arttırmaktadır (Nedeltcheva and Scheer, 2014).

## MİKROBİYOTA

Son zamanlarda mikrobiyom ve mikrobiyota terimleri ile sıklıkla karşılaşmaktadır. Mikrobiyom, insanlarla kommensal olarak yaşayan mikroorganizmaların taşıdıkları genleri, mikrobiyota ise insanlarla birlikte yaşayan özel türlerin tamamını ifade etmektedir (Alagöz, 2017). Mikroorganizmalar, sağlıklı bir insanda vücut kütlelerinin sadece %1-2'sini oluşturur; buna rağmen insan vücudundaki mikrobiyal hücre sayısının insan hücresinin 10 katı, mikrobiyal genlerin ise toplam insan geninin 100 katı olduğu düşünülmektedir (Çetinbaş and others, 2017). Gastrointestinal kanal, vücutta en fazla yer kaplayan alanlardan birisidir. Gastrointestinal sistemde kolonize olan bakteri, virüs, mantar, protozoa gibi mikroorganizmalardan oluşan ve organ gibi işlev gören ekosistem "bağırsak mikrobiyotası" olarak tanımlanmaktadır. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinomycetes*, *Verrucomicrobia* ve *Fusobacteria* bağırsaktaki ana bakteri gruplarıdır

(Özdemir and Demirel, 2017). Bunların içinden en baskın olan floralar ise mikrobiyotanın %60'ını oluşturan gram pozitif *Firmicutes* ve gram negatif *Bacteroidetes* (Altuntaş and Batman, 2017).

Doğum şekli, anne sütü alımı, antibiyotik kullanımı ve yaşanan çevre gibi birçok faktör bağırsak mikrobiyotasının oluşumunu ve floranın çeşitliliğini etkilemektedir. Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda fetüsün doğum anında mikrobiyolojik olarak steril dünyaya geldiği kabul edilmiştir. Fakat yapılan son çalışmalarda fetüsün intrauterin dönemden itibaren mikroorganizmalara maruz kaldığı ve steril olmadığı saptanmıştır (Güney and Çınar, 2017). Doğumun şekline bağlı olarak yenidoğan florasındaki bakteri kolonizasyonu değişiklik göstermektedir. Vajinal yolla doğan bebeklerde *Lactobacillus*, *Prevotella* ve *Sneathia* spp.'den oluşan mikrobiyota görülürken, sezaryenle doğan bebeklerde ağırlıklı olarak *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium*'dan oluşan mikrobiyota görülmektedir. Çünkü normal doğan bebeklerde doğum anında maternal vajinal traktustan gelen bakterilere, sezaryenle doğanlarda ise maternal cilt bakterilerine maruziyet olmaktadır (Yılmaz and Altındaş, 2017).

Mikrobiyotayı etkileyen ilk diyetel etmen anne sütü alma durumudur. Çünkü anne sütü, prebiyotikler ve probiyotikleri bir arada içeren sinbiyotik bir besindir. Anne sütünde bulunan oligosakkarit, lizozom, laktoferrin, antikor ve sitokinlerin bağırsaktaki *Bifidobacterium* sayısını arttırdığı iyi bilinmektedir. Ek besinlere başlama süreci ile birlikte bağırsak mikrobiyotası (BM) hızlı bir şekilde gelişmeye devam etmektedir. Katı gıdaların beslenmeye girişi ile diyetteki değişiklikler sonucu yeni suşlara zemin hazırlayıp zamanla yetişkin mikrobiyotası oluşmaktadır. Mikrobiyota yaklaşık 2-3 yaşlarında, yetişkin mikrobiyotasına benzer kompozisyon ve çeşitliliğe ulaşmaktadır (Özdemir and Demirel, 2017).

## MİKROBİYOTA VE OBEZİTE İLİŞKİSİ

Beslenme alışkanlıkları, insan BM'sinin çeşitliliğine katkıda bulunan başlıca faktörlerdir. Kısa ve uzun sürede uygulanan diyetin türü, gıdalardan enerji ekstraksiyonuna ve enerji dengesinin düzenlenmesine katkıda bulunan bakteriyel metabolitleri etkilemektedir. Bağırsak mikrobiyotası enerji ekstraksiyonunu artırır, immün sistemin düzenlenmesini sağlar, lipid metabolizmasını değiştirir ve konak metabolizmasını etkiler. Bu etkiyi mikrobiyotanın varlığı ve oluşturduğu metabolitler sağlar. Son yıllarda elde edilen kanıtlar öncülüğünde bağırsak mikrobiyotası obezitenin, obezite ile ilişkili inflamasyonun ve kardiyometabolik komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Isolauri, 2017; Yıldırım and Altun, 2014).

Obezite oluşmasında bağırsak mikrobiyomunun etkisini açıklayabilmek için bazı mekanizmalar düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan birinin, enerji düzenlemesi ve mikroorganizmanın insanlar tarafından sindirilmeyen diyetel polisakkaritlerini fermente edebilme kabiliyeti, diğerinin ise adenosin monofosfat kinazı (AMPk) baskılayarak karaciğer yağ asidi oksidasyonunu azaltma becerisi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Al-Assal and others, 2018).

## Bağırsak Mikrobiyotası ve Diyet

Besin tüketimi ve BM arasında karşılıklı ve güçlü bir etkileşim bulunmaktadır. Bağırsaktaki mikroorganizmaların, bazı vitaminlerin sentezini veya bazı besin bileşenlerinin metabolizmasını etkileyebildiği, yani mikrobiyotanın beslenme üzerine etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Ayrıca diyet profilindeki kısa süreli değişikliklerin bile insan bağırsak mikrobiyomunu değiştirebileceği çeşitli çalışmalarla sunulmuştur (Al-Assal and others, 2018; Özdemir and Demirel, 2017).

Diyetin, BM üzerindeki önemi, Avrupalı (İtalyan) çocukların bağırsak mikrobiyomu ile kırsal alanlarda yaşayan Afrikalı çocuklarınkini karşılaştıran bir çalışma ile anlaşılmıştır. Bu çalışma sonucunda, bitkisel kaynaklı ve yüksek posalı vejetaryen diyetle beslenen Afrikalı çocuklarda, batı diyetiyle beslenen İtalyan çocuklara göre *Enterobacteriaceae* ailesinden daha az bakteri, daha yüksek *Bacteroidetes* ve daha az *Firmicutes* olduğu görülmüştür (Al-Assal and others, 2018).

Tablo 2, batı diyetleri, vejetaryen ve kalori kısıtlama diyetleri gibi çeşitli şeker, yağ ve protein seviyelerine sahip birbirinden farklı diyet türlerini tükettikten sonra BM'de oluşan değişiklikler hakkında yapılmış son çalışmaların bir özetini oluşturmaktadır (Baothman and others, 2016).

**Tablo 2.** Farklı diyetlerin bağırsak mikrobiyotası üzerine etkisi (Baothman and others, 2016)

Diyet Tipi	Bakteriyel etkisi
Yüksek Yağlı Diyet	İleum'da <i>Clostridia</i> cinsinin azalması. <i>Bacteroidetes</i> cinsinin kalın bağırsakta artışı <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., ve <i>Enterococcus</i> spp. artışı, <i>Clostridium leptum</i> ve <i>Enterobacter</i> spp. 'de azalma <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> oranında artış ve <i>Enterobacteriaceae</i> artışı <i>Bacteroidales</i> , <i>Clostridiales</i> ve <i>Enterobacteriales</i> artışı
Vejeteryan Diyet	<i>Acteroides</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Escherichia coli</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> spp. 'de azalma <i>Enterobacteriaceae</i> 'da azalma ve <i>Bacteroides</i> 'te artış <i>Bacteroidetes</i> artışı, <i>Firmicutes</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> 'da azalma
Kalori Kısıtlama Diyetleri	<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> oranında azalma

### Makrobesin Ögelerinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi

Karbonhidratlar, vücudun en önemli enerji kaynağı olduğu gibi, mikrobiyotanın da esas enerji kaynağıdır. Büyük moleküllü karbonhidratlardan olan polisakkaritler; sindirilemediğinde fermentasyona uğrayarak kısa zincirli yağ asitlerini (KZYA) oluşturmaktadır. KZYA, besinlerin emilimini ve depolanmasını arttırmaktadır (Tekin and others, 2018).

Diyetin yağ içeriği de BM kompozisyonunun değişiminde bir takım etkilere sahiptir. Yüksek yağlı diyet tüketimini takiben mikrobiyotadaki gram-negatif bakteri sayısının arttığı ve lipopolisakkarit (LPS) üretim mekanizmasının tetiklendiği bilinmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı beslenme sonucunda farelerin bağırsaklarında LPS üretimi artışı, vücut ağırlığı artışı, açlık hiperglisemisi ve hiperinsülinemi gözlemlenmiştir (Tekin and others, 2018).

Diyet ile alınan proteinlerin %10'u kolona ulaşmakta ve karbonhidratlar gibi fermentasyona uğramaktadır. Fermente olan proteinlerden amonyak, etanol, organik asitler ve hidrojen sülfat gibi çeşitli metabolik ürünler oluşmaktadır. Bu metabolik ürünlerin kolorektal kanser, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve ateroskleroza neden olabildiği düşünülmektedir (Tekin and others, 2018).

### Prebiyotiklerin ve Probiyotiklerin Mikrobiyota Üzerine Etkisi

Dünya Sağlık Örgütü, seçici olarak fermente olabilen, mide-bağırsak sisteminde bulunan mikroorganizmaların bileşimini ve/veya aktivitesini etkileyerek, konakçı sağlığı üzerinde pozitif etkileri olan besin bileşenlerini 'prebiyotik'; yeterli düzeyde alındığında intestinal mikrofloranın özelliklerini geliştirerek, konakçı sağlığını pozitif etkileyen canlı mikroorganizmaları ise 'probiyotik' olarak tanımlamaktadır (Özdemir and Demirel, 2017). Probiyotiklerin bağırsak mikroflorasına etkisi, bağırsak yüzeylerine yapışmaları, asidik pH direnci ve safra tuzu toleransına göre değişmektedir (Million and others, 2013). Yapılan birçok çalışmada, düzenli probiyotik alımının total bakteri yükünün yanı sıra *Bifidobacteria* ve *Lactobacilli* türlerini de arttırdığı gözlenmiştir (Özdemir and Demirel, 2017).

Obez kişilerin BM'sine probiyotiklerin ve prebiyotiklerin müdahalesi ile metabolik bozukluklarda, vücut yağ dokusu oranında ve bağırsak inflamasyonlarında iyileşme görülmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda sınırlı sayıda sonuçlar elde edilmiştir. Probiyotikler, birçok yararlı mikroorganizmanın büyümesini destekleyerek, mikrobiyal çeşitliliği artırır ve inflamasyonu iyileştirme imkânı sunar. Yapılan bazı çalışmalarda prebiyotik olarak inulin tipi fruktanların eklenmesiyle *Bifidobacterium* ve *F. prausnitzii* sayılarının arttığı görülmüştür. Öte yandan probiyotiklerin, deneysel çalışmalarda inflamasyon veya metabolik belirteçleri düzenlemek için *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi bakterileri ortaya koyarak BM'sinin içeriğini doğrudan değiştirdiği görülmüştür. Ancak yağlı karaciğer ve nonalkolik steatohepatitin azaltılmasında önemli veriler elde edilmesine rağmen, vücut ağırlığının veya yağ dokusu oranının azaltılması üzerindeki etkileri henüz yeterli düzeyde değildir (Hyer, 2018). Bir başka çalışmada ise kalori kısıtlanması ile

birlikte probiyotik tedavisi uygulandığında vücut ağırlığındaki azalmada ve metabolik iyileşmede artış olduğu görülmüştür (Dao and Clément, 2018). Ayrıca belirtmek gerekir ki probiyotiklerin vücut ağırlığına potansiyel faydası, o probiyotiğin tür ve suşlarına spesifiktir (Rouxinol-Dias and others, 2016).

### **Sinbiyotikler**

Prebiyotik ve probiyotiklerin kombinasyonuna sinbiyotik denilmektedir. Sinbiyotikler bağırsak mikroflorasına ve konakçı sağlığına prebiyotik ve probiyotiklerin tekli alımlarına kıyasla daha etkilidir. Çünkü sinbiyotikler, probiyotiklerin daha uzun süre hayatta kalmalarını ve büyümelerini teşvik eden prebiyotikler ile probiyotiklerin bir arada bulunmalarını sağlamaktadır. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar sinbiyotiklerin, prebiyotiklere veya probiyotiklere kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir ancak bu bulguların iyi kontrollü insan müdahale çalışmalarıyla kanıtlanması gerekmektedir. Bugüne kadar sınırlı sayıda yapılan araştırmalarda sadece obezite üzerindeki sinbiyotiklerin etkileri incelenmiştir (Davis, 2016).

### **Bariatrik Cerrahi**

Bariatrik cerrahi morbid obezlerde ve obezitenin beraberinde getirdiği metabolik komplikasyonlar için bilinen en etkili tedavi yöntemidir. Ameliyat sonrası kilo kaybının korunması için hastaların cerrahi sonrası yaşam tarzı değişikliklerini benimsemesi gerekmektedir (Sherf Dagan and others, 2017).

Obezite cerrahisindeki asıl amaç kişiyi ideal vücut ağırlığına ulaştırmaktır. Laparoskopik Sleeve Gastrektomi (LSG); günümüzde sıkça uygulanan, mide hacmini azaltarak besin alımını kısıtlayıcı bir operasyondur. Genişlemiş midenin yaklaşık %80 kadarının, laparoskopik olarak çıkartılması ile midenin ince bir tüp haline gelmesi amaçlanmaktadır. LSG de gastrointestinal sistemde bütünlük korunur, besinlerin emiliminde de herhangi bir sorun oluşmamaktadır. Roux-en-Y Gastric ByPass (RYGB); hem besin alımını hem de bağırsaktan besin emilimini azaltıcı özelliğe sahip bir operasyondur. Gastrik Bypass ameliyatı teknik olarak midenin küçültülmesi ve küçülen mideye ince bağırsağın belli bir segmentinden alınıp yukarıya bağlantı yapılması ile oluşturulmaktadır (Anuk and others, 2017).

Bariatrik cerrahi sonucunda bağırsağın yeniden yapılandırılması hastaların mikrobiyotalarında değişikliklere ve metabolik iyileşmelere sebep olmaktadır. Ancak insanlarda bariatrik cerrahi sonrası yapılan BM çalışmaları, çoğunlukla küçük örneklem boyutlarına sahip olduğu için çelişkili sonuçlar vermekte, bu yüzden uzun süreli ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bir araştırmada, bariatrik cerrahi sonrasında *A. muciniphila* ve *Proteobacteria* artışı gözlenmiştir (Dao and Clément, 2018). Başka bir çalışmada ise ratlarda RYGB cerrahisinden sonra 8 haftalık süreçte *Proteobacteria* filumuna ait bakterilerden özellikle *Enterobacter hormaechei* türünde 52 kat artış belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sham opere ratlar ile karşılaştırıldığında *Firmicutes* filumunda 4,5 kat, *Bacteroidetes* filumunda iki kat azalma saptanmıştır. *Firmicutes/Bacteroides* oranı obez bireylerde yüksek iken tıbbi beslenme tedavisi ve RYGB sonucunda azaldığı belirtilmektedir. Liou ve ark. farelerde RYGB sonrası mikrobiyota kompozisyonundaki değişikliği en erken birinci haftada gözlemlenmiş, beşinci haftadan sonra mikrobiyotanın aynı şekilde kaldığı sonucuna varmışlardır. Başka bir rat çalışmasında, BM'deki cerrahi işlem sonrası değişikliğin uzun bir süreçte (9 yıl) olduğu, bu durumun da yağ kütlesini düzenlediği görülmektedir. Liou ve ark., RYGB geçirmiş farelerden, cerrahi işlem geçirmemiş farelere BM'nin aktarılması sonucu cerrahi işlem geçirmemiş farelerde de ağırlık ve yağ dokusu kaybı gözlemlendiğini ve bu durumun KZYA üretimindeki değişikliğe bağlı olarak gerçekleştiğini belirtmektedirler. *Proteobacteria* filumunun düzeyi tıbbi beslenme tedavisinden etkilenmezken, gastrik bypass sonrasında artış gösterdiği belirlenmiş ancak bu bakteri grubunun proinflatuar etkilerinden dolayı bağırsak için yararlı olmadığı düşünülmektedir (Uzdil and Saka, 2018).

### **Fekal Transplantasyon ve Obezite**

Beslenme alışkanlıkları obezitenin patofizyolojisinde en önemli etkidir fakat BM büyük ölçüde besin ve enerji alımını düzenleyebilmektedir. Obezite ve BM arasındaki bağlantı, hastanın uyguladığı diyetin, genetiğinin, yaşının, yaşam tarzının, hormonlarının ve obezite sonucu oluşan metabolik bozukluklarının da eklenmesi ile daha karışık bir hale gelmektedir (Carlucci and others, 2016). Yapılan çalışmalar sonucu, disbiyoz ile obezite riski artışı arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmektedir (Isolauri, 2017).

Gelişmekte olan ülkelerde yetersiz beslenen çocuklar kronolojik yaşlarından daha genç bir BM görüntüsü sergilerken, aşırı kilolu çocuklarda ise BM'de erken olgunlaşma görülmüştür. Yapılan bazı deneysel çalışmalar obez bir bireyden alınan BM'nin, mikropsuz bir bağırsağa transplantasyonu sonucu, alıcının obez fenotipine ulaştığını göstermektedir (Isolauri, 2017). Bakıldığında obez farelerden mikrobiyota transplantasyonu, mikrop

barındırmayan hayvanlarda yağ kütlesini artırmaktadır. Bu da obez hayvanlarda, vücut ağırlığının artmasına yardımcı olan bir mikrobiyal bileşim olduğunu göstermektedir (Cox and others, 2015).

Adolesanlarda ve erişkinlerde, *Proteobacteria* sayısındaki artış, disbiyozun karakteristik bir özelliği olarak kabul edilirken, *Verrucomicrobia*'nın bir üyesi olan *Akkermansia muciniphila*, inflamasyon ve yağ dokusu metabolizmasını kontrol altında tutabilmektedir.

Gebe kadınlar ile yapılan bir çalışmada, özellikle *Bifidobacterium* miktarının fazla olmasının, aşırı kilolu bebek gelişimine karşı koruma sağladığı, diabetes mellitus hastalığı olan annelerden doğan bebeklerin mekonyum mikrobiyotasının, yetişkin diyabetik bir bireyin gaitasına benzediği gözlemlenmiştir<sup>16</sup>. Yapılan bu çalışmaların ışığında, mikrobik bileşimin ağırlık kontrolü üzerinde etkisi olduğu kanısına varılmaktadır.

## SONUÇ

Günümüzde mikrobiyota, birçok hastalığa etki eden bir faktör olarak kabul edilmektedir. Beslenme ve diyet bileşimi mikrobiyotayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Çeşitli diyet türlerinin mikrobiyota üzerindeki etkisi farklı çalışmalarla incelenmiştir. Farklı oranlarda karbonhidrat, yağ ve protein içeren diyet stratejilerinin mikrobiyota kompozisyonunu değiştirebildiği görülmektedir. Diyet uygulamalarına ek olarak, probiyotik ve prebiyotik alımının bağırsak florasını olumlu etkilediği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra bariatrik cerrahi ve fekal transplantasyon uygulamaları mikrobiyota içeriğinin değişmesini sağlayarak obezite üzerine terapötik etki göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda bu müdahalelerin etkisi olduğu düşünülmekte, ancak kesin bir kanıya varılması için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Al-Assal K, Martinez AC, Torrinhas RS, Cardinelli C, Waitzberg D. 2018. Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental* 20:60-64.
- Alagöz AN. 2017. Mikrobiyota ve Nörodejenerasyon. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research* 1:115-122.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. 2006. Obezite: nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi* 13(4):138-142.
- Altuntaş Y, Batman A. 2017. Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Türk Kardiyol Dern Ars* 45(3):286-296.
- Anuk T, Köksal N, Avşar F, Diken Allahverdi T, Sulu B, Çakmur H. 2017. Bariatrik cerrahi ile ilgili ilk sonuçlarımız. 82-85 p.
- Arslan N. 2015. Obezite Tedavisi: Beslenme. *Türkiye Klinikleri Pediatric Sciences-Special Topics* 11(3):76-82.
- Aygin D, Açıl H. 2015. Morbid Obezlerde Bariyatrik Cerrahi Sonrası Erken Dönem Hemşirelik Bakımı. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*:604.
- Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. 2016. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease* 15(1):108.
- Carlucci C, Petrof EO, Allen-Vercoe E. 2016. Fecal Microbiota-based Therapeutics for Recurrent *Clostridium difficile* Infection, Ulcerative Colitis and Obesity. *EBioMedicine* 13:37-45.
- Cox AJ, West NP, Cripps AW. 2015. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 3(3):207-215.
- Çetinbaş S, Kemeriz F, Göker G, Biçer İ, Velioğlu YS. 2017. İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri. *Academic Food Journal/Akademik GIDA* 15(4).
- Dao MC, Clément K. 2018. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *European Journal of Internal Medicine* 48:18-24.
- Davis CD. 2016. The Gut Microbiome and Its Role in Obesity. *Nutrition today* 51(4):167-174.
- Fruh SM. 2017. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 29(S1):S3-S14.
- Güney R, Çınar N. 2017. Anne Sütü ve Mikrobiyota Gelişimi. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research* 1:17-24.
- Hyer S. 2018. Chapter 7 - The Role of Human Gut Microbiota in Obesity. In: Weaver JU, editor. *Practical Guide to Obesity Medicine*: Elsevier. p 71-76.
- Isolauri E. 2017. Microbiota and obesity. *Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease* 88:95-106.
- John GK, Mullin GE. 2016. The gut microbiome and obesity. *Current oncology reports* 18(7):45.

- Manna P, Jain SK. 2015. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 13(10):423-444.
- Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul M. 2013. Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection* 19(4):305-313.
- Nedeltcheva AV, Scheer FA. 2014. Metabolic effects of sleep disruption, links to obesity and diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 21(4):293.
- Özdemir A, Demirel B. 2017. Beslenme ve Mikrobiyota ilişkisi. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY AND STRATEGIC HEALTH RESEARCH* 1:25-33.
- Rouxinol-Dias AL, Pinto AR, Janeiro C, Rodrigues D, Moreira M, Dias J, Pereira P. 2016. Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal* 1(1):12-24.
- Sherf Dagan S, Goldenshluger A, Globus I, Schweiger C, Kessler Y, Kowen Sandbank G, Ben-Porat T, Sinai T. 2017. Nutritional Recommendations for Adult Bariatric Surgery Patients: Clinical Practice. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)* 8(2):382-394.
- Tekin T, Çiçek B, Konyalıgil N. 2018. İntestinal Mikrobiyota ve Obezite İlişkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 27:95-99.
- Uğur K, Şener YS, Özkan Y. 2016. Obezitenin tanımı, epidemiyolojisi ve klinik önemi. *Türkiye Klinikleri Journal of Cosmetic Dermatology Special Topics* 9(2):1-7.
- Uzdil Z, Saka M. 2018. Bariatrik Cerrahi Uygulamalarının Mikrobiyota Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 1(1):38-44.
- Yıldırım AE, Altun R. 2014. Obezite ve Mikrobiyota.
- Yılmaz K, Altındış M. 2017. Sindirim Sistemi Mikrobiyotası ve Fekal Transplantasyon. *Nobel Medicus Journal* 13(1).

## Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerlerinin analizi

İbrahim Bolat<sup>1\*</sup>, İbrahim Halil Yiğit<sup>2</sup>, Ali İkinci<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>Birecik Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü, Birecik, Şanlıurfa, Türkiye

\*Sorumlu yazarlar e-mail: [ibolat@harran.edu.tr](mailto:ibolat@harran.edu.tr), [aliikinci@harran.edu.tr](mailto:aliikinci@harran.edu.tr)

### Özet

Bir bölgenin etkili sıcaklık toplamı ile bu bölgede yetiştirilecek olan tür veya çeşitlerin ürünlerini olgunlaştırarak, yıllık gelişimlerini tamamlayabilmeleri için ihtiyaç duydukları sıcaklık toplamı isteklerinin önceden bilinmesi, bölgeye uygun tür ve çeşitlerin seçilmesine yardımcı olacaktır. Bu çalışmada, 1975-2010 yılları arasındaki belirli yıllara ait Şanlıurfa Meteoroloji İstasyonu sıcaklık verilerine dayanarak, 1 Mart- 31 Ekim tarihleri arasında ilin etkili sıcaklık toplamı (EST) değeri belirlenmiştir. Çalışmada; eşik sıcaklık değerleri 5, 7 ve 10 °C olarak alınmış ve meteoroloji istasyonundan elde edilen kayıtlara göre her bir eşik sıcaklık değerleri için ayrı ayrı hesaplamalar yapılmıştır. Şanlıurfa ilinin uzun yıllara ait iklim verilerine göre, +5 °C eşik sıcaklık değeri esas alınarak yapılan hesaplamalarda, Mart-Ekim dönemindeki EST değerlerinin 4274-5019 °C-gün, +7 °C'lik eşik değerine göre 3810-4534 °C-gün ve +10 °C eşik değeri esas alınarak yapılan hesaplamalarda ise 3100-3802 °C-gün aralığında yer aldığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimer:** Etkili sıcaklık toplamı, EST, iklim değişikliği

### 1. GİRİŞ

Birbirinden farklı karakter gösteren meyvecilik bölgeleri için uygun tür ve çeşit seçiminde, yetiştiricilik bölgesinin özelliklerinin (özellikle iklim yapısının) ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. İklimle ilişkin görülen farklı özelliklerin önceden bilinmesi, bölge için tür ve çeşit seçiminde yardımcı olmakla kalmayıp, aynı zamanda verim ve kaliteyi artırmada alınacak önlemler konusunda katkılar sunmaktadır.

Bir yörede ekonomik anlamda meyve yetiştiriciliği yapabilmek için, o yörenin etkili sıcaklık toplamı ile yörede yetiştirilecek tür ve çeşitlerin etkili sıcaklık toplamı isteklerinin bilinmesi, yetiştiricilik açısından yöreye uygun tür ve çeşitlerin seçilmesine yardımcı olacaktır (Ünver ve Çelik, 1999). Meyve çeşitlerinin, soğuklama ve sıcaklık toplamı ihtiyaçları ile yetiştiricilik yapılacak bölgenin iklim koşullarının bilinmesi, ağaçların bölgeye adaptasyonunu kolaylaştıracak ve ekonomik açıdan daha tatmin edici bir yetiştiricilik yapılmasını sağlayacaktır (Aslamarız ve ark. 2009; Campoy ve ark. 2012).

Bir derece-gün (aynı zamanda büyüme derece-gün, ısı birimi veya termal birim olarak da adlandırılır), 24 saatlik bir süre boyunca belirli bir eşik sıcaklığının üzerinde biriken ısı miktarının bir ölçüsüdür. Ortalama sıcaklık, 24 saat boyunca belirtilen bir eşik sıcaklığın üzerinde kalırsa, her derece için bir derece-gün birikir ve 24 saatlik bir süre boyunca birkaç derece-gün birikebilir. Bununla birlikte, derece günlerinin sadece belirtilen eşik sıcaklığına göre anlam taşıdığını anlamak önemlidir (Herms, 2004).

Üretim yapılacak olan bölgede ürünün yetiştirileceği dönemdeki sıcaklık toplamı (°C-gün) değerleri bilinirse, ekim-dikimin ne zaman yapılacağı, bitkinin ne zaman çiçekleneceği, ne zaman hasada geleceği ve pazarlanabileceği önceden tahmin edilebilir (Yoldaş ve Eşiyok, 2005).

Ürünler, kritik dönemlerinde yüksek ve düşük sıcaklıklardan etkilenebilecekleri için, ekim-dikim zamanları, don ve sıcak zararını minimize etmek amacıyla ayarlanabilir, bu da termal zaman modelleri kullanılarak gerçekleştirilebilir. Hasat tarihi için kullanılan en yaygın yaklaşım °C- günlerdir (Yoldaş ve Eşiyok, 2005).

Bitkilerin gelişme evresini tamamlaması için belli bir sıcaklık toplamına ihtiyaçları vardır. Eşik sıcaklık ve sıcaklık toplamı değerleri bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir. Bu ihtiyacı karşılamak için minimum gelişme eşik sıcaklık derecesinin üzerindeki günlük sıcaklık toplamları alınmaktadır. Örneğin sert çekirdekli meyveler için +5°C, yumuşak çekirdekli meyveler için +7 °C, asmalar için +10°C, zeytin ve antepfıstığı için +12°C olarak kabul edilmektedir (Ağaoğlu ve ark., 1995). Ünver ve Çelik (1999), 1995 -1996 yıllarında sert çekirdekli ve yumuşak çekirdekli meyve türleri üzerinde yaptığı çalışmada, etkili sıcaklık toplamı isteklerinin belirlenmesinde eşik sıcaklığı; sert çekirdekli meyveler için +7 °C kabul ederken, yumuşak çekirdekli meyveler için +10 °C olarak kabul etmişlerdir.



Büyüme derece-gün toplamını hesaplamak için “ortalama yöntem”, “modifiye ortalama yöntem” ve “modifiye sinüs dalgası yöntemi” kullanılmaktadır. Her üç yöntemle de günlük minimum ve maksimum sıcaklık ile belirtilen bir eşik sıcaklığa göre derece-günler hesaplanır (Herns, 2004).

Bu çalışmada, Şanlıurfa iline ait iklim verileri kullanılarak, meyvecilik tarımı açısından önemli ve iklime dayalı bir özellik olan etkili sıcaklık toplamının hesaplanması ve bu sayede meyve üreticilerin bölgeye uygun tür ve çeşit seçimine yardımcı olunması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

Araştırma, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü’nden temin edilen Şanlıurfa iline ait iklim verileri üzerinde yürütülmüştür. Şanlıurfa Meteoroloji İl Müdürlüğü’nde bulunan meteoroloji istasyonunda 1975 – 2010 yılları arasında yedi yıllık aralıklarla alınan altı farklı yılda ölçülen saatlik ve günlük sıcaklık verileri çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Elde edilen sıcaklık verileri amaç doğrultusunda yeniden düzenlenerek, Excel ortamına aktarılmıştır.

Çalışma kapsamında, her yıl için günlük büyüme derece-günleri (BDG = Growing Degree Days (GDD)), ölçülen günlük maksimum ( $T_{max}$ ) ile minimum ( $T_{min}$ ) hava sıcaklıklarına ve bir eşik veya taban sıcaklığına ( $T_{base}$ ) göre Mart-Ekim ayları arasında hesaplanmıştır.

Çalışma kapsamında, sıcaklık toplamı süreleri için büyüme gün- derece yöntemi kullanılmıştır.

### **Büyüme gün-derece yöntemi:**

Çalışmamızda eşik sıcaklık değeri 5 °C, 7 °C ve 10 °C olarak alınmış, istasyondan elde edilen kayıtlardan bu eşik sıcaklık değerleri için ayrı ayrı hesaplamalar yapılmıştır. Sıcaklık toplamı hesaplamasında Mart ayı başından - Ekim ayı sonuna kadarki evre dikkate alınmıştır. Bu hesaplamada öncelikle eşik sıcaklığın üzerindeki günlük ortalama sıcaklıktan eşik sıcaklık çıkartılarak, günlük değerler elde edilmiştir. Daha sonra Mart ayından - Ekim ayına kadar geçen süredeki değerler toplanarak, toplam etkili sıcaklıklar (°C-gün) "gün-derece" olarak bulunmuştur (Çelik ve ark, 1988; Ryugo 1988; Galletta ve Himelrick, 1990; McMaster ve Wilhelm, 1997).

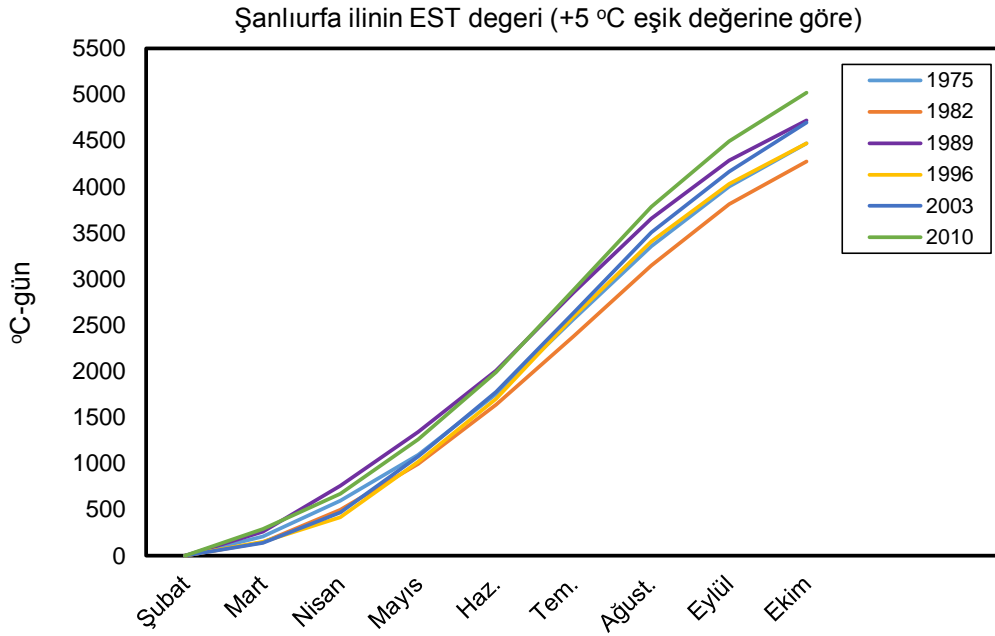
Büyüme gün-derece değerleri (BDG = GDD) Rickman ve ark. (1983) tarafından önerilen aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$BDG = \frac{(T_{max} + T_{min})}{2} - T_{base}$$

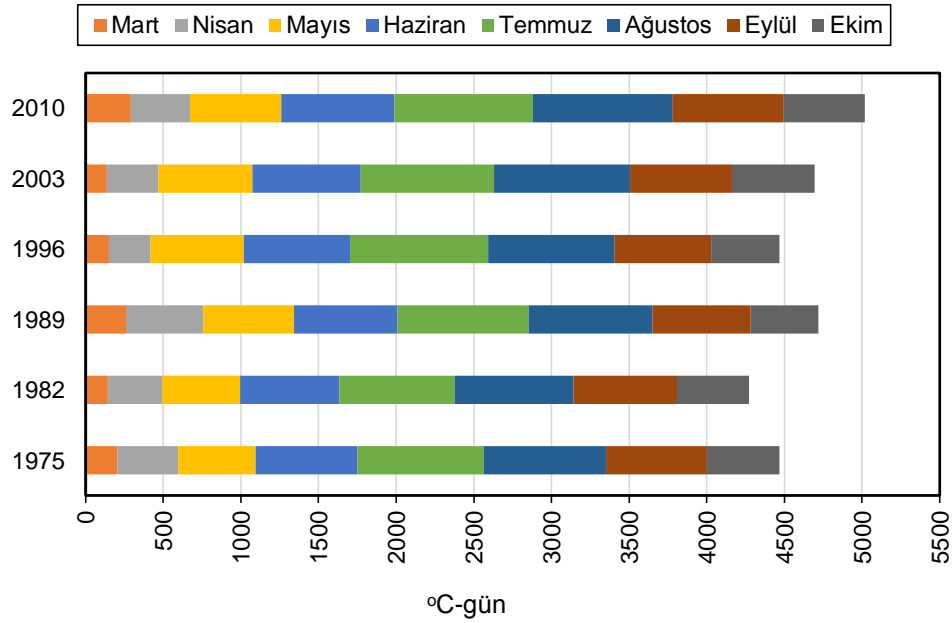
Burada;  $T_{max}$ : maksimum günlük sıcaklığı,  $T_{min}$ : minimum günlük sıcaklığı ve  $T_{base}$  ise her çalışma sahası için istenilen eşik sıcaklığı göstermektedir.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

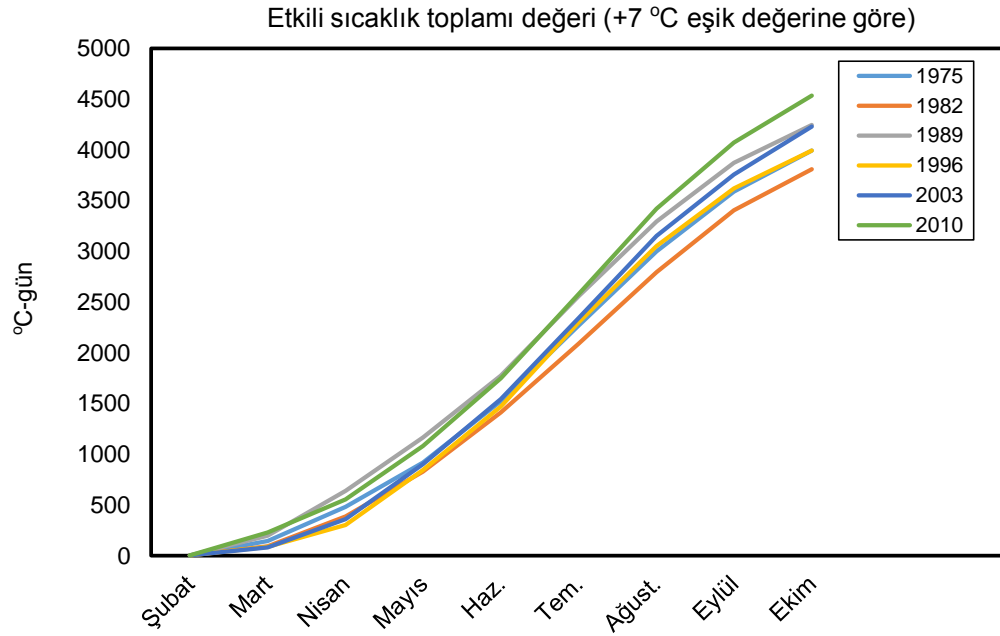
Meteoroloji Şanlıurfa İl Müdürlüğü’nün il merkezindeki meteoroloji istasyonunda, 1975-2010 yılları arasında ölçülen hava sıcaklığı kayıtlarından yararlanarak, 7 yıllık aralarla +5 °C eşik değer esas alınarak yapılan hesaplamalarda, Mart-Ekim dönemindeki en düşük (sıcaklık toplamı) değerinin 4274-5019 °C-gün arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 1 ve 2). Aynı istasyona ait iklim kayıtlarıyla, +7 °C’lik eşik değer dikkate alınarak yapılan hesaplamalarda, aynı dönemdeki sıcaklık toplamı değerlerinin 3810-4534 °C-gün arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 3 ve 4). Diğer taraftan, aynı sıcaklık verileri üzerinde +10 °C eşik sıcaklık değeri baz alınarak yapılan hesaplamalarda ise Mart-Ekim dönemi arasındaki sıcaklık toplamı değerlerinin 3100-3802 °C-gün aralığında yer aldığı saptanmıştır (Şekil 5 ve 6).



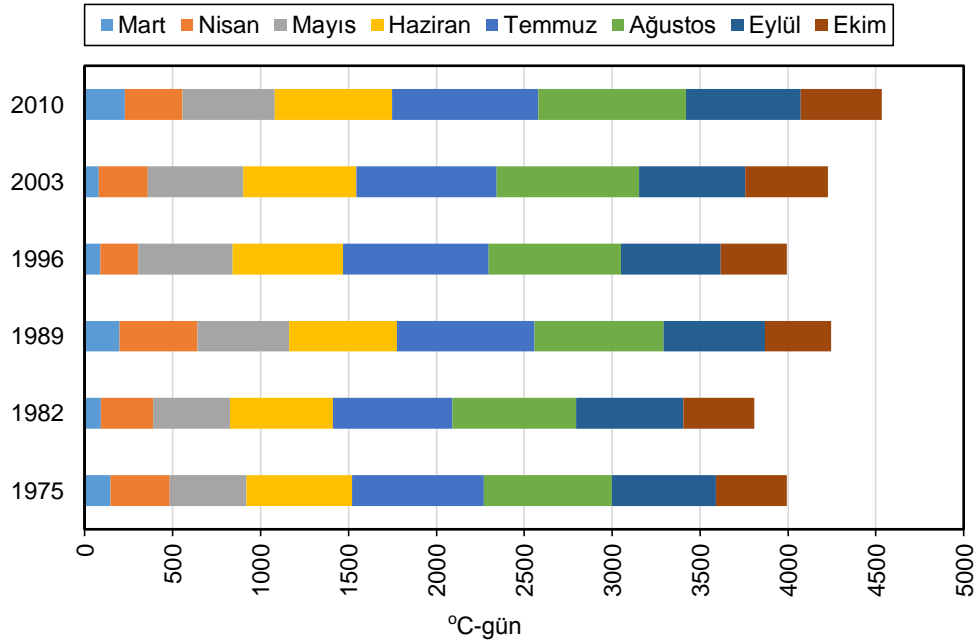
Şekil 1. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+5 °C eşik sıcaklık değerine göre)



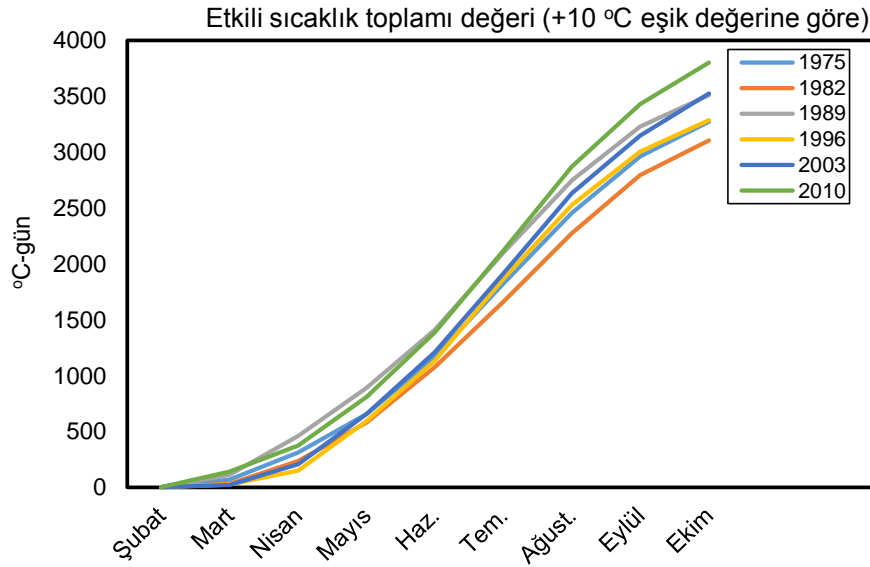
Şekil 2. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+5 °C eşik sıcaklık değerine göre)



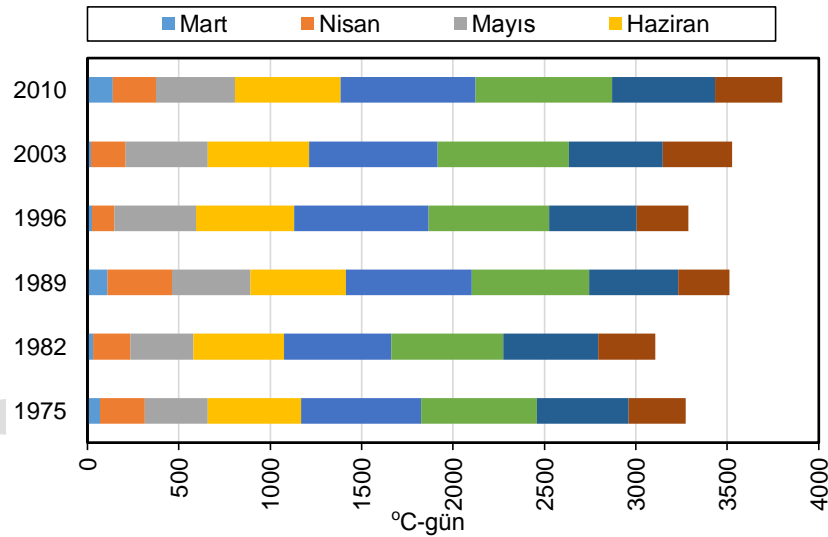
Şekil 3. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+7 °C eşik sıcaklık değerine göre)



Şekil 4. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+7 °C eşik sıcaklık değerine göre)



Şekil 5. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+10 °C eşik sıcaklık değerine göre)



Şekil 6. Şanlıurfa ilinin 1975-2010 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamı değerleri (+10 °C eşik sıcaklık değerine göre)

Kanada'nın değişik şehirlerinde bulunan 115 ayrı istasyondan elde edilen 1956-1985 yılları arası (30 yıllık) iklim verileri kullanılarak, 0, 5 ve 10 °C eşik sıcaklık değerlerine göre belli başlı şehirlerin etkili sıcaklık toplamı süreleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada; 0 °C eşik sıcaklık derecesine göre şehirlerin etkili sıcaklık toplamı süresi 2200-2800 °C-gün, 5 °C eşik sıcaklığa göre 1200-1800 °C-gün ve 10 °C eşik sıcaklığa göre ise 400-800 °C-gün olarak hesaplanmıştır (Gordon ve Bootsma, 1993). Diğer taraftan, Ünver ve Çelik (1999), +7 °C eşik sıcaklık değerini kullanarak, Ankara ilinin 1992 ve 1993 yıllarındaki etkili sıcaklık toplamını sırasıyla; 2307 °C-gün ve 2428 °C-gün olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacıların daha önce yapmış oldukları başka bir çalışmalarında (Ünver ve Çelik, 1996) ise +10 °C eşik sıcaklık değerine göre, Ankara ilinin 1992 ve 1993 yıllarındaki etkili sıcaklık toplamını sırasıyla; 1646 °C-gün ve 1783 °C-gün olarak saptamışlardır. Satıl (2003), Ayvacık (Çanakkale) ve Yunt Dağı (Manisa) yöresinin etkili sıcaklık toplamını +10°C eşik sıcaklık değerine göre sırasıyla; 1724 ve 2922 gün-derece, +12 °C eşik sıcaklık değerine göre ise sırasıyla; 1387 ve 2115 gün-derece (°C-gün) olarak belirlemiştir.

Rodriguez-Rajo ve Frenguelli (2003), Avrupa’da birbirinden farklı iklim özelliği gösteren iki şehirdeki huş ağacı polenlerinin havada dağılım sezonunun tahminini araştırmışlardır. Araştırmada seçilen şehirlerden Vigo (İspanya) daha ılıman, Perugia (İtalya) ise daha soğuk iklime sahiptir. Araştırmacılar; 4, 4.5, 5, 5.5, 6 ve 6.5 °C eşik sıcaklık değerlerini kullanılarak, Perugia ve Vigo şehirlerinin 1994-2001 yılları arasındaki etkili sıcaklık toplamını hesaplamışlardır. Araştırmacılar yapmış oldukları hesaplamalarında, 1994-2001 yılları arasında 4 °C eşik sıcaklık değeri kullanıldığında Perugia şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını 274 °C-gün, Vigo şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını 790 °C-gün; 5 °C eşik sıcaklık değeri kullanıldığında Perugia şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını 216 °C-gün, Vigo şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını 713 °C-gün ve 6.5 °C eşik sıcaklık değeri kullanıldığında Perugia şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını 141 °C-gün, Vigo şehrinin ortalama etkili sıcaklık toplamını ise 597 °C-gün olarak belirlemişlerdir.

Grigorieva ve ark. (2010), Rusya’nın Uzak Doğu’da yer alan 17 ayrı meteoroloji istasyonundan elde edilen 1966-2005 dönemine ait sıcaklık verileri ve 4 farklı eşik sıcaklık değerleri kullanılarak, o yörede bulunan şehirlerin etkili sıcaklıkları hesaplanmıştır. Araştırmacılar, 5 °C eşik sıcaklığa göre 17 ayrı şehrin sıcaklık toplamı süresini 756-2202 °C-gün ve 10 °C eşik sıcaklığa göre ise 282-1381 °C-gün olarak saptamışlardır.

Etkili sıcaklık toplamı süresinin hesaplandığı Mart-Ekim ayları esas alındığında, Şanlıurfa ilinin uzun yıllara ait iklim değerlerine göre (Anonim, 2019), belirtilen ayların sıcaklık ortalaması 23.7 °C’dir (Tablo 1). Yukarıda değişik yıllarda yapılmış yerli ve yabancı bazı araştırma sonuçları verilmiştir. Bu çalışmada geçen şehirlere göre daha güney enlemde yer alan Şanlıurfa ilinin etkili sıcaklık toplamı süresi de dolaylı olarak bu şehirlerden daha yüksek çıkmıştır. Günlük maksimum ve minimum sıcaklık değerleri ortalamalarına göre hesaplanan büyüme derece-günlerinde (BDG), diğer şehirlere göre Şanlıurfa ili hem en yüksek sıcaklık ortalaması hem de en düşük sıcaklık ortalaması değerleri bakımından daha avantajlıdır.

**Tablo 1.** Şanlıurfa ilinin 1981-2018 yılları arasındaki bazı iklim parametrelerinin ay ve yıl ortalamaları (Anonim, 2019’dan alınmıştır)

İklim öğeleri	Oca	Şub	Mar	Nis	May	Haz	Tem	Ağu	Eyl	Eki	Kas	Ara	Ort.
Ortalama Sıc. (°C)	5.9	6.9	11.1	16.4	22.5	28.5	32.2	31.4	26.9	20.4	12.6	7.5	18.5
Ortalama En Yüksek Sıcak. (°C)	10.3	11.8	16.7	22.6	29.0	35.1	39.0	38.5	34.1	27.0	18.2	12.1	24.5
Ortalama En Düşük Sıcaklık (°C)	2.5	3.0	6.4	10.9	16.0	21.3	24.9	24.4	20.4	15.1	8.4	4.3	13.1
En Yüksek Sıcaklık (°C)	21.6	25.5	29.5	36.4	40.0	44.0	46.8	46.2	42.1	37.8	30.8	26.0	46.8
En Düşük Sıcaklık (°C)	-10.6	-12.4	-7.3	-3.2	2.5	8.3	15.0	16.0	10.0	1.9	-6.0	-6.4	-12.4
Ort. Güneşlenme Süresi (saat)	4.0	4.9	6.2	7.6	9.8	11.9	12.0	11.1	9.6	7.5	5.5	3.9	94.0
Aylık Toplam Yağış Miktarı Ort. (mm)	76.7	70.3	63.9	40.9	26.2	4.2	0.9	1.2	4.1	27.7	50.2	67.5	433.8

### 3. SONUÇ

Yapılan hesaplamalara göre, Etkili Sıcaklık Toplamı açısından, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yer alan Şanlıurfa İli için meyve yetiştiriciliği açısından önemli bir sorunun bulunmadığı belirlenmiştir. Hatta badem ve antepfıstığı gibi bazı sert kabuklu meyve türlerinde (yüksek düzeyde bir iç dolgunluğu sağlaması nedeniyle) ülkemizde sıcaklık toplamının yeterli olmadığı birçok meyvecilik bölgesine göre ise yörenin daha fazla avantaja sahip olduğu söylenebilir

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yaz aylarında hava sıcaklığında aşırı yükselmeler meydana geldiği görülmektedir. Bu durum, meyvesi erken dönemde olgunlaşmayan ve yüksek sıcaklıkların görüldüğü dönemde meyvesi ağaç üzerinde kalan tür ve çeşitlerde verim ve kalitede zaman zaman kayıpların meydana gelmesine yol açmaktadır. Hatta bazı ekstrem yıllarda, yaz aylarındaki yüksek sıcaklıklar meyvelerde, dallarda ve ağaç gövdelerinde güneş yanıklığına neden olabilmektedir. Tüm bu durumlar meyve tür ve çeşidine göre değişmekle birlikte, bitki gelişiminde de olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir.

Yaz aylarındaki yüksek sıcaklıkların bölgedeki meyve bahçelerindeki olumsuz etkilerini azaltabilmek için; başta meyvesini erken olgunlaştıran yumuşak ve sert çekirdekli türlerin seçimi yanında, yüksek sıcaklığa dayanım gösteren anaç ve çeşit seçimi olmak üzere, ağaçlara uygun terbiye şeklinin verilmesi, sulama yönetimi, gölge perdelerinin ve bazı yansıtıcı materyallerin kullanımına yönelik önlemlerin alınması faydalı olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ağaoğlu YS, Çelik H, Çelik M, Fidan Y, Gülşen A, Günay A, Halloran N, Köksal İ, Yanmaz R 1995. Genel Bahçe Bitkileri. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları, No: 4, Ankara, 369 s.
- Anonim 2019. Meteoroloji Genel Müdürlüğü, İllere ait mevsim normalleri (1981-2010). <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?k=H&m=SANLIURFA> [Erişim 27.06.2019]
- Aslamar AA, Vahdati K, Rahemi M 2009. Estimation of chilling and heat requirements of some persian walnut cultivars and genotypes. HortScience, 44(3): 697-701.
- Campoy JA, Ruiz D, Alderman L, Cook N, Egea J 2012. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). Europ. J. Agronomy, 37(1): 43-55.
- Çelik H, Marasalı B, Demir İ 1988. Ankara koşullarında yetiştirilen sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinin etkili sıcaklık toplamı isteklerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma. Türkiye III. Bağcılık Sempozyumu, 31 Mayıs-3 Haziran 1988, Bursa, 11 s.
- Galletta GJ, Himelrick DG 1990. Small Fruit Crop Management. Prentice Hall Career & Technology, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Gordon R, Bootsma A 1993. Analyses of growing degree-days for agriculture in Atlantic Canada. Climate Research, 3: 169-176.
- Grigorieva EA, Matzarakis A, Freitas CR 2010. Analysis of growing degree-days as a climate impact indicator in a region with extreme annual air temperature amplitude. Climate Research, 42: 143-154.
- Herms DA 2004. Using degree-days and plant phenology to predict pest activity. V. Krischik, J. Davidson (Eds.), IPM Integrated Pest Management) of Midwest Landscapes, Minnesota Agricultural Experiment Station, pp. 49-59.
- McMaster GS, Wilhelm WW 1997. Growing degree-days: one equation, two interpretations. Agric. Meteorol., 87: 291-300.
- Rickman RW, Klepper BL, Peterson CM 1983. Time distributions for describing appearance of specific culms of winter wheat. Agron J., 75: 551-556.
- Rodriguez-Rajo FJ, Frenguelli G, Jato MV 2003. Effect of air temperature on forecasting the start of the Betula pollen season at two contrasting sites in the South of Europe (1995-2001). Int J Biometeorol, 47: 117-125.
- Ryugo K 1988. Fruit Culture, Its Science and Art. John Wiley and Sons, New York, 344 p.
- Satıl F 2003. Ayvıcık ve Yunt Dağı bölgelerinde yetiştirilen antepfıstığı ağaçları (*Pistacia vera* L.) üzerinde ekolojik ve fenolojik çalışmalar. Ekoloji Çevre Dergisi, 12(47): 5-10.
- Ünver H, Çelik M 1996. Ankara koşullarında bazı yumuşak çekirdekli meyve türlerinin etkili sıcaklık toplamı isteklerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1): 1-5.
- Ünver H, Çelik M 1999. Ankara koşullarında bazı sert çekirdekli meyve türlerinin etkili sıcaklık toplamı isteklerinin belirlenmesi. Turk J. Agric For., 23: 1-5.
- Yoldaş F, Eşiyok D 2005. Termal zamanın (°C-Gün) bitkisel üretimde kullanımı. Ege Üniv. Ziraat. Fak. Dergisi, 42(3): 207-218.

## Şanlıurfa ili soğuklama süresinin Dinamik Model'le hesaplanması ve diğer modellerle karşılaştırılması

Ali İkinci<sup>1\*</sup>, İbrahim Bolat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

\*Sorumlu yazarlar e-mail: aliikinci@harran.edu.tr, ibolat@harran.edu.tr

### Özet

Bir bölge ve yörede ekonomik bir meyve yetiştiriciliği yapılabilmesi için o yerin soğuklama süresinin bilinmesi gerekmektedir. Öte yandan, bir bölge ve yöreye yeni bir tür ve çeşit önerirken, dikkat edilmesi gereken en önemli konuların başında, önerilecek tür ve çeşitlerin soğuklanma ihtiyaçlarının bilinmesi gelmektedir. Meyve türlerinde çiçek ve yaprak tomurcukları, sonbaharda sıcaklıkların düşmesiyle birlikte dinlenmeye girerler. Kış aylarına girilen dönemde çevre koşulları uygun olsa dahi, tomurcuklar süremezler veya açamazlar ve dinlenmede kalırlar. Meyve türlerinde dinlenmenin sona ermesi için etkili soğuklama sıcaklığı 0 °C ile +7.2 °C arasındadır. Bazı türlerde bu sıcaklık +10 °C'ye kadar yükselebilmektedir. Bitki türlerinin soğuklanma ihtiyaçlarını belirlemek veya ölçmek için bir takım model ve yöntemler geliştirilmiştir. Soğuklanma ihtiyacının belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem ve modeller; Klasik Yöntem, Utah Modeli ve Dinamik Model'dir. Klasik yöntem ile Utah modelinin, subtropik iklim özelliği gösteren koşullarda soğuklanma ihtiyacını tespit etmek için uygun bir yöntem olmadığı ifade edilmektedir. Bu çalışmada, yarı kurak iklim özelliği gösteren Şanlıurfa ilinin soğuklama süresinin hesaplanmasında, kışı ılık geçen koşullarda soğuklama süresinin hesaplanmasında diğer modellere göre daha iyi performans gösterdiği belirlenen Dinamik Model ile diğer modellerin karşılaştırılması yapılmıştır.

**Anahtar Kelimer:** Soğuklama süresi, soğuklanma ihtiyacı, klasik yöntem, Utah modeli, Dinamik Model

### GİRİŞ

Yüksek verim ve kalitede meyve yetiştiriciliği, yetiştiriciliği yapılan meyve tür veya çeşidinin ihtiyaç duyduğu iklim şartlarının, yetiştiricilik yapılan yerin iklim özelliklerine uygun olması sayesinde mümkün olabilmektedir. Bu nedenle, özellikle meyve yetiştiriciliği yapmak isteyen üreticilerin, doğal risklerin etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için alacağı önlemlerden birisi de yöreye uygun bitki tür ve çeşidini seçmektir. Bu faktör özellikle çok yıllık bitkilerde çok daha önem arz etmektedir (Acarsoy, 2013; Nadaroğlu ve ark. 2019)

Yaprağını döken meyve türlerinde çevre koşulları uygun olduğu halde çiçek ve sürgün tomurcuklarının uyanıp faaliyet göstermemesine dinlenme denilmektedir. Dinlenme; mevsimlere göre yaz dinlenmesi, kış dinlenmesi ve ilkbahar dinlenmesi olarak incelenmektedir (Soylu, 2012). Meyve türlerinde çiçek ve yaprak tomurcukları, kış aylarına girilen dönemde çevre koşulları uygun olsa dahi süremez veya açamaz, dinlenmede kalırlar. Bu dinlenmeye kış dinlenmesi (endodormansi) adı verilmektedir. Kış dinlenmesi, meyve ağaçlarının çok farklı iklim koşullarına uyum sağlamasında önemli etkenlerden biridir. Birçok çok yıllık ılıman iklim bitkileri, farklı iklim koşullarına sahip bölgelerde yetişmektedir. Bu nedenle, çok yıllık ılıman iklim bitkileri, kış boyunca olumsuz koşullarla mücadele edebilmek için dinlenme mekanizmasından yararlanmaktadır (Campoy ve ark. 2012; Atkinson ve ark. 2013; Çavdar ve Ertürk, 2017). Tomurcukların soğuklanma ihtiyacı karşılandığında, kış dinlenmesi sona ermekte ve bitki yeniden gelişmek için hazır hale gelmektedir (Aron ve Gat, 1991; Shirazi, 2003). Ancak; soğuklanma ihtiyacı karşılanmasına rağmen, olumsuz çevre koşulları nedeniyle tomurcuklar dinlenmede kalmaya devam etmektedir (Çavdar ve Ertürk, 2017).

Tomurcuklarda kış dinlenmesi kesildiği halde, hava sıcaklıklarının henüz uyanma ve sürme için yeterli düzeyde olmayışı nedeniyle tomurcukların aktif hale geçemedikleri döneme ilkbahar dinlenmesi (ekodormansi) adı verilmektedir. Ekodormansi boyunca büyüme ve gelişme, sıcaklıklar türe özgü belirli eşik sıcaklığın üzerine çıktıktan sonra, belirli bir sıcaklık toplamı gerçekleşene kadar gecikmektedir (Çavdar, 2016; Çavdar ve Ertürk, 2017).

Soğuklanma süresi bahçe bitkilerinde tür ve çeşitlere göre değişkenlik göstermektedir. Bir yörede soğuk mevsim, o yörede yetiştirilen meyve tür ve çeşidinin ihtiyacı kadar uzun olmazsa; yani bitkinin soğuk ihtiyacı tam olarak karşılanmazsa, ortaya bir takım problemler çıkar. Soğuklanma gereksiniminin karşılanmadığı ağaçlarda, çiçek tomurcuklarının henüz açılmadan döküldükleri ve bunun yanı sıra bazı türlerde de çiçek

organ taslaklarının tomurcuk içerisinde öldüğü belirlenmiştir (Chandler ve Brown, 1951, Kaşka, 1966; Saure, 1985). Soğuklanma gereksinimini yeterli olarak karşılayamayan sert çekirdekli meyvelerden kayısı, şeftali ve bazı eriklerde tomurcuk silkmesi veya tomurcuk dökümü meydana gelmektedir (Chandler ve ark., 1937).

Bitkilerde soğuklanma ihtiyacını belirlemek için birçok metot geliştirilmiştir. Soğuklama ihtiyacının belirlenmesinde en yaygın kullanılan soğuklama yöntem ve modelleri; Soğuklama Saatleri Modeli / Klasik Yöntem, Richardson Soğuk Birimi Yöntemi / Utah Soğuklama Modeli (Luedeling ve ark. 2009, Okie ve Blackburn 2011) ve Dinamik Model'dir (Luedeling ve ark. 2013).

Soğuklanma ihtiyacı ve soğuklama süresinin tespitinde yararlanılan modellemelerden Utah modelinin daha soğuk bölgelerde güvenilir olduğu, dinamik modelin ise ılıman ekolojilerde daha yararlı olduğu belirtilmektedir (Campoy ve ark., 2012). İliman iklim koşullarında yapılan çalışmalarda ise Utah ve Dinamik Model uygulamaları arasında önemli farklılıkların olduğu ifade edilmektedir (Erez, 2000).

Bu çalışmada Şanlıurfa iline ait (Merkez) 2005-2006, 2008-2009 ve 2015-2016 yıllarının Kasım-Mart ayları arasındaki saatlik sıcaklık kayıtları kullanılarak; *Klasik (Standart)*, *Soğuk Birimi*, *Aron Yöntemi* ve *Dinamik Model*'le soğuklama süresinin tespit edilmesi ve *Dinamik Model*'le diğer modellerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Karasal iklimin hüküm sürdüğü Şanlıurfa ilinde yazlar uzun ve çok sıcak, kışlar çok soğuk geçer. Yaz ile kış, gece ile gündüz arasında ısı farkı fazladır. Şanlıurfa ilinin yıllık ortalama sıcaklığı 18.0°C'dir. Yıllık yağış ortalaması 331 mm ile 477 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Şanlıurfa ilinin en sıcak ayları olan temmuz ve ağustosta sıcaklık bazı yıllar 45°C'nin üzerine çıkarken, yine bu aylarda hiç yağmur yağmamaktadır. Bazı yıllar sıcaklık -5°C'nin altına düşerken, yılın en soğuk ayı 5.4°C ortalama sıcaklıkla ocak ayıdır. Şanlıurfa iline genel olarak yağış ekim-mayıs ayları arasında düşerken, yılın en yağışlı ayı olan ocak ayında 80 mm'nin üzerinde yağış düşmektedir. Ortalama nisbi nem % 46.64 düzeyindedir. Nisbi nem şubat ayında en yüksek (% 70.3) orana çıkarken, haziran ayında ise en düşük (% 25.5) seviyeye inmektedir.

Çalışmanın yürütülebilmesi için 1 Kasım – 31 Mart tarihleri arasında, 2005-2006, 2008-2009 ve 2015-2016 yetiştiricilik sezonlarına ait hem Şanlıurfa Meteoroloji İl Müdürlüğü hem de iklimsel verileri toplama cihazından (hobo) elde edilen saatlik sıcaklıklar kullanılmıştır. Yıllara ve yetiştiricilik sezonlarına ait iklim verileri bir Excel dosyasına aktarılmış ve her bir modele göre Şanlıurfa ilinin soğuklama süresi hesaplanmıştır. Soğuklama sürelerini belirlemek amacıyla kullanılan yöntemler aşağıda kısaca açıklanmıştır:

### Soğuklama Saatleri Modeli / Klasik Yöntem

Soğuklama sürelerinin "standart metotla" hesaplanmasında, 1 Kasım-31 Mart tarihleri arasında +7.2 °C'nin (45°F) altında geçen saatlerin toplamı olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde soğuklama ihtiyacının hesaplanmasında 0-7 °C arasında geçirilen saat toplamı esas alınmaktadır. Eşik sıcaklık değerlerinin altında veya üstünde gerçekleşen saat toplamı, soğuklama ihtiyacının hesaplanmasında dikkate alınmamaktadır (Weinberger, 1950; Küden, 1989; Küden ve Kaşka, 1993; Yelmen, 2007; Luedeling ve ark., 2009). Klasik Yöntem; 7.2°C ve altı ile 0°C-7.2°C arası sıcaklıklar olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

### Richardson Soğuk Birimi Yöntemi / Utah Soğuklama Modeli

Bu yönteme göre, her bir saatlik sıcaklık "Richardson Modeli'ne" göre etkili soğuk birimine çevrilmiştir (Richardson ve ark., 1974). En etkili sıcaklıklar 2.5 - 9.1°C arasında olmakta ve bunlar "1" soğuk birimine karşılık gelmektedir (Tablo 1). Etki değerleri 1.4°C'nin altındaki sıcaklıklar için "0" ve 16 °C'nin üzerindeki sıcaklıklar için "-" kabul edilmiştir. "Richardson modeline" göre soğuk birimlerine çevrilen saatlik sıcaklıkların toplamı, "soğuk birimi" (chilld unit) cinsinden toplam soğuklama sürelerini vermektedir (Küden ve Kaşka, 1992)



**Tablo 1.** Sıcaklık derecelerinin “soğuk birimi” (CU) değerleri (Richardson ve ark., 1974).

Sıcaklık dereceleri (°C)	Soğuk birimi değerleri (CU)
<1.4	0
1.5 - 2.4	0.5
2.5 - 9.1	1
9.2 - 12.4	0.5
12.5 - 15.9	0
16.0 - 18.0	-0.5
>18.0	-1

### Aron yöntemi

Aron yönteminde günlük maksimum ve minimum sıcaklık değerleri kullanılmaktadır (Küden, 1989). Aron yöntemi, 0-7.2 °C arasındaki soğuklama sürelerinin (saatlerinin) birikimine dayanır. Bu yöntem, maksimum ve minimum sıcaklıklar ile soğuklama süresinin uzunluğunu dikkate almaktadır. Hesaplamalarda, günlük maksimum ve minimum sıcaklık ortalama değerleri Fahrenheit'e (°F) çevrilir.

Aron yöntemine göre soğuklama süreleri aşağıdaki denklemlere göre hesaplanmaktadır:

$$A=801 + 0.2523B + 7.57B^2 \times 10^{-4} - 6.51B^4 \times 10^{-10} - 11.44T_1 - 3.32T_2$$

$$B=(7.2^\circ\text{C} - T_1/T_2 - T_1) \times \text{HD}$$

A = 7.2°C'nin altında saat olarak geçen süre

T<sub>1</sub> = Ortalama minimum sıcaklık

T<sub>2</sub> = Ortalama maksimum sıcaklık

H = 24 saat

D = Gün olarak geçen süre (Genellikle 1 ay)(Küden ve Kaşka, 1992)

### Dinamik Model

Dinamik model, Fishman ve ark. (1987) tarafından İsrail'de geliştirilmiştir (Şekil 1). Bu modelde soğuklanma gereksiniminin tamamlanma derecesinin, iki aşamalı bir süreçte tomurcuklarda biriken belirli bir dinlenmeyi tamamlama faktörünün seviyesine bağlı olduğu varsayılır. İlk adımın termal olarak kararsız bir öncül üreten tersinir bir işlem olduğu varsayılmaktadır. Öncünün oluşumu soğutma sıcaklıkları (1.5-12.4 °C) ile teşvik edilirken, yüksek sıcaklıklar işlemi tersine çevirir. Öncünün kritik kısmı toplandıktan sonra, geri dönüşümsüz olarak, ikinci adımda, sabit bir soğuklanmayı tamamlama faktörünün veya soğuklama bölümünün (CP) bir kısmına dönüştürülür. Prekürsör seviyesi belirli bir eşiğe ulaştıktan sonra, dinlenme geri döndürülemez hale gelir ve kısa süreli sıcak sıcaklık yükselmelerinden etkilenmez. Bu karmaşık model, zamana maruz kalma ve sıcaklık ile ilgili mevcut modellere döngüsel bir şekilde daha fazla öge ekler. İsrail ve Kaliforniya gibi sıcak kış koşullarında, diğer modellere göre çok daha iyi performans göstermiştir (Southwick ve ark., 2003a; Luedeling ve ark. 2009, Luedeling ve ark. 2013). Yapılan çalışmalarda, Utah modelinin daha soğuk bölgelerde güvenilir olduğu, dinamik modelin ise ılıman ekolojilerde daha yararlı olduğu belirtilmektedir (Campoy et al., 2012; Dennis, 2003).

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Şanlıurfa ili Merkez ilçesinde Kasım 2005-Mart 2006 dönemi arasında hava sıcaklığı -5.0 °C ile +23.0 °C arasında değişirken, aynı dönemdeki ortalama hava sıcaklığı 8.5 °C olarak ölçülmüştür (Tablo 2). Belirtilen yetiştiricilik sezonunda Şanlıurfa ilinin soğuklama süresi; '0-7.2 °C Klasik yöntemine' göre 1293 saat, '≤ 7.2 °C Klasik yöntemine' göre 1469 saat, soğuk birimi metoduna göre 1864 soğuk birimi, Aron yöntemine göre 540.9 saat ve Dinamik Model'e göre ise 89 soğuk birimi olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1		e0	4,15E+03										
2		e1	1,29E+04		DYNAMIC MODEL CHILLING PORTIONS - EREZ, A. and FISHMAN, S.								
3		a0	1,40E+05		The Volcani Center, Bet Dagan, ISRAEL								
4		a1	2,57E+18										
5		slp	1,6		Add hourly data in column B from row 13 down. Do not erase rows 11, 12.								
6		tetmlt	277		copy data from row12 columns C to L till the last entry in column B.								
7		aa=a0/a1	5,43E-14		total cumulative chiling portions will appear in column L.								
8		ee=e1-e0	8,74E+03										
9													
10	date	Temp(C)	Temp(K)	ftmp	sr	xi	xs	ak1	Inter-S	Inter-E	delt	Portions	
11	04.12.1999 16:45	15	288.00	16.93	22471935.51	1.00	0.81	0.09	0.00	0.07	0.00	0	
12	04.12.1999 17:45	12	285.00	12.44	252887.94	1.00	1.11	0.06	0.07260431	0.13	0.00	0	
13													
14													
15													
16													
17													

Şekil 1. Dinamik Model'in Excel sayfasındaki görüntüsü

Tablo 2’de yer alan sıcaklık değerlerinden de görüleceği gibi Şanlıurfa ilinin Kasım 2008-Mart 2009 dönemi arasındaki hava sıcaklığı  $-7.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ile  $22.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  arasında gerçekleşirken, aynı dönemdeki ortalama hava sıcaklığı  $7.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Şanlıurfa ilinin Kasım 2008-Mart 2009 dönemi arasındaki hava sıcaklığının, Kasım 2005-Mart 2006 dönemine göre daha düşük olduğu görülmektedir (Tablo 2). Şanlıurfa ilinin Kasım 2008-Mart 2009 dönemindeki soğuklama süresi; ' $0-7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik yöntemine' göre 1600 saat, ' $\leq 7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik yöntemine' göre 1821 saat, soğuk birimi metoduna göre 1978 soğuk birimi, Aron yöntemine göre 682.6 saat ve Dinamik Model'e göre ise 92 soğuk birimi olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

Diğer yetiştiricilik dönemlerine göre, Şanlıurfa ilinin Kasım 2015-Mart 2016 dönemi hava sıcaklığı daha yüksek olarak gerçekleşmiştir (Tablo 2). Belirtilen bu dönemde Şanlıurfa iline ait hava sıcaklığı  $-6.2$  ile  $24.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  arasında ölçülürken, aynı dönemdeki ortalama hava sıcaklığı ise  $10.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  olmuştur. Şanlıurfa ilinin Kasım 2015-Mart 2016 dönemindeki soğuklama süresi; ' $0-7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik yöntemine' göre 838 saat, ' $\leq 7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik yöntemine' göre 995 saat, soğuk birimi metoduna göre 1313.5 soğuk birimi, Aron yöntemine göre 277 saat ve Dinamik Model'e göre ise 76 soğuk birimi olarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2’den görüleceği gibi Şanlıurfa ilinin soğuklama süresinin hesaplanmasında kullanılan Aron yöntemi ile yapılan hesaplamalarda, bazı yıllarda/aylarda soğuklama süresinin eksiye (-) düştüğü saptanmıştır.

Küden ve Kaşka (1992), Adana’da 1982-83 kışında  $7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında 879 saat gibi bir soğuklama süresi olmasına karşın, 1983-84 kışında sadece 182 saatlik bir soğuklama süresinin elde edildiğini belirtmiştir.

Küden ve ark. (1995), Adana ilinin soğuklama süresini 1989-90 kışında 510 soğuk birim ve  $7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında 412 saat, 1990-91 kışında 396 soğuk birim ve  $7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında 301 saat, 1991-92 kışında ise 578 soğuk birim ve  $7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında 438 saat olarak saptamışlardır.

Küden ve Tanrıver (1997), bazı önemli meyvecilik bölgelerimizde kritik kış sıcaklıklarının ve soğuklama sürelerinin saptanması amacıyla 1990-91, 1991-92, 1992-93, 1993-94 yıllarında Adana, Pozantı, Şanlıurfa, Bursa, Elazığ, Malatya, Niğde ve Tokat illerinin Soğuk Birimi (SB) ve Klasik yöntemine göre soğuklama değerlerini hesaplamışlardır.

Yapılan hesaplamalar sonucunda, 1991-92 yılında Adana’da  $7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altında geçen soğuklama süresi 257 SB ve 482 saat olarak belirlenmiştir.

Meteoroloji Genel Müdürlüğü web sayfasında yer alan "Bitki Soğuklama İsteği Hesaplama Programı (BİSİP)" ile yapılan hesaplamalarda, uzun yıllar ortalama değerlere göre 'Şanlıurfa' istasyonunda  $0-7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik Yöntemi' kullanılarak yapılan soğuklama süresi hesaplanmasında, Şanlıurfa-Merkez ilçenin soğuklama süresi 1359 saat olarak tespit edilmiştir (Nadaroğlu ve ark., 2019; Anonim, 2019).

Aynı sayfadaki hesaplama programında ' $0-7.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  Klasik yöntemi' kullanılarak yapılan soğuklama süresi hesaplanmasında, Şanlıurfa-Merkez ilçenin 2005-2006 yılı soğuklama süresi 1227 saat, 2008-2009 yılı soğuklama süresi 1368 saat ve 2015-2016 yılı soğuklama süresi ise 853 saat olarak hesaplanmıştır (Nadaroğlu ve ark., 2019; Anonim, 2019).

**Tablo 2.** Şanlıurfa ilinin sıcaklık değerleri ve dört değişik modelle hesaplanan soğuklama süreleri

Tarih	Sıcaklık			Klasik Yöntem		Soğuk Birimi	Aron Yöntemi	Dinamik Model
	Ort.	Maks.	Min.	(0 – 7.2 °C)	(≤ 7.2 °C)			
Kasım/2005	10.8	21.9	0.7	102	102	324.0	46.7	16
Aralık/2005	9.4	21.8	-2.7	168	205	304.5	82.8	15
Ocak/2006	3.9	13.6	-3.8	509	616	499.0	230.9	23
Şubat/2006	7.2	19.6	-5.0	349	381	478.5	143.9	20
Mart/2006	11.3	23.0	0.4	165	165	258.0	36.6	15
Toplam				<b>1293</b>	<b>1469</b>	<b>1864.0</b>	<b>540.9</b>	<b>89</b>
Kasım/2008	13.1	22.8	5.9	15	15	95.0	-15.4	9
Aralık/2008	5.8	17.4	-3.8	430	478	473.0	181.9	22
Ocak/2009	4.5	14.2	-5.2	451	555	494.0	217.0	22
Şubat/2009	6.6	16.1	-5.9	374	395	491.5	160.3	20
Mart/2009	7.5	21.5	-7.8	330	378	424.5	138.8	19
Toplam				<b>1600</b>	<b>1821</b>	<b>1978.0</b>	<b>682.6</b>	<b>92</b>
Kasım/2015	13.9	24.3	6.8	4	7	18.5	-34.9	8
Aralık/2015	8.6	20.0	0.5	290	298	513.0	106.6	23
Ocak/2016	4.7	20.0	-6.2	390	530	500.0	184.8	22
Şubat/2016	11.5	20.0	2.1	123	129	235.5	45.5	14
Mart/2016	13.6	24.5	2.7	31	31	46.5	-25.0	9
Toplam				<b>838</b>	<b>995</b>	<b>1313.5</b>	<b>277.0</b>	<b>76</b>

Bazı illerin BİSİP Programı yardımıyla 0-7.2°C Klasik yöntemi kullanılarak hesaplanmış soğuklama süreleri Tablo 3'te verilmiştir. Ülkemizde soğuklama süresi en düşük olan illerin başında Antalya (uzun yıllar ortalaması 165 saat) gelmektedir. Tablo 3'ten de görülebileceği gibi, 2005-2016 yılları arasında bazı illerin soğuklama süresi artış gösterirken, bazı illerin ise azalış gösterdiği görülmektedir. Uzun yıllar soğuklama süresi ortalaması da dahil olmak üzere, en kısa soğuklama süresi 2008-2009 döneminde 86 saat ile Antalya ilinde belirlenirken, en uzun soğuklama süresi ise yine aynı dönemde 2381 saat ile Van ilinde belirlenmiştir (Tablo 3)

Ülkemizin en soğuk illerinden birisi olan Erzurum ilinin soğuklama süresi 1591-1863 saat arasında değişkenlik göstermiştir (Tablo 3). Ülkemizin diğer birçok ilinde hesaplanan soğuklama süresinin büyük bir kısmı Aralık veya Ocak aylarında karşılanırken, Erzurum ilinde Aralık-Şubat ayları arasındaki hava sıcaklığının sıfırın altında olması, diğer illere göre daha yüksek olarak beklenen soğuklama süresini düşürmektedir. Bu durumla alakalı olarak Soylu (2003); uzun ve sürekli soğuk kışı olan iklimlere adapte olmuş türlerin soğuklama ihtiyacının az veya orta derecede olduğunu belirtmiştir. Çünkü böyle bölgelerde kışın büyük bir bölümünde sıcaklıklar sürekli olarak donma noktasının altında geçer. Bu nedenle de ağaçlar bu dönemin büyük bir bölümünde soğuklama ihtiyaçlarını karşılayamazlar. Ancak ilkbahar döneminde sıcaklıkların donma derecesinin üstüne çıkmasından sonra ihtiyaçlarını giderebilirler. Bunun sonucu olarak da kısa bir sürede soğuklama ihtiyaçlarını tamamlamak durumundadırlar.

**Tablo 3.** Bazı illerin\* Bitki Soğuklama İsteği Hesaplama Programı (BİSİP) ile “0-7.2°C Klasik Yöntemi” kullanılarak hesaplanmış soğuklama süreleri (saat) (Nadaroğlu ve ark., 2019)

İller	Soğuklama süresi (saat)			
	2005 - 2006	2008 - 2009	2015 - 2016	Uzun yıllar ortalaması
Adana	677	630	347	578
Amasya	2284	2040	1692	1979
Ankara	2002	2315	1685	2047
Antalya	95	86	117	165
Bursa	1798	1652	1112	1729
Diyarbakır	1807	1774	1409	1799
Erzincan	1627	2120	1739	1973
Erzurum	1591	1828	1723	1863
İğdır	1215	1589	1592	1619
Konya	1833	1969	1382	1896
Malatya	2064	2139	1692	2018
Niğde	1813	2188	1621	1952
Sakarya	1686	1385	978	1750
Samsun	1554	1361	823	1526
Şanlıurfa	1628	1368	853	1359
Trabzon	1407	1119	972	1494
Van	1806	2381	2025	2214

\*: <https://www.mgm.gov.tr/tarim/bisip.aspx> web sayfasında bulunan Bitki Soğuklama İsteği Hesaplama Programı (BİSİP)'nda (Anonim, 2019), soğuklama süresi aranan il seçildikten sonra, ilk sıradaki istasyona ait sıcaklık verilerine göre program tarafından hesaplanan soğuklama sürelerini göstermektedir. Bu nedenle, bazı illerin il merkezlerine ait soğuklama süreleri, Tablo 3'dekinden az veya fazla olabilir.

Pelotas (Brezilya)'ta 11 yıllık iklim verileri kullanılarak, ortalama soğuklama süresi 371 saat (CH) olarak belirlenirken, bu süre aralığında en sıcak kış mevsiminin yaşandığı 2008 yılında 146 saat ve en soğuk kış mevsiminin olduğu 2007 yılında ise 742 saat soğuklama süresi hesaplanmıştır (Milech ve ark., 2018).

Haziran (Kuzey Yarımkürede Aralık) ve Temmuz (Kuzey Yarımkürede Ocak) aylarında ortalama hava sıcaklığının sırasıyla 12.8 °C ve 12.0 °C olduğu Brezilya'nın güneyindeki Rio Grande do Sul eyaletinin Pelotas şehrinde (rakımı 7 m), 11 yıl boyunca Utah modeli kullanarak ortalama soğuklama birikimi 290 CU (soğuk birimi) olarak hesaplanmıştır (Milech ve ark., 2018). Araştırmacılar, test edilen tüm modeller arasında Utah modelinin incelenen yıllar boyunca en büyük (% 164.9) varyasyon katsayısına (CV) sahip olduğunu, 2007'de 1218 CU (soğuk birimi) olan soğuklama süresinin, 2014 yılında – (negatif) 283 CU (soğuk birimi) olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, elde edilen sonuçların yüksek değişkenliği nedeniyle, daha düzgün kış sıcaklıklarına sahip ve daha serin bir yöre için geliştirilen Utah modelinin, Pelotas şehrinin soğuklama süresini tahmin etmede önerilemeyeceğini belirtmişlerdir. Öte yandan, Campoy et al. (2012); Utah modeli kullanılarak, ılıman iklim koşullarında soğuklama süresinin doğru bir şekilde tahmin edilemediğini bildirmişlerdir.

Diğer taraftan, Milech ve ark. (2018); Linsley-Noakes ve ark. (1994) tarafından geliştirilen pozitif Utah modelinin (Tablo 4), orta soğuk birikimine sahip olan bölgelerde, soğuklama süresini tahmin etmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

**Tablo 4.** Pozitif Utah modeli (Linsley-Noakes ve Allan, 1994).

Sıcaklık dereceleri (°C)	Soğuk birimi (CU)
<1.4	0
1.5 - 2.4	0.5
2.5 - 9.1	1
9.2 - 12.4	0.5
>12.5	0

Rodriguez-Rajo ve Frenguelli (2003), Avrupa'da birbirinden farklı iklim özelliği gösteren iki şehirdeki huş ağacı polenlerinin havada dağılım sezonunun tahminini araştırmışlardır. Araştırmada seçilen şehirlerden Vigo'nun (İspanya) daha ılıman, Perugia'nın (İtalya) ise daha soğuk iklime sahip olduğu belirtilmiştir. Aron metoduna göre 7.2 °C eşik sıcaklık değeri kullanılarak, 1994-2001 yılları arasında hesaplanan soğuklama sürelerinin Perugia (İtalya) şehrinde 985-1140 saat ve Vigo (İspanya) şehrinde ise 642-817 saat arasında değişkenlik gösterdiği saptanmıştır.

Southwick ve ark. (2003a), Kaliforniya Sulama Yönetimi Bilgi Sistemi'nin hava istasyonuna yakın olan dört şehrin (San Benito, San Joaquin, Santa Clara ve Solano) Dinamik model, Klasik yöntem ve Utah modeline göre soğuklama sürelerini belirlemişlerdir (Tablo 5). San Benito şehrinin 22 Şubat 1995 tarihinde Dinamik Model, Klasik yöntem ve Utah modeline göre hesaplanmış soğuklama süreleri sırasıyla; 68 soğuk birimi (CP), 827 saat ve 1314.5 soğuk birimi iken, aynı şehrin 14 Şubat 1996 tarihli soğuklama süreleri ise % 40 düşüşle 45 soğuk birimi (CP), 430 saat ve 732.5 soğuk birimi olarak belirlenmiştir. Tablo 5 incelendiğinde, soğuklama sürelerinde yıllar arasında %30-40'lara varan dalgalanmaların diğer şehirlerde de olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.** Kaliforniya'da kiraz yetiştiriciliği yapılan önemli bazı şehirlerin 3 farklı modele göre hesaplanmış soğuklama süreleri (Southwick ve ark., 2003a)

Şehirler	Tarihler	Dinamik Model	Klasik Yöntem	Utah Modeli
San Benito	22 Şubat 1995	68	827	1314.5
San Benito	14 Şubat 1996	45	430	732.5
San Benito	21 Şubat 1997	58	695	1088.5
San Joaquin	18 Ocak 1996	43	442	775.0
San Joaquin	18 Şubat 1997	61	790	1133.0
San Joaquin	28 Ocak 1999	57	1055	1079.0
San Joaquin	8 Şubat 2001	69	1125	1342.5
Santa Clara	6 Şubat 1998	52	424	881.5
Solano	18 Şubat 2000	63	767	1126.0

Courtland'ın (Virginia, ABD) yakınında bulunan araştırma alanı ile California Sulama Yönetim Bilgi Sistemi (CIMIS) istasyonlarının yakınında bulunan Lodi West ve Twitchell Adası'nın 1 Kasım 2004-14 Şubat 2005 tarihleri arasındaki soğuklama süresi (CH) sırasıyla; 1219, 874 ve 980 saat, dinamik modelle hesaplanmış soğuklama süresi ise sırasıyla; 66, 63 ve 63 soğuk birimi (CP) olarak tespit edilmiştir (Glozer ve ark., 2005). İspanya'nın Murcia şehrinin 2003-2005 yıllarının 1 Kasım-28 Şubat tarihleri arasındaki ortalama soğuklama süresi; Utah modeline göre 1384.2 soğuk birimi (CH), dinamik modelle hesaplanmış soğuklama süresi 73.5 soğuk birimi ve 7.2 °C'nin altında 809.7 saat olarak tespit edilmiştir (Ruiz ve ark., 2007).

Southwick ve ark. (2003b), Stockton'daki (Kaliforniya) iki ayrı meteoroloji istasyonundan elde etmiş olduğu iklim verilerini kullanarak, her iki istasyonun değişik modellere göre hesaplanan soğuklama sürelerini karşılaştırmışlardır (Tablo 6). Kaliforniya'da gerçekleştirilen bu araştırmada, her iki istasyonun soğuklama süresi 55-57 soğuk birimi (CP), 707-714 saat (CH) ve Utah modeli soğuklama sürelerinin ise 1034.5-1099 soğuk birimi (CU) arasında olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 6.** Stockton'daki (Kaliforniya, ABD) iki ayrı meteoroloji istasyonundan (Lodi Station 0.1P ve Lodi West Station 166) elde edilen verilerin soğuklama birimi (CP), soğuklama süresi (CH), Utah modeli soğuk birimlerinin karşılaştırılması (Southwick ve ark., 2003b).

Tarihler	Lodi Station 0.1P			Lodi West Station 166		
	Dinamik Model	Klasik Yöntem	Utah Modeli	Dinamik Model	Klasik Yöntem	Utah Modeli
3 Ocak 2003	36	506	649	38	527	730
8 Ocak 2003	40	567	746	42	585	825
21 Ocak 2003	48	695	948.5	52	706	1022
30 Ocak 2003	55	707	1034.5	57	714	1099

## SONUÇ

Bir yörenin enlemi, deniz seviyesinden yüksekliği, kış yağışları, kuraklık durumu, hatta havanın açık veya kapalı olması (ışık), o yörenin soğuklama süresi üzerine etkili olan önemli faktörlerdendir. Yüksek sıcaklıklar, ışık veya güneş radyasyonu soğuklama süresini azaltırken, bulut, gölge, yağmur ve rüzgar ise soğuklama sıcaklıklarının etkinliğini artırmaktadır. Soğuklaması belirlenmek istenen bir şehrin veya yörenin hava sıcaklıklarının yıllara göre değişkenlikler göstermesi, o yörenin soğuklama süresinin de yıllara göre farklılıklar göstermesine neden olmaktadır. Soğuklama ihtiyacını yeterince karşılamayan meyve ağaçlarında tomurcuk patlamasının düzensiz olduğu, tozlanmanın uzun periyoda yayıldığı, düzensiz çiçeklenmenin meydana geldiği, yapraklanmanın geç ve yaprak sayısının az olmasına bağlı olarak verimsizlik problemlerinin olduğu, ağaçlarda güneş yanıklıklarının ve don zararlarının olduğu birçok araştırmacı tarafından dile getirilmiştir. Dünyanın değişik ülke ve kentlerinde, bitki türlerinin soğuklama ihtiyacını hesaplamak veya tahmin etmek için birbirinden değişik model ve yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilmiş ve halen de geliştirilmekte olan bu model ve yöntemlerin bazıları tropik veya subtropik iklim özelliği gösteren yörelerde soğuklama süresini veya ihtiyacını tahmin etmede daha doğru sonuçlar verirken, bazı model ve metotlar ise ılıman veya soğuk ılıman iklim kuşağındaki ülkelerde daha doğru sonuçlar vermektedir.

Yürütülmüş olan bu çalışmada, birbirinden farklı metot ve yöntemlerle Şanlıurfa ilinin 3 ayrı yetiştiricilik sezonundaki soğuklama süresi belirlenmiştir. Yıllara göre hava sıcaklıklarının oldukça değişkenlik göstermesine paralel olarak, soğuklama süresini tahmin etmeye çalıştığımız Şanlıurfa ilinin soğuklama süresininin de oldukça değişkenlik gösterdiği görülmüştür.

Bu çalışmada, sadece 3 ayrı döneme ait hava sıcaklıkları kullanılarak soğuklama süresinin belirlenmesi üzerine bazı hesaplamalar yapılmıştır. Şanlıurfa ili veya diğer illerin soğuklama süresi hakkında A, B, C metot veya modeline göre daha doğru bir tahminde bulunabilmek için, uzun yıllara ait iklim verileri üzerinde hesaplamalar yapmak ve buna paralel olarak da hangi metodun daha uygun olduğuna ise ancak yine uzun yıllara ait iklim verileri değerlendirilerek, her metot veya modelle elde edilen değerlerin, yine kendi içerisindeki % değişkenlik durumuna bakarak karar vermek uygun olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Acarsoy N 2013. Bazı kayısı çeşitlerinde kış dinlenmesinin tomurcuk gelişimi ve verimliliğe etkisi üzerine araştırmalar. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 185s.
- Anonim, 2019. Bitki Soğuklama İsteği Hesaplama Programı (BİSİP). Available at: <https://www.mgm.gov.tr/tarim/bisip.aspx> [Erişim 18.06.2019]
- Aron R, Gat Z 1991. Estimating chilling duration from daily temperature extremes and elevation in Israel. Clim. Res., 1: 125-132.
- Atkinson CJ, Brennan RM, Jones, HG 2013. Declining chilling and its impact on temperate perennial crops. Environ. Exp. Bot., 91: 48-62.
- Campoy JA, Ruiz D, Alderman L, Cook N, Egea J 2012. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). Europ. J. Agronomy, 37(1): 43-55.

- Chandler WH, Brown DS 1951. Deciduous orchards in California winters. Calif. Agr. Ext. Serv. Cir., USA, No.179.
- Chandler WH, Kimball MH, Phillip GL, Tufts WP, Weldon GP 1937. Chilling requirements for opening of buds on deciduous orchard trees and some other plants in California. Cal. Agr. Expt. Bulletin 611, 63p.
- Çavdar G 2016. Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşitlerinde dinlenmenin karşılanması için gerekli soğuklama ve sıcaklık toplamı ihtiyaçlarının belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Bursa, 56 s.
- Çavdar G, Ertürk Ü 2017. Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşitlerinde dinlenmenin karşılanması için gerekli soğuklama ve sıcaklık toplamı ihtiyaçlarının belirlenmesi. Bahçe, 46(Özel sayı 2): 57-64.
- Dennis FG 2003. Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. HortScience, 38: 347-350.
- Erez A 2000. Bud dormancy: phenomenon problems and solutions in the tropics and subtropics. In: Erez, A. (Ed.), Temperate fruit crops in warm climates, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 17-48pp.
- Fishman S, Erez A, Couvillon GA 1987. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. J. Theor. Biol., 124: 473-483.
- Glozer K, Ingels C, Southwick S 2005. Using the Dynamic Model for calculating chill accumulation in Bartlett pear: Management of dormant sprays. Available at: <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/425-42.pdf> [Erişim 19.06.2019]
- Kaşka N 1966. Meyve ağaçlarında kış dinlenmesinin uzatılıp kısaltılması ve ilkbaharda çiçeklerin açılmasının geciktirilmesi. A.Ü.Z.F. Yıllığı, 15(4): 269-283.
- Küden AB 1989. Subtropik iklim koşullarında şeftali ve nektarin tomurcuklarında dinlenme ve bunun kesilmesi üzerinde araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.
- Küden AB, Kaşka N 1992. Ilıman iklim meyveleri yetiştiriciliği açısından Adana ve Pozantı'daki soğuklama sürelerinin çeşitli yöntemlerle saptanması. Doğa Tr. J. of Agriculture and Forestry, 16: 50-62.
- Küden AB, Kaşka N 1993. Bazı şeftali ve nektarin çeşitlerinin soğuklama gereksinimlerinin saptanması. Çukurova Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi, 8(2): 143-152.
- Küden AB, Kaşka N, Paydaş S 1995. Determining the chill unit of adana and chilling requirements of apricots. Acta Hort., 384: 309-313.
- Küden AB, Tanrıver E 1997. Bazı önemli meyvecilik bölgelerimizde kritik kış sıcaklıklarının ve soğuklama sürelerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12(3): 49-58.
- Linsley-Noakes GC, Allan P 1994. Comparison of two models for the prediction of rest completion in peaches. Sci. Hort., 59: 107-113.
- Luedeling E, Kunz A, Blanke MM 2013. Identification of chilling and heat requirements of cherry trees - a statistical approach. Int. J. Biometeorol, 57(5): 679-689.
- Luedeling E, Zhang M, McGranahan LC 2009. Validation of winter chill models using historic records of walnut phenology, Agricult. Forest Meteorol., 149(1): 1854-1864.
- Milech CG, Scariotto S, Dini M, Herter FG, Raseira MCB 2018. Models to estimate chilling accumulation under subtropical climatic conditions in Brazil. Revista Brasileira de Climatologia, 23(14): 106-115.
- Nadaroğlu Y, Erciyas H, Yücel G, Şimşek O, Çalık Y 2019. Bitki soğuklama isteği hesaplama programı (BİSİP). Available at: <https://www.mgm.gov.tr/FILES/genel/makale/bisip.pdf> [Erişim 18.06.2019]
- Okie WR, Blackburn B 2011. Increasing chilling reduces heat requirement for floral budbreak in peach. HortScience, 46(2): 245-252.
- Richardson EA, Seeley SD, Walker DR 1974. A model for estimating the completion of rest for "Redhaven" and "Elberta" peach trees. Hortscience, 9(4): 331-332.
- Rodriguez-Rajo FJ, Frenguelli G, Jato MV 2003. Effect of air temperature on forecasting the start of the Betula pollen season at two contrasting sites in the south of Europe (1995-2001). Int J Biometeorol, 47: 117-125.
- Ruiz D, Campoy JA, Egea J 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. Environmental and Experimental Botany, 61: 254-263.
- Saure M 1985. Dormancy release in deciduous fruit trees. Hort.Rev., 7: 239-300.
- Shirazi AM 2003. Standardizing methods for evaluating the chilling requirements to break dormancy in seeds and buds (including geophytes): Introduction to the workshop. Hortscience, 38(3): 334-335.
- Southwick S, Khan Z, Glozer K 2003a. Evaluation of chill models from historical rest-breaking spray experiments on Bing Sweet Cherry. Available at: <http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/files/67017.pdf> [Erişim 19.06.2019]

- Southwick S, Khan Z, Glozer K, Hansen R, Gotelli P 2003b. Calculating chill hours based upon the Dynamic Model for use in determining when to apply rest-breaking agents in California sweet cherry production. Available at: <http://ucce.ucdavis.edu/files/datastore/425-9.pdf> [Erişim 19.06.2019]
- Soylu A 2003. Meyve yetiştirme ilkeleri. V. Baskı. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Ders Notları, Bursa, 191s.
- Soylu A 2012. Meyve yetiştiriciliğinin temel ilkeleri. Hasad Yayıncılık, İstanbul, Türkiye, 200s.
- Weinberger JH 1950. Chilling requirements of peach varieties. Proc Am Soc Hortic Sci., 56: 122-128.
- Yelmen H 2007. Doğu Akdeniz Bölgesinde farklı soğuklama yöntemleri kullanılarak olasılıklı soğuklama süre haritalarının çıkarılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Yapılar ve Sulama Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 119s.

DRAFT



## Sugar Acid Containing Scaffolds: Effects on Bone Tissue Regeneration

Arslan Kağan Arslan

Yenimahalle Training and Research Hospital Department of Orthopedics and Traumatology, Ankara,  
Turkey.

arslankagan@gmail.com

### Abstract

The main role of the bone is to create a mechanical framework to help metabolic functions, to maintain calcium-phosphate levels and to promote the formation of new blood cells. Bone is a complex tissue containing collagen and inorganic calcium phosphate compounds. Many studies have been carried out to produce applicable materials with osteoconductive and osteointegrative properties to provide structural support in bone tissue engineering. In the presented study gelatin scaffolds containing succinic acid, malic acid and glutamic acid were formed and tested effects on bone tissue regeneration. For this purpose gelatin scaffolds containing malic acid, glutamic acid or succinic acid (10%, v/v gelatin) were formed by solvent freeze drying method. Saos-2 cells were cultured on the scaffolds. Cytotoxicity of the scaffolds were determined. Also alkaline activity and calcium deposition were performed. According to the results, more osteoblastic activity was seen in bare gelatin scaffold and gelatin scaffold containing malic acid groups.

**Keywords:** Bone tissue engineering, gelatin sponge, sugar acids.

### INTRODUCTION

The main role of the bone is to create a mechanical framework to help metabolic functions, to maintain calcium-phosphate levels and to promote the formation of new blood cells. Bone is a complex tissue containing collagen and inorganic calcium phosphate compounds. Many studies have been carried out to produce applicable materials with osteoconductive and osteointegrative properties to provide structural support in bone tissue engineering. The chemical and physical properties of tissue scaffolds are three-dimensional structures designed to support cell adhesion, proliferation and differentiation. Bone tissue scaffolds can be designed as bioactive ceramic - polymers as composite scaffolds. Composite scaffolds made of biodegradable natural polymers must be biocompatible and have appropriate mechanical properties. Hydroxyapatite (HAp) is one of the most commonly used calcium phosphate compounds in bone tissue engineering. HAp is biocompatible and has osteoconductive properties (1). Because of this feature, HAp was used in this study. For a load-bearing bone defect, when designing a scaffold, the compressive strength of the tissue scaffold is one of the key parameters. However, the compressive strength of HAp-containing scaffolds is still insufficient (2). Gelatin is non-toxic, it meets most of the requirements of the organic phase of natural bone. Other advantages of gelatin are that they are relatively inexpensive, water-soluble and suitable for shaping (3).

Succinate has multiple functions in cell metabolism. Succinate acts as an intracellular messenger. The enzyme responsible for succinate conversion to fumarate is succinate dehydrogenase (SDH). Mutations in the gene encoding SDH are involved in many cancers and SDH is considered a tumor suppressor (4). The accumulation of succinate in cancerous cells stabilizes hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a). In activated macrophages, the succinate accumulation stabilizes HIF-1a. The release of IL1beta from proinflammatory cytokines requires the presence of HIF-1a. HIF-1a enhances the differentiation of T lymphocytes from proinflammatory cells to Th17 (5). This suggests that succinate indirectly stimulates inflammation (6).

Malic acid is a dicarboxylic acid. Malic acid is an intermediate in the citric acid cycle. It is synthesized from fumaric acid and oxidized to oxaloacetic acid by malate dehydrogenase. Cytosol is metabolized to pyruvic acid. Aerobic respiration is an important metabolite in energy production. In addition, they participate in various metabolic activities such as aspartate biosynthesis, malate-aspartate shuttle, gluconeogenesis and lipogenesis (7). Maleic dehydrogenases (MDH) are involved in different metabolic pathways. MDH is also involved in the tricarboxylic acid cycle, amino acid synthesis, gluconeogenesis. It plays a role in many metabolic pathways, including the metabolite change between the cytoplasm and subcellular organelles (8).

In the presented study gelatin scaffolds containing succinic acid or malic acid were formed and in-vitro tested effects on bone tissue regeneration.

## **MATERIAL-METHODS**

### **Fabrication of scaffolds, morphologic and mechanic examination**

10 % (v/w) gelatin was dissolved distilled water containing 0.5 % (v/v) acetic acid. 10 % (v/v, gelatin) succinic acid, malic acid or glutamic acid was added to the alginate solution. After homogenization, 80 % (v/w) HAp was added to the polymer solutions. The solutions were homogenized. 5 % (v/w) sodium carbonate and 0.1 % glutaraldehyde were added to the solution and the solutions were homogenized by vortex for five min. The solutions were casted into a Teflon molds. The molds were stayed at -80°C for overnight and lyophilized at -80°C for overnight. Until the examination, scaffolds

Three-dimensional structures of tissue scaffolds were characterized by micro CT (SkyScan1272) analysis. Compression test was performed to determine mechanical properties of the scaffolds.

### **Cell seeding on the scaffolds.**

The scaffolds were placed in 48 well plates. For sterilization, 70% (v/v) ethanol was pipetted into the wells, the plates were placed under UV light. After one hour, scaffolds were washed with PBS with several times. Saos-2 cells were cultured in DMEM F-12 medium, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Sigma, USA). The cells were collected by centrifugation at 1200 rpm for 5 minutes, resuspended in FBS and seeded on each scaffold at a concentration of  $2 \times 10^4$  at 50  $\mu$ l volume. The plates were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 3 h, 1ml medium was pipetted into the wells and plates were re-incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### **Proliferation of the Saos-2 cells on the scaffolds**

Saos-2 cell concentration was determined by MTT test. 1, 3, 7, 14, 21 and 28 day after cell seeding, medium was discarded. Fresh medium containing MTT solution (5mg/ml) was pipetted to the wells. The plated were incubated in incubator. After 4 h medium was discarded and propanol containing 0.08M HCl was pipetted to the wells and absorbance of dissolved formazan was read at 570nm.

### **Alizarin Red S Staining.**

For evolution calcium deposition of Saos-2 cells, Alizarin Red S staining was carried out. On days 14 and 28 the cell supernatant was discarded and cells were washed several times with PBS. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, then scaffolds were washed with PBS. The scaffolds were incubated with Alizarin Red S (40 mM in deionized water) for 15 minutes. The scaffolds were washed several times with deionized water. 10% cethyl pridium was pipetted to the wells. Absorbances of dissolved Alizarin Red S was read at 570nm.

### **Alkaline Phosphatase Activity (ALP).**

The ALP activities of the cells cultured onto the scaffolds were determined in cell supernatants by using the Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) (Abcam, UK). According to the kit protocol, p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as a phosphatase substrate which turns yellow ( $\lambda_{max} = 405$  nm) when dephosphorylated by ALP enzyme. The Saos cell supernatants were collected after 21 and 28 days of culture. 50  $\mu$ l/well of the supernatants were pipetted into the 96 well plate. 50  $\mu$ l of pNPP 5 mM/well was pipetted into the wells and the plate was incubated in dark. After 1 hour, 20  $\mu$ l of stop solution was pipetted into the wells. The absorbance was measured at 405 nm. The ALP activity (U/l/min) was normalized with each group protein content. The protein concentrations ( $\mu$ g of proteins/sample) were measured by the BCA assay.

### **Statistical studies.**

Cell culture studies were studied in six replicates. After variance analysis, the difference between groups was determined by t test. P value was accepted as <0.05.

## **RESULTS and DISCUSSION**

### **Fabrication of scaffolds and morphological examination**

The morphology of the scaffolds were determined by micro CT examinations. In figure 1 micro CT, horizontal cross section and macroscopic photos of the scaffolds were presented. According to the results, closed porosity percent of gelatin scaffold was found 0.019 %, open porosity percent was found as 81.57 %, total porosity percent was found as 81.58 %. Closed porosity percent of gelatin-glutamic acid was found as 0.0000064 %, open porosity percent was found as 89.39 % and total porosity percent was 89.39 %. Closed porosity percent

of gelatin-malic acid was found as 0.0156 %, open porosity percent was 79.07 %, total porosity percent was found as 79.08 %. Closed porosity percent of gelatin-succinic acid was found as 0.025 %, open porosity percent was found as 76.99 %, total porosity percent was found as 76.99 % (9).

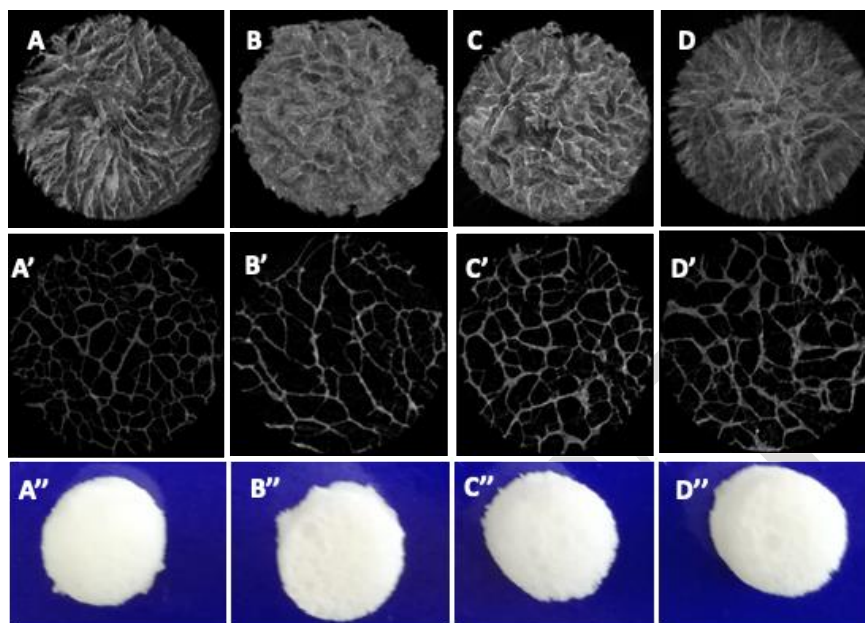


Figure 1. micro CT, horizontal cross section and macroscopic photos of the gelatin (A,A', A''), gelatin-glutamic acid (B,B', B''), gelatin-malic acid (C, C', C'') and gelatin succinic acid (D,D', D'') scaffolds.

Mechanical properties of the scaffolds were determined by compression test (Universal mechanical test machine, Instron). The results were presented at Figure 2. According to the compression test, gelatin sponge with 10% concentration was harder than other scaffolds. By adding sugar acids scaffolds became soft and flexible (10).

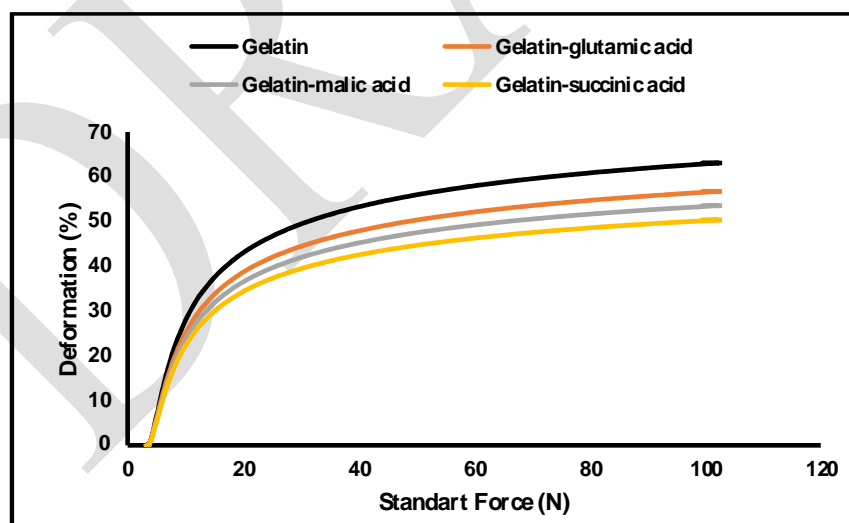


Figure 2. Compression test of the scaffolds.

### Proliferation of the Saos-2 cells on the scaffolds

Proliferation of the Saos-2 cells on the scaffolds was determined by MTT test. MTT results were presented at Figure 3. In the first day study, no significant difference was observed between cell concentrations cultured on the scaffolds ( $P > 0.05$ ). Saos-2 proliferation on the gelatin and gelatin-malic acid scaffolds was statistically significant increased than other scaffolds ( $P < 0.05$ ). there was no differences between gelatin-glutamic acid and gelatin-succinic acid scaffolds ( $P > 0.05$ ) (11).

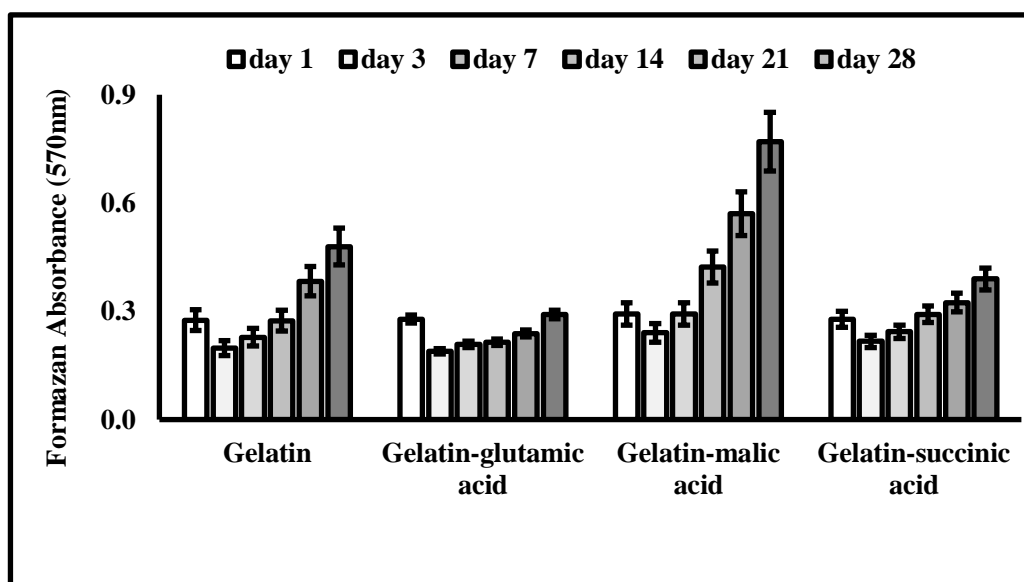


Figure 3. Formazan absorbances of the cells cultured on the gelatin- gelatin-glutamic acid, gelatin-malic acid and gelatin-succinic acid scaffolds for 28 day.

### Alizarin Red S Staining

Saos-2 cells were cultured on the gelatin, gelatin-glutamic acid, gelatin-malic acid and gelatin-succinic acid scaffolds. 14 and 28 days after cell seeding, Alizarin red assay was performed to determine calcium deposition on the scaffolds. Alizarin red assay results was presented at Figure 4. According to the results on the 14th and 28th day, calcium deposition was observed in all of the scaffolds. In all groups, on the 14th and 28th day, a significant difference was observed between them ( $P < 0.05$ ). Calcium accumulation was significantly higher in the gelatin group than the other groups ( $P < 0.05$ ).

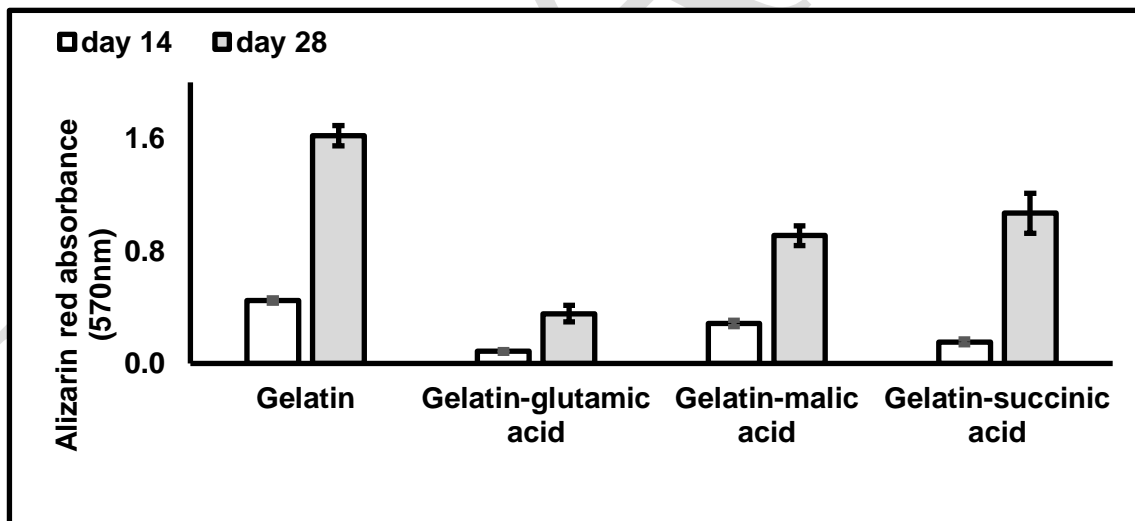


Figure 4. Alizarin red assay results of the scaffolds.

### Alkaline Phosphatase Activity (ALP)

Saos-2 cells were cultured on the gelatin, gelatin-glutamic acid, gelatin-malic acid and gelatin-succinic acid scaffolds. 14, 21 and 28 days after cell seeding, ALP activity of the cells were determined. Results were presented at Figure 5. According to the results of 14th day studies, ALP activity of gelatin-malic acid and gelatin-succinic acid groups were found higher than other groups ( $P < 0.05$ ). In the 21st day study, it was found that the gelatin group showed higher ALP activity than the other groups ( $P < 0.05$ ). In the 28th day study, gelatin and gelatin-malic acid groups were found to show higher alpine activity than the other groups ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference between gelatin and malic acid groups ( $P > 0.05$ ).

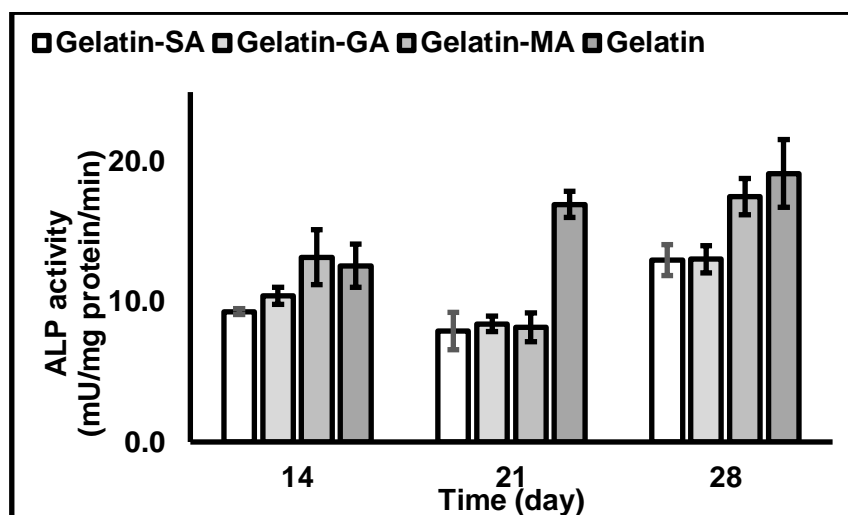


Figure 5. ALP activity of the Saos-2 cells cultured on the scaffolds.

## CONCLUSION

In this study, gelatin, gelatin-malic acid, gelatin-glutamic acid and s gelatin-uccinic acid scaffolds were prepared. To increase osteointegration, 80% hydroxyapatite was added to tissue scaffolds. As a result of micro CT studies, the open pores of the scaffolds were found to be approximately 80%. As a result of cell culture studies, gelatin and gelatin-malic acid groups were found to increase bone development.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was not supported by any institution.

## REFERENCES

- Maji K, Dasgupta S. Hydroxyapatite-chitosan and gelatin based scaffold for bone tissue engineering. *Trans Indian Ceram Soc.* 2014;73(2):110–4.
- Kim B-S, Yang S-S, Park H, Lee S-H, Cho Y-S, Lee J. Improvement of mechanical strength and osteogenic potential of calcium sulfate-based hydroxyapatite 3-dimensional printed scaffolds by  $\epsilon$ -polycarbonate coating. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2017;28(13):1256–70.
- Stevanovic S, Chavanne P, Braissant O, Pielas U, Gruner P, Schumacher R. Improvement of mechanical properties of 3d printed hydroxyapatite scaffolds by polymeric infiltration. *Bioceram Dev Appl S.* 2013;1(2).
- Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(1):18–26.
- Dang E V, Barbi J, Yang H-Y, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, et al. Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 2011;146(5):772–84.
- Weinert BT, Schölz C, Wagner SA, Iesmantavicius V, Su D, Daniel JA, et al. Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* 2013;4(4):842–51.
- Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, Antalík M. Malate dehydrogenases-structure and function. *Gen Physiol Biophys.* 2002;21(3):257–66.
- Lukas H, Reimann J, Kim O Bin, Grimpo J, Uden G. Regulation of aerobic and anaerobic d-malate metabolism of *Escherichia coli* by the LysR-type regulator DmlR (YeaT). *J Bacteriol.* 2010;192(10):2503–11.
- Su W, Ma X, Sun Z, Yi Z, Cui X, Chen G, et al. RhBMP-2 and concomitant rapid material degradation synergistically promote bone repair and regeneration with collagen–hydroxyapatite nanocomposites. *J Mater Chem B.* 2018;6(26):4338–50.
- Rafienia M, Imani R, Hojjati Emami S, Rabbani M, Kabiri M. Synthesis and Characterization of Biodegradable Hemostat Gelatin Sponge for Surgery Application. *Iran J Pharm Sci.* 2008;4(3):193–200.
- Gupta SK, Potdar PD, Dinda AK, Mishra NC. Surface modified goat-lung decellularized scaffold for bio-artificial skin tissue engineering applications. *J Biomater Tissue Eng.* 2013;3(6):643–52.

## The prolactin receptor, which is very important for reproductive performance in cattle, is regulated by microRNA-196a

Selçuk Özdemir

Atatürk University, Veterinary Faculty, Department of Genetics, Erzurum, Turkey.

Corresponding author e-mail: selcuk.ozdemir@atauni.edu.tr.

### Abstract

Ovarian development and health are very important in terms of productivity in dairy cows. However, ovarian development has a highly complex molecular structure. In addition, millions of genes can play a role in the development of ovaries. One of these genes is the prolactin receptor gene. MicroRNAs are known to be involved in many biological mechanisms and regulate gene expression post-transcriptionally. The aim of this study was to determine the interaction between miR-196a and prolactin receptor gene. For this purpose, the cow-specific prolactin receptor gene was cloned. Later on, this cloned gene (prolactin receptor gene) and microRNA-196a were transfected to cells. Lastly, the expression levels of cloned gene and microRNA-196a were determined with qRT-PCR. In the results, it was determined that the expression of prolactin receptor gene was significantly decreased in cells with overexpression of microRNA-196a ( $p < 0.05$ ). In contrast, prolactin gene expression in cells transfected with the microRNA-196a inhibitor was found to be quite high ( $p < 0.01$ ). These results indicate that microRNA-196a regulates gene expression of the prolactin receptor at the molecular level. As a result, since prolactin receptor affects reproductive performance in sheep cows and goats, it is thought that microRNA-196a may play a key role in revealing the molecular mechanisms associated with this receptor.

**Keywords:** Cow, reproductive system, prolactin receptor, microRNA-196a.

### INTRODUCTION

Prolactin (PRL) play important role in the growth and differentiation of the mammary epithelial cells which is necessary for lactation (Chen et al., 1999; Clevenger et al., 2003). Prolactin is activated by the prolactin receptor which is class I cytokine receptor family. These cytokine receptors play an active role in many biological mechanisms, including lactation, growth, myelopoiesis, erythropoiesis, and metabolism. Growth hormone receptor (GHR), the prolactin receptor (PRLR), the erythropoietin receptor (EPOR), and the thrombopoietin receptor are known important cytokine receptors (Liongue and Ward, 2007). In addition to the role of PRLR in mammary gland development and lactation, PRLR is closely associated with breast cancer and prostate cancer Bogorad et al., 2008).

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that serve as important regulators of gene expression (Jiang and Zhang, 2013). miRNAs regulate gene expression in two ways; 1- binding the 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of messenger RNAs (mRNAs), lastly resulting in the blocking of protein translation or 2- mRNA degradation (Bartels and Tsongalis, 2009; Fabian et al., 2010). Previous studies have shown that there is an intraction between miRNAs and PRLR in humans, however has not been clearly studied in cows (He et al., 2019; Yang et al., 2019; Pei et al., 2019). The aim of this study was to determine whether miR-196a regulates the PRLR gene in cows.

### MATERIALS AND METHODS

#### Cell Culture

The bovine mammary alveolar cells-T (MAC-T) were cultured in Dulbecco's modified Eagle media (containing 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin solution) and placed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 38.5°C. DMEM/F12 medium (Gibco, Cat. no: 11320033); trypsin (Gibco, Cat. no: 15050065); fetal bovine serum (heat inactivated) (Gibco, Cat. no: 10082139); penicillin/streptomycin solution (Gibco, Cat. no: 15140122) (Özdemir and Çomaklı, 2018).

#### Transfection

miRNA-196a mimics/miRNA-296a negative control (NC) and miRNA-196a inhibitor/miRNA-196a negative control (NC) were designed and synthesized by ThermoFisher (USA). MAC-T cells were grown in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin, which were seeded in 6-well plates ( $3.0 \times 10^5$  cells per well) the day before transfection. After 24 h, miR-196a mimics and mimics control as well

as miR-196a inhibitor and inhibitor control, GFP plasmid for transfection efficiency were transfected into MAC-T cells in triplicate using the TurboFect transfection reagent (ThermoFisher), following the manufacturer's protocol (Özdemir and Çomaklı, 2018).

#### Total RNA Isolation

Total RNA isolation was performed from MAC-T cells after 48 h of transfection using TRIzol™ (Invitrogen, USA), according to the procedure. The RNA concentration was determined using NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, USA), and normalized to a common concentration with DEPC treated water (Invitrogen, USA) before proceeding to cDNA synthesis. The concentration of RNA samples was between 1880 ng/μL – 2150 ng/ μL. RNAs were run on agarose gel containing 1XTBE solution at 80V, to control the total RNA quality and it was determined by displaying on gel imaging system (Özdemir and Çomaklı, 2018).

#### DNase I Procedure and cDNA synthesis

DNase I (Thermo Scientific, USA) was used to prevent DNA contamination in isolated RNA samples. DNase I procedure was done according to the protocol. Next, 1 μg of RNA was taken, and cDNA was synthesized using miScript Reverse Transcription Kiti (Qiagen, Germany). The purity and quantity of cDNA were determined with NanoDrop (Epoch Microplate Spectrophotometer, USA) and cDNAs were diluted at the same ratios. cDNA samples were kept at -20°C for using in Real Time PCR procedures (Özdemir and Çomaklı, 2018).

#### Real time PCR

The transcription level of PRLR genes, and the expression level of miRNA-196a was measured by qRT-PCR using CFX96 BioRad device. All samples were run in triplicate. GAPDH gene was used as internal control. Real-Time PCR was performed in a volume of 25 μL containing 2.0 μl cDNA, 12.5 μl SYBRGreen Mix (Thermo, Shanghai, China), 1 μl of each primer, and 8.5 μl ddH<sub>2</sub>O. The CT/CQ values were obtained from each reaction, and the relative expression level of each miRNA was determined with the  $2^{-(CT_{miRNA}-CT_{5SsrRNA})}$  method. 5S snRNA was used as internal control (Özdemir and Çomaklı, 2018). The primers for miRNA-196a and PRLR genes used for qRT-PCR are shown in Table 1.

Table 1: Summary of primers sequences for the RT-PCR

Name	Sequence (5' → 3')	References
miR-196a	TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG	-
PRLR	F: AGTCAGAAGGCTGCAGTTCC R: GGCGCCAAACTTCTCGTTTT	-
GAPDH	F: GATGCTGGTGTGAGTATGT R: GCAGAAGGTGCAGAGATGAT	(Özdemir and Çomaklı, 2018)

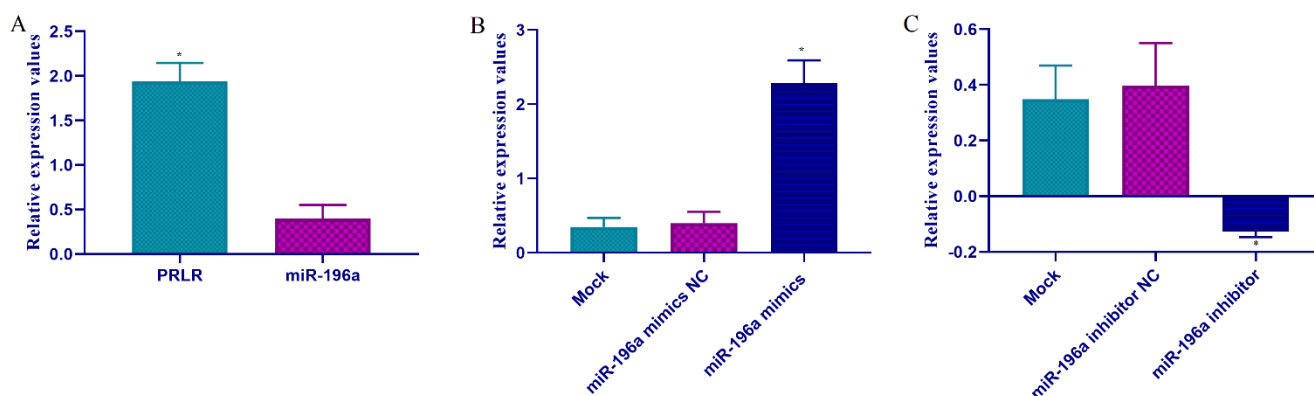
#### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed by using IBM SPSS software version 20.0. The statistical differences of transcriptional levels of ER-alpha and PR genes, the expression level of bta-miR-222, estradiol and progesterone concentrations, and ER alpha protein levels were detected by using one-way analysis of variance (ANOVA). The graphics of relative mRNA expression, and estradiol and progesterone concentrations were generated by using Graph pad prism software Inc., (Version 7.0, California, USA). The results of qRT-PCR were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). A p values between p<0.01, p<0.001 and p<0.05 was accepted as statistically significant.

#### Results and Discussion

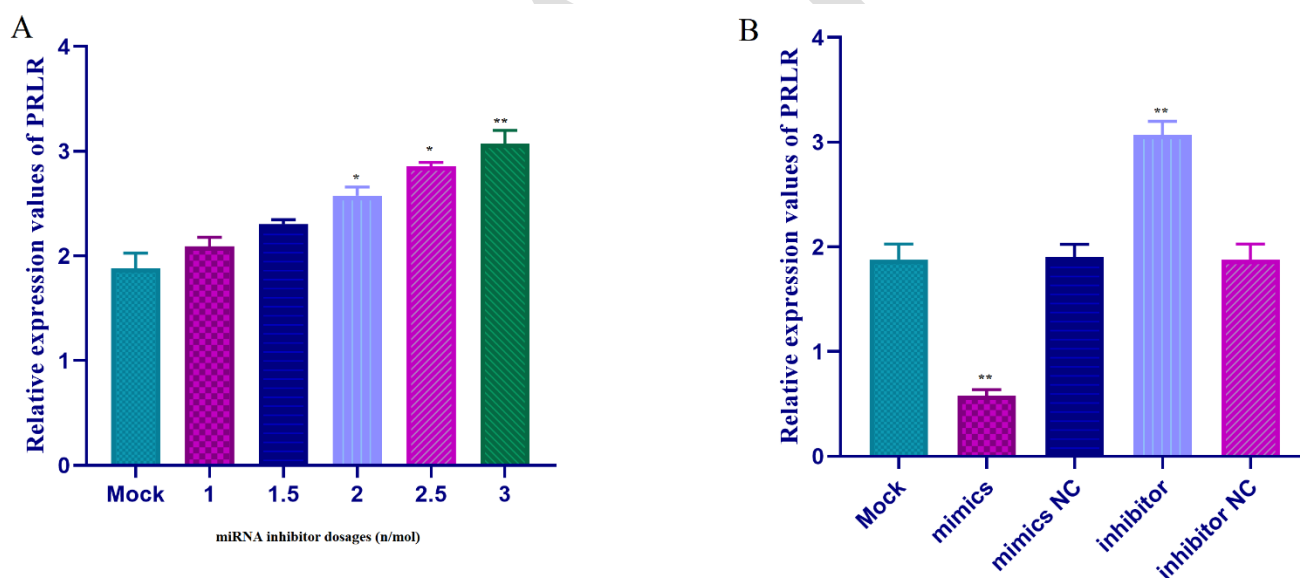
The expression levels of PRLR were determined by using qRT-PCR. PRLR mRNA transcription levels were up-regulated in the MAC-T cells. However, the expression level of miR-196a was down-regulated in MAC-T cells (Fig. 1A). The miR-196a expression level was significantly up-regulated in the miR-196a mimics group compared to the mock control (un-transfected cells) and the miR-196a mimics negative control (NC) group (p<0.01) (Fig. 1B). The miR-196a expression level was significantly down-regulated in the miR-196a inhibitor group compared to the mock control (un-transfected cells) and the miR-196a inhibitor NC group (p<0.01) (Fig.

1C). PRLR expression levels were up-regulated depend on miR-196a inhibitor transfection dosages (nmol) in MAC-T cells ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ ) (Fig. 2A).



**Figure 1:** The relative expression of miR-196a and PRLR in MAC-T cells with miR-196a mimics/inhibitor transfection. A) The relative expression level of PRLR and miR-196a. B) miR-196a was upregulated in MAC-T cells with miR-196a mimics transfection ( $p < 0.05$ ). C) miR-196a was down-regulated in MAC-T cells with miR-196a inhibitor transfection ( $p < 0.05$ ). Mock: Untransfected control

When miR-196a was overexpressed, the relative expression of the PRLR gene in MAC-T cells was significantly lower than the mock control (un-transfected cells) and mimic NC the control ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2B). On the contrary, when miR-196a was inhibited, the PRLR gene had significantly higher relative expression levels than the mock control (un-transfected cells) and inhibitor NC in MAC-T cells ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2B).



**Figure 2:** A) Relative expression of PRLR gene depend on dosages of miR-196a inhibitor (nmol). B) The relative expression of miR-196a and PRLR in MAC-T cells with miR-196a mimics/inhibitor transfection. miR-196a was overexpressed and inhibited in MAC-T cells respectively. The relative expression of PRLR gene was analyzed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. (\*\* $P < 0.01$ ). Mock: Untransfected control.

Prolactin is a pituitary hormone produced and released from many tissues, but in particularly from the pituitary gland (Marano and Jonathan, 2014). Prolactin play role in promotion of gland development during pregnancy, the synthesis of milk, and milk secretion in mammary gland (Freeman et al., 2000). Moreover, prolactin modulates immune regulation, and adipocyte differentiation (Tomio et al., 2008; Takizawa et al., 2005; Orbach and Shoenfeld, 2007). In addition, previous studies have reported that prolactin initiatetumorigenesis in various types of cancers, including breast (Barcus et al., 2016), prostate (Chen and Walker, 2016), ovary (Tan et al., 2011), liver, and brain (Kong et al., 2016). In this study, the relationship between miR-196a and PRLR mRNA was investigated in MAC-T cells. The results showed that the target of miR-196a was PRLR. In addition, the results revealed that miR-196a regulated the mRNA of PRLR.



## CONCLUSION

The data of current study show that miR-196a and PRLR were expressed in different ways during mammary development in cows. The correlation between the expression of miR-196a and the estimated PRLR target, miR-196a is considered a significant regulatory factor for both gene expression during mammary development in cows.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Atatürk University (Project Code: TCD-2017-6381, Project ID: 6381).

## REFERENCES

- Barcus CE, Keely PJ, Eliceiri KW, Schuler LA 2016. Prolactin signaling through focal adhesion complexes is amplified by stiff extracellular matrices in breast cancer cells. *Oncotarget*, 7:48093–106.
- Bartels CL, Tsongalis GJ 2009. MicroRNAs: novel bio- markers for human cancer. *Clin Chem*, 55, 623–631.
- Bogorad RL, Courtillot C, Mestayer C, Bernichtein S, Harutyunyan L, Jomain JB, Bachelot A, Kuttenn F, Kelly PA, Goffin V 2008. Identification of a Gain-of Function Mutation of the Prolactin Receptor in Women with Benign Breast Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 105, 14533–14538.
- Chen KH, Walker AM 2016. Prolactin inhibits a major tumorsuppressive function of wild type BRCA1. *Cancer Lett*, 375:293–302.
- Chen WY, Ramamoorthy P, Chen NY, Sticca R, Wagner TE 1999. A Human Prolactin Antagonist, HPRL-G129R, Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation through Induction of Apoptosis. *Clin. Cancer Res*, 5, 3583–3593.
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA 2003. The Role of Prolactin in Mammary Carcinoma. *Endocr. Rev*, 24, 1–27.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351–379.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80:1523–631.
- He Z, Chen L, Hu X, Tang J, He L, Hu J, Fei F, Wang Q 2019. Next-generation sequencing of microRNAs reveals a unique expression pattern in different types of pituitary adenomas. *Endocr J*, doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0487.
- Jiang X, Zhang X 2013. The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 28, 245–254.
- Kong X, Wu W, Yuan Y, Pandey V, Wu Z, Lu X, Zhang W, Chen Y, Wu M, Zhang M, Li G, Tan S, Qian P 2016. Human growth hormone and human prolactin function as autocrine/ paracrine promoters of progression of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7:29465–79.
- Liongue C, Ward AC 2007. Evolution of Class I Cytokine Receptors. *BMC Evol. Biol*, 7, 120-130.
- Marano RJ, Ben-Jonathan N. 2014. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol*, 28:622–33.
- Orbach H, Shoenfeld Y 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 6:537–42.
- Özdemir S, Çomaklı S 2018. Investigation of the interaction between bta-miR-222 and the estrogen receptor alpha gene in the bovine ovarium. *Reprod Biol*, 18(3), 259-266.
- Pei T, Liu C, Liu T, Xiao L, Luo B, Tan J, Li X, Zhou G, Duan C, Huang W 2019. miR-194-3p Represses the Progesterone Receptor and Decidualization in Eutopic Endometrium From Women With Endometriosis. *Endocrinology*, 159(7), 2554-2562.
- Takizawa K, Kitani S, Takeuchi F, Yamamoto K 2005. Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J*, 52:635–41.
- Tan D, Chen KE, Khoo T, Walker AM 2011. Prolactin increases survival and migration of ovarian cancer cells: importance of prolactin receptor type and therapeutic potential of S179D and G129R receptor antagonists. *Cancer Lett*, 310:101–8.
- Tomio A, Schust DJ, Kawana K, Yasugi T, Kawana Y, Mahalingaiah S, Fujii T, Taketani Y 2008. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunol Cell Biol*, 86:616–21.
- Yang HY, Yang H, Shi GQ, Shen M, Yang JQ, Yang YL, Liu XJ 2019. Expression profile analysis of microRNAs during hair follicle development in the sheep foetus. *Biosci Biotechnol Biochem*, 83(6),1045-1061.

## Fajlar ve süt endüstrisi açısından önemi

Mukadderat Gökmen<sup>1\*</sup>, Nisanur Ektik<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup>Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

\*nisanurektik@hotmail.com

### Özet

Süt ve süt ürünleri içerdikleri çok sayıda ve önemli fonksiyonlu besin ögeleri ile beslenme açısından değerli bir kaynak olmasının yanı sıra ülkelerin ekonomisinde de önemli bir yere sahiptir. İçerikleri bakımından hem patojenik hem de saprofit mikroorganizmaların gelişmeleri açısından uygun bir ortam olduklarından üretimden tüketime kadar farklı aşamalarda çeşitli kontaminasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu durum süt ve süt ürünlerinde kalite kaybına neden olmakta ve halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Son yıllarda gıdaların korunması alanında yapılan çalışmalarda yeni doğal antimikrobiyal ajanların kullanılması gittikçe önem kazanmaktadır. Bunlardan öne çıkan fajların patojen bakterilerin kontrolündeki etkinlikleri tespit edilmiş olup, Amerika Birleşik Devletleri tarafından 2006 yılında ilk olarak gıda koruyucusu olarak kullanımı onaylanmıştır. Fajların doğal kaynaklı olması, hedef konakçılar için yüksek spesifiteye sahip olması, ucuzluğu, yaygın olarak bulunabilmesi, mikrobiyotaya karşı zararsızlığı, kendi kendini replike edebilmesi, antibiyotiklere dirençli bakterilere etkili olması gibi çok sayıda avantajları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra gıdanın tadı, kokusu ve rengi gibi organoleptik özelliklerini etkilememesi de önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir. Bu derleme, süt endüstrisinde patojen bakterilerle mücadelede etkinlikleri nedeniyle umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilen fajlar hakkında bilgilendirme yapmak amacıyla hazırlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Faj, Gıda güvenliği, Süt endüstrisi

### Phages and their importance in dairy industry

#### Abstract

Besides being a valuable resource for nutrition with high amount and important functional nutrients, milk and milk products are having an important place in countries economics. In different stages from production to consumption, various contaminations may occur because they have suitable media for both pathogenic and saprophytic microorganisms to grow up. This condition causes quality loss in milk and milk products and creates risk for public health. The usage of new natural antimicrobial agents is getting important in recent studies about food safety. Phages, one of the prominent of these agents, are determined as effective in the control of pathogen bacteria. Also, usage of phages is approved as the first food preservative by USA in 2006. There are several advantages of phages; such they are natural sourced, they have a high specificity for target host, they are cheap and can be found easily, they are not harmful for microbiota, they can replicate by itself and they are effective for the bacteria which are resistant to antibiotics. Moreover, phages do not affect organoleptic factors of food such as taste, smell and color. This review paper is studied with the aim of to inform about phages which are considered as hopeful approach in dairy industry to struggle with pathogen bacteria.

**Keywords:** Phage, food safety, dairy industry.

#### GİRİŞ

Faj, Yunanca bir kelime olan “phagein” den türemiş olup “yemek” anlamına, bakteriyofaj ise “bakteri yiyen” anlamına gelmektedir. Terim, daha çok kısaltılmış hali olan faj ifadesiyle kullanılmaktadır (Ackermann, 2011). Fajlar ilk olarak 1915’de Frederick Twort tarafından keşfedilmiş ve 1917’de Felix d’Herelle tarafından bakteri hücrelerine adsorbe olarak onları öldürme kabiliyeti olan virüsler olarak tanımlanmışlardır (Clokier ve ark., 2011). Diğer virüsler gibi yaşamlarını sürdürebilmek için bir konakçıya ihtiyaç duymakta ve bakteri hücrelerinden ayrıldıkları zaman metabolizma faaliyetlerini sürdürememektedirler (Gümüştas, 2015). Konak bakteri yönünden son derece seçici olup, her faja spesifik bir bakteri konağı bulunmaktadır. Fajlar gelişmek için konak bakteri hücrelerini enfekte ve lize edebilecek aktiviteye sahiptir (Kutter ve Sulakvelidze, 2005). İnsanlar, hayvanlar, bitkiler ve çevre için ise zararsız oldukları belirtilmiştir (Rodríguez-Rubio ve ark., 2015).

Yeryüzünde hava, deniz suyu, tatlı su, toprak, bitkiler ve gıdalar gibi çok geniş yaşam alanlarında doğal olarak en yaygın bulunan mikroorganizmalar olan fajların toplam sayısının  $10^{30}$ - $10^{32}$  olduğu tahmin edilmektedir (Marcó ve ark., 2012). Fajlar bakterilerin bulunduğu her ortamda mikrobiyal dengenin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Bhardwaj ve ark., 2015). Kanalizasyon, dışkı, toprak veya su kaynaklarından kolaylıkla izole edilebilmektedirler. İnsanların derileri, mukozal membranları ve sindirim sistemleri de birçok faj çeşidine ev sahipliği yapmaktadır (Andreoletti, 2009).

Fajlar çeşitli tip ve görünümde olup, temel yapıları baş ve kuyruk olmak üzere 2 bölümden oluşmaktadır. Baş kısımlarında DNA veya RNA'dan oluşmuş genom bulunmaktadır (Clark ve March, 2006). Genel olarak fajların büyük çoğunluğu çift sarmallı DNA genomlarını içermektedir. Bu genomlarda endolizin adı verilen ve fajın bakteriyi lize etmesini sağlayan lizozomal enzimler bulunmaktadır (Borysowski ve ark., 2006). Bu enzimler konağın peptidoglikan yapısının parçalanmasını ve fajın serbest bırakılmasını sağlamaktadır (Schmelcher ve ark., 2012). Genomun etrafında ise yine virüslerde olduğu gibi kapsid adı verilen ve genomu koruyan prizma şeklinde ve protein karakterinde kılıf bulunmaktadır (White ve ark., 2012). Fajlarda enerji üretim mekanizmaları veya protein sentezi için ribozom bulunmamaktadır (Gümüştas, 2015).

Baş kısmı kısa bir boyun yardımıyla kuyruk kısmına bağlanmaktadır. Fajların çok büyük bir kısmı (yaklaşık %96) kuyruklu yapıya sahiptir (Ackermann, 2007). Kuyruk protein karakterinde olup fajların tipine göre bazılarında çok kısa ve basit şekilde iken, bazılarında oldukça kompleks yapıda olabilmektedir. Kuyruk bakteriyeye özgü reseptörlerin tanınması ve tutunmada rol oynamaktadır. Fajlar bakteriyeye bağlandıktan sonra genetik materyalini kuyruk vasıtasıyla konak hücreye enjekte etmektedir. Bu işlem difüzyon, ozmotik basınç veya spesifik proteinlerin taşınması ile gerçekleşmektedir (Grayson ve Molineux, 2007; Ming ve ark., 2011). RNA fajları gibi bazı faj türlerinde ise hiç kuyruk bulunmamakta, bu fajlar yalnızca bir kapsidden oluşmaktadır (Ergüllü, 1982).

### **Faj Enfeksiyonları**

Fajlar konakçıları üzerinde kendilerini litik döngü ve lizojenik döngü olmak üzere iki yolla replike edebilmektedirler. Bazı faj türlerinde ise her iki döngü de görülebilmektedir. Litik yaşam şeklini seçen fajlar virüsent faj, lizojenik yaşam şeklini seçenler ise temperent (ılımlı) faj olarak adlandırılmaktadır (Guttman ve ark., 2005). Bu yaşam şekilleri bakteri-faj uyumu, faj tipi, ortamın pH'sı ve bazı mineral maddeler ile aminoasitlerin bulunup bulunmaması gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Kılıç, 2008).

Litik döngü, virüsent fajın bakteriyel konakçı hücrenin çeperindeki reseptörlere kuyruk yapılarını kullanarak adsorbsiyonu ile başlamaktadır. Bağlanmanın gerçekleşmesinin ardından fajın genetik materyali direkt olarak hücrenin içerisine enjekte olmaktadır (Molineux, 2001; Roos ve ark., 2007). Faj hücreye girdikten sonra konak genoma entegre olmadan çoğalmakta ve bakteri hücrelerinin içinde yeni fajlar oluşmaktadır. Daha sonra faj kendine özgü lizin enzimi ile konakçı hücrenin hızlıca parçalanarak ölümüne ve oluşan yeni fajların serbest kalarak salınmasına yol açmaktadır (Pietracha ve Misiewicz, 2016). Hücre ölümünün gerçekleşmesini takiben salınan fajların kendilerine yeni bir konak bulmaları gerekir. Bu şekilde yakınlardaki aynı türdeki diğer konakçı hücreleri bulup enfekte ederek hızlıca yayılabilirler. Litik döngü konakçı hücrenin beslenme ve gelişme şartlarından (pH, sıcaklık ve ortam elektrolit kapasitesi gibi) etkilenmektedir (Kahraman, 2006).

Lizojenik yaşam döngüsünde ise faj, adsorbsiyon ile bakteriyeye genetik materyalini aktardıktan sonra kendisini konak genomuna zararsız bir şekilde entegre edebilmektedir. Bakterinin bir parçası olup onunla eşzamanlı olarak replike olmakta, bu sayede konağın parçalanmasına doğrudan neden olmamaktadır (Little, 2005). Profaj (temperent, ılımlı) olarak adlandırılan bu endojen fajlar, hücre sağlıklı olduğu sürece varlığını sürdürmektedir. Ancak hücrenin şartları bozulursa (örneğin besin kaynaklarının tükenmesi gibi durumlarda) aktifleşerek çoğalma sürecini başlatır ve sonunda hücre parçalanır. Bu döngüde bakteri hücrelerinin çoğalmasına izin verdiği için virüs varlığını yeni hücrelerde de devam ettirebilmektedir (Seçkin ve Baladura, 2010). Ayrıca konağa entegre olmuş temperent fajlar konağın fenotipinin değişmesine yol açabilmekte ve hatta bazı durumlarda bakteri patojenitesini artırabilmektedir. Kısaca, bu tip fajlar genellikle istenmeyen bakterilerin yok edilmesi amacıyla kullanıma uygun bulunmamaktadır (Hagens ve Loessner, 2007).

### **Fajlardan Yararlanma Alanları**

Keşfedildiği tarihten bu yana fajların, insan ve veteriner hekimliği ile tarım uygulamalarının yanı sıra çeşitli alanlarda oldukça geniş kullanımı bulunmaktadır (Sillankorva ve ark., 2012). Antibiyotiklerin bakteriyel hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılması ve bunun sonucunda gelişen antibiyotik direnci nedeniyle patojenlerin kontrolünde alternatif yöntemler büyük ilgi görmektedir (Jassim ve Limoges, 2014). Fajlar yalnızca spesifik oldukları bakterilere etki etmeleri nedeniyle insanlarda bakterilerin sebep olduğu hastalıkların

tedavisi için iyi bir aday olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde fajlar birçok ülkede (Rusya, Gürcistan ve Polonya gibi) tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar da fajların pek çok farklı bakteri enfeksiyonunun tedavisinde önemli düzeyde etkili olduğunu göstermiştir (Gökçe, 2010).

İnsanların yanı sıra kontamine hayvanlarda da morbidite veya mortaliteye neden olan birçok bakteriyel enfeksiyonu önleme veya tedavi etmede fajların çok değerli olduğuna inanılmaktadır. Hayvanlar üzerine gerçekleştirilen çok sayıda araştırmanın sonuçları fajların biyoterapötikler olarak etkinliği konusunda inandırıcı kanıtlar sağlamaktadır (Endersen ve ark., 2014). Faj uygulamalarının bakteriyel bitki hastalıklarını da erken safhalarında kontrol altına alma konusunda başarılı örnekleri bulunmaktadır (Jones ve ark., 2012).

Genetik kod ve gen ekspresyonunun temelleri konusundaki gelişmelerin çoğu, fajlarla yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. DNA ve RNA'ya etki eden enzimlerin çoğu da yine fajlardan elde edilmiştir. Fajlar ayrıca bakterilerin tip tayininde ve rekombinant DNA teknolojisinde kullanılabilirlerdir.

## Gıda Endüstrisinde Fajlar

Gıdaların çoğunluğu içerikleri bakımından mikroorganizmaların gelişebilmeleri için uygun ortamlardır. Bu yüzden gıda ürünü üretimden tüketime kadar farklı aşamalarda çeşitli bakterilerle kontamine olabilmektedir. Her yıl gıda kaynaklı patojenler nedeniyle milyonlarca insan hastalanmakta, hastaneye kaldırılmakta ve binlerce ölüm meydana gelmektedir (Sillankorva ve ark., 2012). Diğer yandan gıda endüstrisinde her yıl patojenlerle gıdaların kontaminasyonundan dolayı üretimin yaklaşık %25'inin zayı olduğu bildirilmiştir (Sarhan ve Azzazy, 2015).

Gıda kaynaklı patojenlerin kontrolü, çeşitli doğal veya kimyasal kaynaklı gıda koruyucuları kullanılarak yapılabilmektedir. Bazı doğal kaynaklı koruyucular (organik asitler, bakteriyosinler, kitosan ve laktoferrin vb) zayıf ve sınırlı antimikrobiyal aktivite sergileme eğilimindedir (Juneja ve ark., 2012). Kimyasal koruyucular (kükürt dioksit, nitrit, nitrat, sorbik asit, asetik asit vb.) ise yan etkileri nedeniyle tüketiciler tarafından genel olarak tercih edilmemektedir (Pawlowska ve ark., 2012). Gıdalarda antibiyotiklerin kullanımının sınırlı olması ve patojenlere karşı artan antibiyotik direnci göz önüne alındığında, son yıllarda gıdaların korunması alanında yapılan çalışmalarda yeni doğal antimikrobiyal bileşiklerin kullanılması gittikçe önem kazanmaktadır (Tomat ve ark., 2013; Tsonos ve ark., 2014).

Keşiflerinden kısa süre sonra fajlar patojen bakterilerin kontrolündeki etkinlikleri nedeniyle gıda endüstrisinde doğal antimikrobiyaller olarak önerilmiştir (Coffey ve ark., 2010). Bu bağlamda 2006 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından fajların gıda katkı maddesi olarak kullanımı onaylanmış ve çeşitli firmalar tarafından farklı faj ürünleri geliştirilmiştir. Bir faj kokteyli olan ListShield, kontamine olmuş yüzeylerde ve taze gıdalarda bulunan *Listeria monocytogenes*'i elimine etmesinden dolayı FDA'dan GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) onayını alabilen ilk üründür (Sillankorva ve ark., 2012). Fajların gıdalarda kullanımının doğal kaynaklı olması, hedef konakçılar için yüksek spesifiteye sahip olması, ucuzluğu, yaygın olarak bulunabilmesi, mikrobiyotaya karşı zararsızlığı, kendi kendini replike edebilmesi, üretim süreci ve depolaması sırasında bile sürekli olarak hareket etme kabiliyeti, antibiyotiklere dirençli bakterilere etkili olması gibi çok sayıda avantajları bulunmaktadır. Bunların yanı sıra gıdanın tadı, kokusu ve rengi gibi organoleptik özelliklerini etkilememesi de önemli bir özellik olarak değerlendirilmektedir (Fernández ve ark., 2017; Tomat ve ark., 2013).

Gıda endüstrisinde fajlar kısa raf ömrü olan çiğ balık, kümes hayvanları, meyve ve sebzelerin dekontaminasyonu ve biyokontrolü için kullanılabilirlerdir (Pietracha ve Misiewicz, 2016). Biyokontrol işlemi fajın doğrudan gıdanın içine veya yüzeylerine uygulanmasıyla gerçekleştirilebilmektedir (Örneğin; et, taze ürünler, işlenmiş gıdalar veya çiğ süte karıştırılarak) (Sillankorva ve ark., 2012). Gıda endüstrisinde faj uygulamalarıyla gıda maddelerinin depolama süresi uzatılmakta, ürünlerin bozulması ve gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkların yayılması önlenmektedir, gıda üretim, işleme ve taşıma alanlarında güvenli ortamlar artırılabilir (Seçkin ve Baladura 2010). Fajlar depolama sırasında kararlı olma, kendiliğinden çoğalabilme ve toksik olmama gibi birçok temel özelliğe sahiptir (Coffey ve ark., 2010). Bunun yanı sıra 1 °C'ye kadar düşük sıcaklıklarda bile konakları lize edebildiği, böylece soğutulmuş gıdalardaki patojenik ve bozulma yapan bakterilerin (özellikle psikotrofik olanlar) gelişimini sınırladığı bildirilmiştir (Greer, 1982; Greer, 1988).

Patojen bakterilerin canlı ve inert yüzeylere tutunabilmek için oluşturdukları biyofilm yapıları, gıda ve gıda temas yüzeylerinde patojen prevelansına katkıda bulunabilmektedir. Biyofilm bakteri hücrelerinin bir matriks tarafından çevrelenerek korunduğu yapılar olduğundan dolayı temizlenmesi ve uzaklaştırılması zordur. Fajların in vitro biyofilmlere karşı kullanıldığı çeşitli çalışmalarda canlı hücrelerde önemli oranda azalmalar

saptanmıştır. Böylece fajların gıda ile temas eden yüzeylerde biyosanitizer olarak kullanımının biyofilmlerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu doğrulanmıştır (Sillankorva ve ark., 2012; Fernández ve ark., 2017).

Fajlar gıdalarda ve üretim ortamlarında gıda kaynaklı patojenler için hızlı tespit maddeleri olarak da değerlendirilebilmektedir. Canlı hedef hücrelerin hızlı ve spesifik bir şekilde tanımlanmasını sağlaması, kolay ve ucuz üretim ile dayanıklılıkları nedeniyle teşhis analizleri için ideal araçlardır. Fajın litik çoğalma döngüsünde konak hücrenin tanınmasından lizis aşamasına kadar olan her aşaması bakteri tespiti amacıyla çeşitli şekillerde kullanılabilir (Schmelcher ve Loessner, 2014).

Fajlar aynı zamanda gıdalardaki doğal mikrobiyal floranın bir parçası olarak yer almaktadırlar (Guenther ve Loessner, 2011). Gıdalarda geniş bir şekilde yayılım gösteren fajlar çiğ et ürünleri (sığır eti, tavuk), işlenmiş gıda ürünleri (turta, bisküvi hamuru, hindi rosto), fermente ürünler (peynir, yoğurt) ve deniz ürünlerinden (midye, istiridye) izole edilebilmektedir. Bu durum fajların çevrede bol miktarda bulunabildiğini ve farkında olmadan kontamine yiyeceklerin tüketilmesi vasıtasıyla günlük olarak insanlar tarafından vücuda alınabildiğini düşündürmektedir (Sillankorva ve ark., 2012).

### Süt ve Süt Ürünlerinde Faj Uygulamaları

Süt ve süt ürünleri, içerdikleri çok sayıda ve önemli fonksiyonlu besin öğeleri ile beslenme açısından değerli bir kaynak olmasının yanı sıra ülkelerin ekonomisinde de önemli bir yere sahiptir. Bununla beraber süt endüstrisinde kaliteli ve güvenli son ürünlerin üretimini sağlamak ve ekonomik kayıplardan kaçınmak için üstesinden gelinmesi gereken çeşitli sorunlarla karşılaşmıştır. İçerikleri nedeniyle hem patojenik hem de saprofit mikroorganizmaların gelişmeleri açısından uygun bir ortam olması, süt ve süt ürünlerinde kalite kaybına neden olmakta ve halk sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir. Bu noktada bakterileri enfekte eden fajların oynadığı rolü vurgulamak önemlidir. Fajların süt ve süt ürünlerinde kullanımı günümüzde antibiyotik direnci sorununa katkıda bulunmaksızın patojenlerle mücadelede umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Fernández ve ark., 2017). Süt endüstrisinde gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesine yönelik yapılan birçok araştırma faj uygulamaları konusuna vurgu yapmıştır (Viazis ve Diez-Gonzalez, 2011). Çeşitli çalışmalar da faj türlerinin sütlerde kullanımının patojen bakterilerin kontrolünde büyük potansiyelde etkinlik gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Tomat ve ark (2013) tarafından yapılan çalışmada sütlerin fermantasyonu esnasında DT1 fajının *E. coli* DH5a suşunu, faj kokteylinin (DT1+DT6 fajları) STEC O157:H7 suşunu ve DT1 veya DT6 fajlarının ise STEC O157:H7 suşunu 8 saat sonra tamamen inaktif ettiği bildirilmiştir. DT1 faj varlığında EPEC suşunun 1 saatte tespit edilebilir seviyenin (<10 kob/ml) altına düştüğü tespit edilmiştir. Faj eklenmeyen kontrol gruplarında ise *E. coli* suşlarının 5-6 saat sonunda 4-6 log kob/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir.

Bao ve ark (2015) tarafından PA13076 ve PC2184 litik fajlarının *Salmonella* Enteritidis ATCC13076 ile CVCC2184 suşları üzerinde etkinliğini test edilen çalışmada; 311 *Salmonella* izolatından 222 (%71,4)'si üzerine PA13076 fajının ve 298'i (%95,8) üzerine PC2184 fajının litik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca *S. Enteritidis* suşlarını inoküle ettikleri tam yağlı pastörize sütlerde fajların ayrı ayrı ve kokteyl şeklinde etkinliğini test etmişlerdir. Örneklere  $1 \times 10^4$  kob/ml miktarında *S. Enteritidis*  $1 \times 10^8$  pob faj veya kokteyli ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda fajların tek tek ve kokteyllerinin *S. Enteritidis* üzerinde azaltıcı ve elimine edici etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Guenther ve ark (2009)'ın yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'in 4b ve 1/2a serotipleri ile  $1 \times 10^3$  kob/g düzeyinde kontamine edilen tüketime hazır gıdalara  $3 \times 10^6$  ve  $3 \times 10^8$  pob/g konsantrasyonlarında A511 ve P100 fajları inoküle edilmiş ve örnekler 6°C'de 6 gün depolanmıştır. Pastörize çikolatalı süt ve tuzlanmamış pastörize Mozarella peynir salamurası gibi sıvı gıdalarda bakteri sayısı hızla tespit edilebilir seviyenin altına düşerken, katı gıdalarda (sosisli, dilimlenmiş hindi eti, somon füme, deniz ürünleri, dilimlenmiş lahana ve marul yaprağı) bakteri sayısında 5 loga kadar azalma saptanabilmiştir. Fajların *L. monocytogenes*'in biyokontrolü için çok etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca yüksek dozda ilave edilen fajın ( $10^8$ ) düşük konsantrasyonda uygulananlara göre ( $10^6$ ) daha etkili olduğu belirtilmiştir.

O'Flaherty ve ark (2005)'in çalışmasında çiğ süt ve 90°C'de 10 dakika ısı işlem uygulanmış süte *S. aureus* DPC5645 suşu ile Stafilokokal faj K ilave edilmiştir. 2 saat sonra ısı işlem görmüş sütlerde bakteri sayısı tespit edilebilir seviyenin altına düşerken, çiğ sütte herhangi bir azalma tespit edilememiştir. Bunun sebebi çiğ sütte bulunan ısıya duyarlı bileşenlerin fajın bakteriye bağlanmasını engelleyerek etkinliğini azaltmasına bağlanmıştır. *S. aureus* DPC5645 suşu ilave edilen ısı işlem görmüş peynir altı suyunda ise 2 saat sonra bakteri tespit edilebilir seviyenin altında bulunurken, çiğ peynir altı suyunda ise ancak 4 saat sonrasında bakterinin tamamen elimine edildiği saptanmıştır. Dolayısıyla peynir altı suyu üretimi sırasında yağ ve diğer çeşitli süt proteinlerinin uzaklaştırılmasının faj aktivitesinin engellenmesinin etkisini azalttığını belirtmişlerdir.

Sütlerin yanı sıra peynirlerde de kontrollü olarak kullanılan fajların patojen bakterilerin kontrolünde büyük oranda etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Guenther ve ark (2011) tarafından yumuşak peynirlerde yapılan çalışmada  $10^1$  ve  $10^3$  düzeyinde *L. monocytogenes*'e karşı *Listeria* A511 fajı  $3 \times 10^8$  ve  $1 \times 10^9$  pob/cm<sup>2</sup> miktarında uygulanmıştır.  $10^3$  kob/cm<sup>2</sup> *L. monocytogenes* ve  $3 \times 10^8$  faj inoküle edilmiş Camembert tipi peynirde 21 günlük olgunlaşma periyodunun sonunda *L. monocytogenes* sayısında 2.5 log ve 22 gün olgunlaştırılan Limburger tipi peynirde ise 3 logtan fazla azalma saptanmıştır.  $10^1$  kob/cm<sup>2</sup> düzeyinde *L. monocytogenes* ile kontamine peynirlerde ise azalmanın tespit limitinin altında olduğu belirlenmiştir. *Listeria* A511 fajının, gıdalar ve üretim ekipmanlarında *Listeria* kontaminasyonunun kontrolü için etkili ve güvenli bir önlem olabileceğini değerlendirmişlerdir.

Modi ve ark (2001) tarafından çiğ ve pastörize sütlere ilave edilen  $10^8$  pob/ml SJ2 fajının varlığında Cheddar peynirinin üretimi, olgunlaşması ve depolaması esnasında  $10^4$  kob/ml *Salmonella* Enteritidis'in hayatta kalma kabiliyeti 8 °C'de 99 gün boyunca araştırılmıştır. İlk 24 saatin sonunda *Salmonella* sayısında her iki peynir grubunda da 1-2 log azalma görülürken, pastörize süttten üretilen peynirde bakteri sayısının çiğ süttten üretilen peynire göre daha az olduğu belirtilmiştir. 99 günün sonunda faj eklenmemiş kontrol grubu peynirlerde *Salmonella* sayısının  $10^3$  kob/g düzeyinde ve faj eklenmiş çiğ süttten yapılan peynirlerde ise yaklaşık 50 kob/g düzeyinde olduğunu bildirilmiştir. Faj eklenmiş pastörize sütlerden üretilen peynirde ise 89 gün sonra bakterinin tespit limitinin altında olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak faj ilavesinin Cheddar peynirinde *Salmonella*'nın hayatta kalma kabiliyetini azaltmak için etkili bir yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

Silva ve ark (2014)'ün çalışmasında Minas Frescal ve Coalho yumuşak peynirlerine yaklaşık 105 kob/g düzeyinde *L. monocytogenes* 1/2a ve 4b serotipleri karışımı ile  $8,3 \times 10^7$  pob/g P100 fajı inoküle edilmiş ve 10 °C'de 7 gün depolanmıştır. İlk 30 dakikanın sonunda faj içermeyen örneklerle kıyasla bakteriyofaj P100 eklenmiş örneklerde, Minas Frescal peynirinde *L. monocytogenes* sayısında 2,3 log, Coalho peynirinde ise 2,1 log azalma olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresinin sonunda fajın antilisterial etkisinin düşük olduğu belirtilmiştir. Fajın etkinliğinin bakterinin başlangıç konsantrasyonu ile uygulanan faj miktarına bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Lee ve ark (2017) tarafından yapılan çalışmada pastörize sütlere LMP1 ve LMP7 fajları ile  $5 \times 10^5$  kob/ml düzeyinde *L. monocytogenes* ATCC 7644 veya 19114 suşları inoküle edilmiş ve süspansiyonlar 30 °C'de 20 saat inkübe edilmiştir. *L. monocytogenes* ATCC 7644'un gelişimi her iki faj tarafından inhibe edilirken, *L. monocytogenes* ATCC 19114 suşu üzerinde sadece LMP1 fajının 3 logtan fazla azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Aynı suşlar ve fajlar kullanılarak 10 °C'de 5 gün depolanan sütlerde yapılan uygulamada ise her iki faj da *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun gelişimini baskımlarken, *L. monocytogenes* ATCC 19114 suşunun gelişimini engelleyememiştir. 4 °C'de 18 gün depolanan sütlerde ise her iki fajın da her iki suş üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun süttün protein ya da yağ globülleri gibi bazı bileşenlerinin, bakteriyofajlar ile konuk bakteriler arasındaki etkileşime engel oluşturabilmesinden kaynaklanabileceği ve fajların kokteyl şeklinde kullanımının *L. monocytogenes* üzerinde daha etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

### **Süt İşletmelerinde Mevcut Fajlar ve Kontaminasyonları**

Süt ve süt ürünlerinde fajların kontrollü kullanımının patojen bakterilere karşı etkinlik göstermesinin yanı sıra, işletmelerde doğal olarak bulunan fajlar dünya çapında çeşitli problemlere neden olabilmektedir. Fajların süt işletmelerinde çok çeşitli kaynakları bulunmaktadır. Bu kaynaklardan çiğ süt, fajların süt endüstrisine girişinde ve yeni virulent fajların ortaya çıkmasında birincil kaynak olarak düşünülmektedir. Fajlar çiğ sütte serbest virionlar olarak ve laktik asit bakterilerinde profajlar şeklinde bulunabilmektedir (Marvig ve ark., 2011; Kleppen ve ark., 2011). Çiğ sütte özellikle laktik asit bakteri fajları doğal olarak düşük titrelerde ( $10^1$ - $10^3$  pob/ml) bulunabilmektedir. Faj konsantrasyonu süttün toplanma, nakliye, depolama ve işlenme koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Farklı çiftliklerden toplanan çiğ sütlerin birleştirilmesi de faj çeşitliliğinin artmasına neden olabilmektedir (Szczebankowska ve ark., 2013).

Süt endüstrisinde bir diğer faj kaynağı starter kültürlerdir. Starter kültürlerin istenen özelliklere sahip, kaliteli ve standart ürün elde etmek için üretimde kullanılmaya başlanılmasından sonra yeni problemler ortaya çıkmıştır. Süt endüstrisinde starter kültürlerde faj sorunu ilk olarak 1935 yılında tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada peynir üretiminde starter olarak kullanılan *Streptococcus cremoris*'in asitlik üretme aktivitesindeki bozulmadan fajların sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Whitehead ve Cox 1935). İlgili tarihten günümüze kadar olan bilimsel ve teknolojik gelişmelere rağmen, süt endüstrisinde peynir, yoğurt ve diğer fermente süt ürünlerinin üretiminde faj kaynaklı fermantasyon problemleri devam etmektedir (Callanan ve Klaenhammer, 2008). Süt ürünlerinin fermantasyonlarında kullanılan starter kültürler steril olmadığı için faj enfeksiyonlarına

duyarlılık göstermektedirler. Buna ek olarak, aynı starter kültürlerin sürekli kullanılması da fajların çoğalması için sabit bir konak sağlamaktadır. (Coveney ve ark., 1994; Neve ve ark., 1995). Piyasada bulunan özel kültürlerden faja dirençli olanlarının sayılarının kısıtlı olması da bu problemlerden biridir (Arendt ve ark., 1993).

Starter kültürlerin fajlar tarafından enfekte edilmesi, üretim prosesinde asit oluşumunun azalması veya tamamlanamaması ile fermantasyon bozukluklarına neden olabilmektedir. Faj aktivitesi; üretim süresinin uzamasına ve ürün kalitesinin (besin değerleri, tadı, kokusu, yapısal bozulma vb.) düşmesine, üretim kaybına ve ciddi ekonomik kayıplara yol açabilmektedir (Deveau ve ark., 2006). Faj kontaminasyonlarının süt endüstrisinde fermente ürünlerde %15-20 oranına varan kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (Sanders, 1988).

Süt ve süt ürünleri ile ilişkili fajların çoğunun standart pastörizasyon prosedürlerine dirençli olduğu bilinmektedir (Campagna ve ark., 2014). Bazı durumlarda sütlerde pastörizasyon sonrasında faj kontaminasyonu da meydana gelebilmektedir. (Tomat ve ark., 2013). Süt endüstrisinde faj kontaminasyonu; üretimde kullanılan hammadde, süte ilave edilen katkı maddeleri, peynir altı suyu konsantresi gibi yeniden kullanılan yan ürünler, personelin işletme içindeki hareketleri, alet ve ekipmanların yetersiz temizliği ve işletmede kullanılan suyun kalitesi gibi çeşitli etkenlerden kaynaklanabilmektedir (Murphy ve ark., 2013). Bunların yanı sıra üretim ortamındaki kontamine yüzeyler ve su damlacıkları etrafındaki virüsler hava akımıyla aerosol haline gelerek ve havadaki faj parçacıklarının ortama dağılmasına neden olabilmektedir. Fajlar işletmelerde özellikle konakçılarının gelişme koşullarına uygun olan, temizlik ve dezenfeksiyonun zor olduğu yerlerde bulunabilmektedirler (Fernández ve ark., 2017).

Süt endüstrisinde faj varlığı en fazla peynir üreticilerini olumsuz etkilemektedir (Şimşek ve Mete, 1995). Fajlar peynir üretilen ortamlarda birçok yüzeyde doğal olarak bulunabilmekte ve gelişebilmektedir (Rousseau ve ark., 2009; Verreault ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda bir peynir üretim tesisinin farklı alanlarında havada  $10^2$  pob/m<sup>3</sup> ila  $10^8$  pob/m<sup>3</sup> arasında değişen konsantrasyonlarda faj tespit edilebilmiştir (Neve ve ark., 1995). Peynir üretiminde asitliğin kısa sürede ve düzenli bir şekilde artması; tat ve aromanın oluşmasının yanı sıra peynirde bulunabilecek patojen mikroorganizmaların veya bozulmalara neden olabilen diğer mikroorganizmaların ortadan kalkması için gereklidir. Faj varlığında ise proseste asitliğin tamamen durması veya zayıf asitlik oluşması, peynirde istenmeyen tat ve aroma oluşturmada, kıvamına zarar vererek kalite düşüklüğüne neden olabilmektedir. Ayrıca olgunlaşma sırasında diğer zararlı mikroorganizmaların kolaylıkla gelişimi söz konusu olabilmektedir (Ergüllü, 1982). Süzme ve sert peynirlerin üretimindeki teknolojik problemlerin %60-70'inin *Lactococcus* cinsi bakterileri enfekte eden fajlardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle peynir teknolojisinde çalışmalar daha çok Laktokokal fajlar üzerinde yoğunlaşmıştır (Szczepankowska ve ark., 2013).

### Fajların Tespiti ve Kontrolü

Starter kültürleri hedef alan fajların doğru ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi, kontamine sütlerin değerlendirilmesinde hızlı kararlar alınmasına yardımcı olmaktadır. Bu kontamine sütler starter kültür kullanılmayan, fajların deaktive edildiği veya tespit edilen faja duyarlı olmayan starterlerin kullanılabilirdiği prosesde değerlendirilebilir. Örneğin süt *Lactococcus lactis* fajı ile kontamine olmuş ise UHT muamelesinden geçirilebilmekte, içmek amacıyla pastörize süt olarak veya yoğurt üretiminde kullanılabilir (Del rio ve ark., 2007). Fermente süt ürünlerinin üretiminin tüm aşamalarında fajları tespit etmek ve tanımlamak için hızlı ve hassas yöntemler gereklidir. Fajların saptanmasında direkt testler (mikrobiyolojik, immünolojik, moleküler ve elektron mikroskopik metotları) ve indirekt testler (Örn; aktivite testi, impedimetrik yöntemler, akış sitometrisine dayanan yöntemler) mevcuttur (Del rio ve ark., 2007).

Çiğ süt, peynir altı suyu ve süt ürünlerinde yüksek sayıda bulunabilen fajların kontrolü fermantasyon süreçlerinin başarısı için çok önemlidir. Süt işletmelerinde fajların varlığı kaçınılmaz olduğundan kontrol programlarının planlanması fajları tamamen eradike etmek yerine kontrol altına almak üzere yapılmalıdır (Emond ve ark., 2007). Süt işletmelerinde fajları kontrol altına alabilmek için öncelikle giriş kaynakları ve yayılım rotaları belirlenmeli, yakından izlenmeli, hızlı ve etkili faj tespit yöntemleri ile kontrol ölçümleri uygulanmalıdır (Fernández ve ark., 2017). Süt endüstrisinde faj popülasyonunu kontrol altına almak üzere birçok yöntem tasarlanmıştır. Bunlardan ilki ham maddeye doğrudan starter kültür (direct-to-vat) inoküle edilmesidir. Bu yöntemin tercih edilmesinin nedeni faj enfeksiyon riskini elimine etmesi, son üründeki bakteri sayısı ve oranları konusunda daha kesin sonuçlar alınması, iş gücü ve enerji tasarrufu sağlanmasıdır. Ancak proseste inkübasyon süresinde biraz uzama meydana gelebilmektedir (Surono ve Hosono, 2002). Son zamanlarda birçok yoğurt işletmecisi direkt-vat kültür kullanımına yönelmiştir. Starter kültürler doğrudan

prosesteki süte ilave edildiği için aşamalı inokülasyonların neden olduğu kontaminasyonlar minimuma indirgenmektedir (Kahraman, 2006).

Bir diğer kontrol metodu da starter kültür olarak diğerlerine kıyasla fajaya dayanaklı suşların kullanılmasıdır. Ortamdaki faj kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacıyla ticari sanitazer ve dezenfektanlarla da yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Campagna ve ark., 2014). Diğer kontrol yöntemleri olarak kültür rotasyon programları, peynir altı suyunun kapalı sistemde dikkatli taşınması ve hızlıca uzaklaştırılması, alet ekipman yüzeylerinin pürüzsüz ve kolay temizlenebilir olması, faj enfeksiyonunu sınırlayan ortamların geliştirilmesi, hijyen ve sanitasyonun optimizasyonu da önerilmiştir. Günümüzde faj problemlerini uzaklaştırabilmek için faj dirençlilik sistemlerini içeren ve aynı zamanda fajlarla etkileşim vermeyen suşların tanımlanması başlıca çözüm yolu olarak kabul edilmektedir (Şanlıbaba ve Akçelik, 2000). Bunun için öncelikle işletmede kullanılan starter kültürlerin ortamda bulunabilecek fajlara karşı direnç gösterip göstermediğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu da ancak fajların izolasyonları, tanımlanmaları, sınıflandırılma ve koleksiyonlarının oluşturulmasıyla mümkün olmaktadır (Soykut, 2007).

## SONUÇ

Günümüzde gıdalarda koruyucu amaçlı olarak doğal kaynaklı antimikrobiyallerin kullanımı büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda fajların başta süt endüstrisi olmak üzere gıda ve gıda işleme ortamlarında biyokontrol, biyosanitasyon ve biyokoruma amaçlı kullanımları bu konuda öne çıkan alternatif yöntemlerden biri olarak değerlendirilmektedir.

Bu bağlamda çiftlikten çatala anlayışına göre tüm fajlar, modifiye fajlar ve bunların türevlerinin antimikrobiyal olarak mevcut kullanımları ve gelecekteki potansiyelleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmelidir. Bunun yanı sıra işletmelerde mevcut bulunan fajların etki ve sonuçları konusunda daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır. Fajların alternatif antimikrobiyeller olarak kullanımlarının etkin bir şekilde yaygınlaştırılmasını sağlamak amacıyla güvenli ve teknolojik çalışma olanakları sağlanmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Ackermann HW 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152: 227-243.
- Ackermann HW 2011. Phage or Phages. *Bacteriophage*, 1(1): 52-53.
- Andreoletti, O 2009. EAPM. "The use and mode of action of bacteriophages in food production. Scientific opinion of the panel on biological hazards - Endorsed for public consultation 22 January 2009 - Public consultation 30 January - 6 March 2009", *The EFSA Journal*, 1076, 1-26.
- Arendt EK, van de Guchte M, Coffey AG, Daly C, Fitzgerald GF 1993. Molecular genetics of bacteriophages of lactic acid bacteria. *Lait*, 73: 191-198.
- Bao H, Zhang P, Zhang H, Zhou Y, Zhang L, Wang R 2015. Bio-control of Salmonella Enteritidis in foods using bacteriophages. *Viruses*, 7: 4836-4853.
- Bhardwaj N, Bhardwaj SK, Deep A, Dahiya S, Kapoor S 2015. Lytic Bacteriophages as Biocontrol Agents of Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(11): 708-723.
- Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp.Biol.Med*, 231: 366-377.
- Callanan MJ, Klaenhammer TR 2008. Bacteriophages in industry. In: *Encyclopedia of life science*, Chichester, John Wiley & Sons.
- Campagna C, Villion M, Labrie SJ, Duchaine C, Moineau S 2014. Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 171:41-47
- Clark JR, March JB 2006. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 212-218.
- Clokier MRJ, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1): 31-45.
- Coffey B, Mills S, Coffey A, McAuliffe O, Ross RP 2010. Phage and their lysins as biocontrol agents for food safety applications. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 1: 499-68.
- Coveney HM, Fitzgerald GF, Daly C 1994. A study of the microbiological status of Irish farmhouse cheeses with emphasis on selected pathogenic and spoilage microorganisms. *J. Appl. Bacteriol*, 77: 621-630.
- Del Rio B, Binetti AG, Martin MC, Fernandez M, Magadan AH, Alvarez MA 2007. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*, 24: 75-81.
- Deveau H, Labrie SJ, Chopin MC, Moineau S 2006. Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4338-4346.
- Emond E, Moineau S. Bacteriophages and food fermentations 2007. In: McGrath S, van Sinderen D (eds). *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press/Caister Academic Press, pp. 93-124.



- Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A 2014. Phage Therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 5: 327-349.
- Ergüllü E 1982. Bakteriyofaj ve Süt Teknolojisinde Yarattığı Sorunlar. *Gıda*, 7(5): 239-245.
- Fernández L, Escobedo S, Gutiérrez D, Portilla S, Martínez B, García P, Rodríguez A 2017. Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics*, 6: 27.
- Gökçe Ö 2010. Lactobacillus delbrueckii Bakteriyofajı LI-H'nin Konakçı Spektrumu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi.
- Grayson P, Molineux IJ 2007. Is phage DNA 'injected' into cells-biologists and physicists can agree. *Curr. Opin. Microbiol*, 10: 401-409.
- Greer GG 1988. Effect of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage. *Journal of Food Science*, 53: 1226-1227.
- Greer GG 1982. Psychrotrophic bacteriophages for beef spoilage pseudomonads. *Journal of Food Protection*, 45: 1318-1325.
- Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ 2009. Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of Listeria monocytogenes in Ready-To-Eat Foods. *Appl Environ Microbiol*, 75(1): 93-100.
- Guenther S, Loessner MJ 2011. Bacteriophage biocontrol of Listeria monocytogenes on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage*, 1(2): 94-100.
- Guttman B, Raya RA, Kutter E 2005. Basic Phage Biology. In: Bacteriophages Biology and Applications, E Kutter, A Sulakvelidze (eds). USA, CRC Press, pp. 29-66.
- Gümüştas A 2015. Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyofajlarının Çeşitli Kaynaklardan İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Hagens S, Loessner MJ 2007. Application of Bacteriophages for Detection and Control of Foodborne Pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76: 513-519.
- Jassim SAA, Limoges RG 2014. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 30: 2153-2170.
- Jones JB, Vallad GE, Iriarte FB, Obradović A, Wernsing MH, Jackson LE, et al 2012. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4): 208-214.
- Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X 2012. Novel natural food antimicrobials. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*, 3: 381-403.
- Kahraman E 2006. Streptococcus salivarius subsp. thermophilus ve Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus Suşlarında Lizogeninin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Kılıç S 2008. Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Bornova, İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 451.
- Kleppen HP, Bang T, Nes IF, Holo H 2011. Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *Int. Dairy J*, 21: 592-600.
- Kutter E, Sulakvelidze A 2005. Basic phage biology. In: Bacteriophages: Biology and Applications, E Kutter (ed). Florida, CRC Press, 375-405.
- Lee S, Kim MG, Lee HS, Heo S, Kwon M, Kim G 2017. Isolation and characterization of Listeria phages for control of growth of Listeria monocytogenes in Milk. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour*, 37(2): 320-328.
- Little JW 2005. Loysogeny, Prophage Induction, and Lysogenic Conversion. In: Waldor MK, Friedman DI, Adhya S (eds.) Phages Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. Washington DC, ASM Press, pp. 37-54.
- Marcó MBS, Moineau S, Quiberoni A 2012. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2(3): 149-158.
- Marvig CL, Aideh B, Neve H, Heller KJ, Knøchel S, Vogensen FK 2011. Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. *Int Dairy J*, 21: 556-560.
- Ming HX, Zhu L, Zhang Y 2011. Rapid quantification of infectious enterovirus from surface water in Bohai Bay, China using an integrated cell culture-qPCR assay. *Mar. Pollut. Bull*, 62: 2047-2054.
- Modi R, Hirvi Y, Hill A, Griffiths MW 2001. Effect of phage on survival of Salmonella Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 64(7): 927-933.
- Molineux IJ 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40: 1-8.
- Murphy J, Mahony J, Bonestroo M, Nauta A, van Sinderen D 2013. Impact of thermal and biocidal treatments on lactococcal 936-type phages. *Int. Dairy J*, 34: 56-61.
- Neve H, Berger A, Heller KJ 1995. A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47: 193-207.

- O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3): 274-279.
- Pawlowska AM, Zannini E, Coffey A, Arendt EK 2012. "Green preservatives": combating fungi in the food and feed industry by applying anti fungal lactic acid bacteria. *Adv. Food Nutr. Res*, 66: 217-238.
- Pietracha D, Misiewicz A 2016. Use of products containing a phage in food Industry as a new method for *Listeria monocytogenes* elimination from food (*Listeria monocytogenes* phages in food industry) – a Review. *Czech Journal of Food Science*, 34(1): 1-8.
- Rodríguez-Rubio L, García P, Rodríguez A, Billington C, Hudson JA, Martínez B 2015. *Listeria* phages and coagulin C23 act synergistically to kill *Listeria monocytogenes* in milk under refrigeration conditions. *Int. J. Food Microbiol*, 205: 68-72.
- Roos WH et al 2007. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 1484-1497.
- Rousseau GM, Moineau S 2009. Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 5336-5344.
- Sanders ME 1988. Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Biochimie*, 70: 411-421.
- SarhanWA, Azzazy HME 2015. Phage approved in food, why not as a therapeutic? *Expert Rev. Anti Infect. Ther*, 13: 91-101.
- Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*, 7(10): 1147-1171.
- Schmelcher M, Loessner MJ 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4: e28137.
- Seçkin AK, Baladura E 2010. Gıdaların Muhafazasında Bakteriyosin ve Bakteriyofaj Uygulamaları. *Gıda*, 35(6): 461-467.
- Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J 2012. Bacteriophages and their role in food safety. *Int. J. Microbiol*, 1-13.
- Silva ENG, Figueiredo ACL, Miranda FA, Almeida RCC 2014. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Brazilian Journal of Microbiol*, 45(1): 11-16.
- Soykut EA 2007. *Streptococcus Thermophilus* ve *Lactobacillus Bulgaricus* Virüilent Fajlarının Replikasyon Parametreleri, Kapsid Protein Profilleri ve Restriksiyon Endonükleaz Analizleri Esas Alınarak Tanımlanmaları ve Sınıflandırılmaları. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi.
- Surono I, Hosono A 2002. Starter cultures. *Encyclopedia of Dairy Science*. H. Roginski, J. Fuquay, P. Fox (eds), Academic Press, United Kingdom, pp. 1023-1028.
- Szczepankowska AK, Górecki RK, Kołakowski P, Bardowski JK 2013. Lactic Acid Bacteria Resistance to Bacteriophage and Prevention Techniques to Lower Phage Contamination in Dairy Fermentation. *IntechOpen*, 2: 23-72.
- Şanlıbaba P, Akçelik M 2000. Çiğ Süt ve Peyniraltı Sularından İzole Edilen Laktokokların Faj Duyarlılıkları. *Turk J Biol*, 24: 425-435.
- Şimşek O, Mete H 1995. Bakteriyofaj. *Gıda*, 42-44.
- Tomat D, Mercanti Q, Balague C, Quiberoni A 2013. Phage biocontrol of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during milk fermentation. *Lett Appl Microbiol*, 57: 3-10.
- Tsonos J, Vandenhevel D, Briers Y, De Greve H, Hernalsteens JP, Lavigne R 2014. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. *Vet. Microbiol*, 171: 460-469.
- Verreault D, Gendron L, Rousseau GM, Veillette M, Massé D, Lindsley WG, et al 2009. Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 491-497.
- Viazis S, Diez-Gonzalez F 2011. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: the twentieth century's emerging foodborne pathogen: a review. *Adv Agronomy*, 111: 1-50.
- White HE, Sherman MB, Brasilès S, Jacquet E, Seavers P, Tavares P, Orlova EV 2012. Capsid Structure and Its Stability at the Late Stages of Bacteriophage SPP1 Assembly. *Journal of Virology*, 86(12): 6768-6777.
- Whitehead HR, Cox GA 1935. The occurrence of bacteriophage in lactic streptococci. *NZJ Dairy Sci Technol*, 16: 319-320.

## The effects of *Spirulina* produced in Çankırı geothermal water on DNA protective activity

<sup>1</sup>Betül Kut Güroy, <sup>2</sup>Sibel Bayıl Oğuzkan

<sup>1</sup>Central Research Laboratory, University of Yalova, Turkey

<sup>2</sup>Department of Medical Services and Techniques, Vocational School of Health Services, University of Gaziantep, Turkey

### Abstract

In this research, carried out with geothermal water through the production of *Spirulina* to increase the widespread and effective use of geothermal waters in Turkey is aiming to gain a new perspective. Turkey in order to provide an innovative contribution to agricultural policy has been investigated culturebility with Çankırı geothermal water of *Spirulina platensis*. In this study, the effects of geothermal water, which is considered as nutrient medium for *Arthrospira (Spirulina) platensis*, on antioxidant capacity and DNA protection were investigated. In this research, Çankırı geothermal water was used to replace of Schlösser *Spirulina* nutrient medium, which is widely used commercially. Experiments were carried out with three repetitions with a lighting of 1000 lux at 30°C. The results obtained from groups of geothermal water (50% Çankırı geothermal water and 100% Çankırı geothermal water) were compared with Schlösser's *Spirulina* Medium group. As a result the DNA protective activity of spirulina produced in the geothermal water of Çankırı showed better protective activity than those produced in the Schlösser medium. The antioxidant content of spirulina produced in 100% Çankırı geothermal water was found to be significantly higher than 50% Çankırı and Schlösser's medium. It has been determined that *Spirulina platensis* can be produced by the addition of Çankırı geothermal water also using as alternative of Schlösser's spirulina medium.

**Key words:** DNA protection, antioxidant, geothermal water, *Spirulina*

### Introduction

*Spirulina* is a blue-green microalgae rich in essential amino acids, chlorophyll and essential fatty acids known as primary metabolite products and is one of the rare sources of phycocyanin which is a secondary metabolite product and is defined as a bioactive compound [1]. *Spirulina* may contain up to 70% protein [2] of the dry weight and about 20% phycocyanin [3] depending on the culture and extraction conditions [4].

*Spirulina* is an important raw material for food, cosmetics and pharmacy areas because it contains natural blue colored pigment source [5]. Phycocyanin is a pigment from the phycobiliprotein family characterized by its intense blue color. In addition to its therapeutic properties, it is known as a rich nutrient with organic and inorganic compounds necessary for health [6]. *Spirulina* has potential for treatment of certain diseases for human, and is an alternative option for production of functional foods and nutraceuticals. It is emphasized that *Spirulina platensis*, which has a significant health effect, inhibits inflammatory cells in the lungs and is beneficial to health [7].

The bioactive components in natural products could eliminate the harmful effects of free radicals on the cell with their antioxidant character. In the metabolism is the hydroxyl and hydrogen peroxide radical are the most effective radicals. This radical can easily attack nucleotides and cause permanent damage to the structure of DNA, which is the most important genetic nucleotide [8]. Therefore, oxidant status and DNA protective activities of spirulina were determined in this study.

### Material and Method

#### *Spirulina platensis* Culture Condition

Cultivation was carried out in sterilized erlenmeyer flask glass 2 L equipped with an LED type illumination. Each culture was inoculated within initial *Spirulina platensis* biomass concentration of 0.25 OD<sub>750</sub>. *Spirulina platensis* growth was determined daily by measuring the optical density (OD) at 750 nm wavelength. Temperature of medium was maintained at 29–30 °C and the pH of the cultures was measured daily.

#### Harvesting and Analyzes

The biomass was harvested using filter cloth 80 µm size. After the fresh *Spirulina* was harvested, it was dried at 40 C and the dried samples were milled to obtain *Spirulina* powder. Phycocyanin analysis with dry biomass was performed by modifying from Boussiba and Richmond (1979). Each of the 40mg dried biomass was added into 10 mL centrifugal tube. Phosphate buffer pH 7.2, 100mM, was used as a solvent (buffer consists of 10.64 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 5.29 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The suspension was mix with vortex, then stored in the refrigerator at 4 °C

over night and centrifuged at 3500rpm 5 minute. Using the phosphate buffer empty, the absorbance of each replicate was read at 620 nm to the CPC content by the following equation (9).

$$\% \text{ C-phycocyanin} = (A_{620} \times V \times 100) / [3.39 \times \text{dried biomass (mg)} \times (\% \text{ dry weight})]$$

where CPC is the crude phycocyanin %,  $A_{620}$  represents the absorbance of phycocyanin at 620nm, 3.39 is the extinction coefficient of CPC at 620nm, V is the volume of solvent, 100 represents 100%, dried biomass is the weight of Spirulina powder and dry weight represents the percentage of dry weight of Spirulina powder.

#### Crude phycocyanin production rate

Phycocyanin production rate was calculated using Eq. as

$$CPC \mu = \mu \times W1 \times CPC$$

Where  $CPC \mu$  is the crude phycocyanin production rate ( $\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ),  $\mu$  is the growth rate of *Spirulina platensis* ( $\text{day}^{-1}$ ), W1 is the dry weight of biomass ( $\text{mgL}^{-1}$ ), and CPC represents crude phycocyanin content(%). (10)

#### Purity of Phycocyanin

The purity of C-PC preparations was evaluated based on the ratio between absorbencies from phycocyanobilin at 620nm and aromatic amino acids in all proteins in the preparation at 280 nm (11).

Purity ratio of C-phycocyanin =  $A_{620} / A_{280}$

Protein was analysed by Kjeldahl method.

#### DNA Protective Activity of Spirulina

pBR322 plasmid DNA (vivantis) was used in order to determine the DNA protection activity of *Spirulina* samples from damages caused by UV and oxidative stress. According to the method specified by Russo and et al. and imaging was performed on 1.25% agarose gel [12].

#### Determination of Total Antioxidant Level (TAL) and Total Oxidant Level (TOL)

Antioxidant agents in the sample transform the dark blue-green ABTS radical to reduced ABTS form and the change in absorbance at 660nm indicates the total antioxidant level of the sample. The total oxidant test is calibrated using hydrogen peroxide. In the presence of oxidant, ferrous ion oxidizes the chelator complex into ferric ion. The density of oxidation reaction increases depending on the presence of oxidants in the reaction medium. Color intensity is measured spectrophotometrically. The absorbance value indicates the oxidant value in the sample. The results obtained were compared with  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equiv./L}$  to determine the TOL value [13]. These studies employed the Rel Assay Diagnostics – TAL-TOL Assay Kit.

#### Results and Discussion

*Spirulina* culture was successfully carried out with nutrient formulation containing 50% Çankırı geothermal water. However, less cell development was observed compared to the control group Schössler medium as seen table 1. In terms of protein values, less protein was obtained than the control group as seen table 2. This may be due to the lack of some minerals in geothermal water. More different formulations should be developed. The results of the purity of the phycocyanin were determined positively, albeit quantitatively. With the 100% Çankırı geothermal, successful culture development could not be achieved. Although the highest dry matter appears to be obtained with 100%, this failure is observed when examined in terms of cell number. Probably 100% geothermal contamination occurred. *Spirulina* culture was successfully achieved with 50% Çankırı geothermal. However, the results were lower than the control. However, it produced more than 50% geothermal control phycocyanin in terms of phycocyanin. Phycocyanine is a secondary metabolite. Presumably, the lack of nutrients was perceived as stress, and phycocyanin increased by capturing more light. The DNA bands of the spirulina produced in the control groups and Schössler media were visualized. Fig. 1 (b) shows the band obtained by using geothermal water at a rate of 50% is the spirulina band images obtained from 100% geothermal water. DNA protection activities of producing at Schössler medium (code of A1) and control group (code of K1 and K2) compare with different ratio of geothermal water (%50 A and %100 A2). The spirulina produced in the Schössler medium shows DNA protective activity compared to the control groups as shown that figure 1 (a). When the DNA band results in Fig. 1 (b) was examined, it was found that the A and A2 had higher activity than Schössler medium (A1). When we compare the bands in Figures 1 (b), it was seen that the sample A2 produced in 100% geothermal water gives a better band appearance compared to 50% geothermal water. When the antioxidant values of samples were examined, it was found that the best antioxidant properties were found in each of the samples showing that %100 Çankırı geothermal water. Schössler medium (A1) and %50 Çankırı geothermal water (A) were determined lower antioxidant capacity compare to reference value.

**Table 1. Growth parameters of *Spirulina* cultures**

Goups	Cell Counting	Optical Density (A750)	Dry Matter (g/L)	pH	Light intensity	Temperature C°
% 100 Schlösser	15*10 <sup>6</sup>	1,20	1,75	10,05	770,00	29,47
%100 Çankırı Geothermal	2*10 <sup>6</sup>	0,25	1,89	9,35	596,33	30,17
%50 Çankırı Geothermal	9*10 <sup>6</sup>	0,93	1,30	9,88	1274,00	28,93

**Table 2. Protein and Phycocyanin content of *Spirulina***

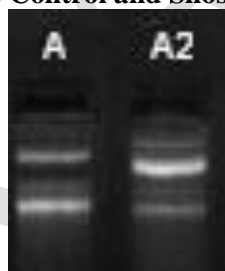
Deneme Grubu	% C-PC	Purity ratio	C-PC mg/mL	Yield mg/g	Protein
% 50 Çankırı Jeotermal	17,27	2,84	0,12	28,56	19,90
% 100 Schlösser	16,91	4,43	0,24	54,26	46,00
%100 Çankırı Geothermal					10,3

**Table 3:**

samples's	Code of <i>Spirulina</i> samples	TAL ((mmol Trolox Equiv/L)	TOL (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv/L)	<i>Spirulina</i> oxidant status
	A1	1,862	0,021517	
	A	1,452	0,016163	
<u>A1 : Schlösser</u> 100 geothermal geothermal water	A2	3,022	0,004462	medium , A2: % water, A : %50
	Reference values	TAS>2 very good	TOS<5 very good	



**Figure 1 (a) Control and Shossler medium**



**Figure 2 (b) % 50 (A) and %100 (A2) Şanhurfa Karaali Jeotermal water**

K1 : Plasmid DNA (3 µl) + distilled water (6 µl); K2 : Plasmid DNA (3 µl) + UV (5 dk) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl)

A1 : Plasmid DNA (3 µl) + %100 shosler 40 C (5µl) + UV (5 minutes) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl); A: Plasmid DNA (3 µl) + % 50 Şanhurfa Karaali geothermal water 40°C dried (5µl) + UV (5 minutes) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl); A2: Plasmid DNA (3 µl) + %100 Şanhurfa Karaali geothermal (5µl) + UV (5 minutes) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl)

As a result, the oxidant levels of the samples produced in the geothermal water are very low compared to the other samples, while the antioxidant levels are at the highest level compared to the other samples as shown that table 3.

In order to achieve optimal algal productivity, geothermal water can be used directly or substitutable of these nutrient mediums depending on mineral content. Macro and micro elements in geothermal waters can reduce the costs of commercial compounds added to the aquatic environment to prepare the *Spirulina* medium and increase the yield of the phycocyanin.

## Reference

- [1] Kultschar B, Llewellyn C (2018). Secondary Metabolites in Cyanobacteria, Secondary Metabolites - Sources and Applications Chapter 2. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen>
- [2] Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP (1995). Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. Plants in Human Nutrition. World Rev Nutr Diet. Basel, Karger, vol 77, pp 32-46 <https://doi.org/10.1159/000424464>
- [3] Vonshak A (1997). *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*. 1<sup>st</sup> edition. Taylor and Francis Publishers, London, UK, 140 p.

- [4] Güroy B, Karadal O, Mantoğlu S, Cebeci IO (2017). Effects of different drying methods on C-phycoerythrin content of *Spirulina platensis* powder. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(2): 129-132. doi:10.12714/egejfas.2017.34.2.02
- [5] Kuddus M, Singh P, Thomas G, Al-Hazimi A (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin. *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 742859. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/742859>
- [6] Sekar S, Chandramohan M (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, vol. 20, no. 2, pp. 113–136.
- [7] Xiong J, Liu S, Panac Y, Zhangac B, Chenac XFanac L (2018). Combination of fish oil and ethanol extracts from *Spirulina platensis* inhibits the airway inflammation induced by ovalbumin in mice. *Journal of Functional Foods*, 40, 707-714.
- [8] Gutteridge JMC, Halliwell B (2000) Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000. A Historical Look to the Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x>
- [9] - Boussiba, S., Richmond, A., 1979. Isolation and purification of phycoerythrin from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 120, 155–159.
- [10] - Setyoningrum, T.M. & Azimatun Nur, M.M. (2015). Optimization of C-phycoerythrin production from *S. platensis* cultivated on mixotrophic condition by using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4):603-607. doi:10.1016/j.bcab.2015.09.008
- [11] - Antelo, F.S., Anschau, A., Costa, J.A.V. & Kalil, S.J. (2010). Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5):921-926. doi:10.1590/S0103-50532010000500022
- [12] - Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, DiGiacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell. Biol. Toxicol* 16: 91-98.
- [13] - Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-285.

## Statistical approach to experimental design in the synthesis of polyol ester from fatty acid methyl esters by using lipozyme TL IM catalyst

<sup>1</sup>Bahar Gürkaya Kutluk, Togayhan Kutluk, Başar Uyar, \*Nurcan Kapucu

Kocaeli University, Department of Chemical Engineering, Kocaeli, Turkey

\* Corresponding author e-mail: nurcan.kapucu@kocaeli.edu.tr

### Abstract

Recently, the synthesis of biolubricants has been the focus of attention of researchers due to their good lubricating properties. Biolubricants are an alternative to mineral-based oils and other synthetic-based lubricants with low toxicity, high viscosity index and fast biodegradability. It is also advantageous that they are environmentally friendly. In this study, the parameters affecting the transesterification reaction between edible waste oil methyl esters (WOME) and trimethylolpropane (TMP) by using Response surface methodology (RSM) have been statistically analyzed and optimized for high polyol ester conversion. Different levels were determined by selecting the reaction parameters, temperature (35-55 °C), amount of catalyst (0-10% by weight), WOME / TMP molar ratio (6: 1-3: 1) and reaction time (0-96 hours). and the design model is defined. The reactions were carried out in an agitated incubator at a speed of 500 rpm in 25 ml open flasks. The highest ester (86%) conversion was determined as a result of the model and 89% ester conversion was obtained in the validation test. It is also expected that the triester content of the polyol esters obtained will be high. In the presence of Lipozyme TL IM, only 89% of the TMP diester was obtained for this reaction. The reaction time and the amount of the enzyme are the most important factors affecting the total ester conversion.

**Keywords:** biodiesel, biolubricant, lipase, response surface methodology, trimethylolpropane ester

### INTRODUCTION

The lubricants primarily form a thin film layer which provides slipperiness between the surfaces to prevent such friction, wear and energy loss. The secondary task is preventing corrosion on the metal surfaces that may occur over time (1-2). During the use of lubricants in environmentally sensitive areas (water-related sectors, municipal activities, mountaineering, forestry and agricultural sector), accidents and leaks cause oil losses which amount to around 50%. Due to the toxic properties of lubricants, the damage to the environment is very high. They can also stay in nature for many years without degradation. In order to protect the environment especially from the pollution caused by mineral-based lubricants and hydraulic oils, it is necessary to reduce the losses that can occur during use as much as possible and make the oil to be reusable (2). The interest in biolubricants is an ever-expanding volume of the market worldwide, but also because of the limited availability of fossil resources. Natural oils and environmentally friendly products make these materials more valuable. Due to the fact that they are cheaper, renewable, respectful to nature and are biodegradable compared to hydrocarbon based synthetic lubricants, there has been an increase in the use of biolubricants in recent years. Synthetic lubricants are approximately eight times more expensive than mineral oils. Vegetable oils have half the cost of synthetic oils, but low yield point and rapid degradation is a disadvantage. As of 2014, the lubricant market in the world has been announced as 36 million tons and it is projected to be 43,87 million tons in 2022 with an annual growth rate of 2,4% (3). Governments are putting pressure on and imposing sanctions on the users who use the oils they use (4). For example, in Germany, Austria and Switzerland, the use of mineral oil in marine and forest areas is prohibited by law. In addition, the German government has established a mechanism for the reimbursement of the costs of using lubricants containing more than 50% renewable base oils instead of mineral oils with the m Market Research Program of Biofuels and Biolubricants (MIP). This program, carried out by the German Renewable Resources Agency, has been an important success especially for hydraulic fluids (5).

Several significant and comparable studies have been reported in literature about optimizing reaction parameters to produce biolubricants. But limited studies have been reported via enzymatic synthesis of TMP esters (6). Optimization of parameters were provided by using RSM for transesterification reaction between palm oil methyl ester and pentaerythritol (PE). Sodium methoxide catalyzed temperature, catalyst amount, methyl ester / PE molar ratio and reaction time parameters were investigated and tetraester yield was examined. Borritada and Goud, hydrogen peroxide catalyzed reactions C = C and hydrogen peroxide molar ratio, catalyst amount, reaction temperature and time parameters for the central composite design (CCD) optimization has

been studied, the model has been given the ANOVA control. Design Expert Software 8.0.7.1 Trial Version is used in this study. The products were analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR to determine the epoxy structure (7). Therefore in this research paper, the transesterification reaction parameters were optimized and investigated by using response surface methodology (RSM).

## MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

Waste edible oil was collected our local fast food restaurants. trimethylolpropane, methyl heptadecanoate were purchased from Merck (Germany). Lipase catalyst, Novozyme 435 (*Candida Antarctica*), is as a gift from Novozymes (Denmark). All other chemicals used in the experiments are analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (ABD).

### 2.2. Synthesis of waste oil methyl esters

The reaction was implemented that in 500 mL open flasks with the oil/methanol molar ratio of 1/6, initial water content (% substrate, w/w) 1% and 5% *Thermomyces lanuginosus* lipase content with 250 rpm constant shaking for 24h. Methanol was added to the reaction media by three steps.

### 2.3. Optimization design

Optimization of ester conversion has done by using Response Surface Methodology. Four important factors (reaction time, enzyme amount, FAME / TMP mole ratio and temperature) affecting the process were designed with Quadratic Central Composite Design (QCCD). Model summary and design limits clearly shot that table 1. Four important factors affecting the process in the presence of lipase catalyst: temperature, time, amount of enzyme and molar ratio were used as independent variables. When the combined effects are examined, the ester yields are the response (dependent) variable used to develop the empirical model. This is done to determine the best conditions for optimum ester yield. The CCD generally consists of six-centered design, with 2n factorial study and 2 (n) axial condition, where n is the number of factors.

**Table 1** Design coded and actual levels of variables

Name	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.
A Lipase (wt%)	0.000	10.00	-1.000	1.000	5.000	3.873
B Time (h)	0.000	96.00	-1.000	1.000	48.000	37.181
C Temperature (°C)	35.00	55.00	-1.000	1.000	45.000	7.746
D Molar ratio	0.17	0.33	-1.000	1.000	0.250	0.064

### 2.4. Statistical analysis

In order to analyze the effects of the variables to optimize the process, Central Composite Design (CCD) was used with the response surface method in the Design Expert 7.0.0 (State Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) package program. This method is suitable for the phasing of a second-order surface and assists in optimizing the effective parameters with a minimum number of experiments, as well as helping to analyze the interaction between the variables.

### 2.5. Biodiesel analysis by gas chromatography

The amount of Fame (biodiesel) in the mixture after the reaction was determined by an Agilent 7820 GC analysis system equipped with a flame ionization detector (FID) and a 30m x 320µm x 0.25µm capillary column (CARBOWAX 20M). The system was calibrated using the internal standard methyl heptadecanoate according to EN 14103(8).

## 3. Results and discussion

A design for transesterification reaction of synthesis biolubricant with five levels and four factors were selected. For the generated model, Table 2 shows the lack of fit test values. Finally, a forecasted response model equation for the composition of biolubricant (in term of original factors) has been shown below, with the observance of the second-degree polynomial model:



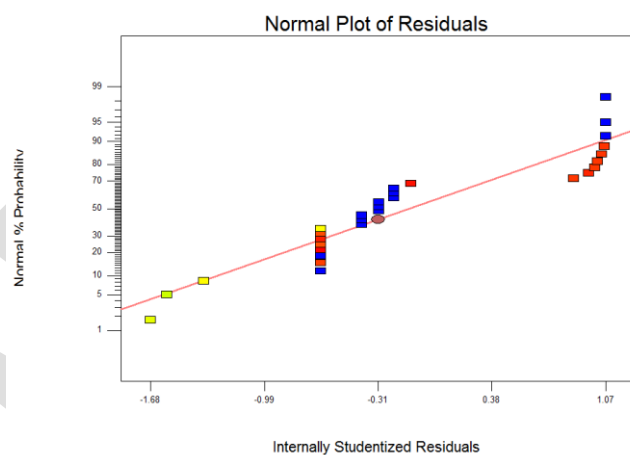
$$Y = +94.23 + 27.50A + 27.54B + 0.40C + 0.25D + 24.75AB + 0.12AC + 0.14AD + 0.12BC + 0.14BD - 0.044CD - 41.54A^2 - 41.25B^2 + 5.80C^2 + 7.11D^2$$

**Table 2** Lack of fit test of the model

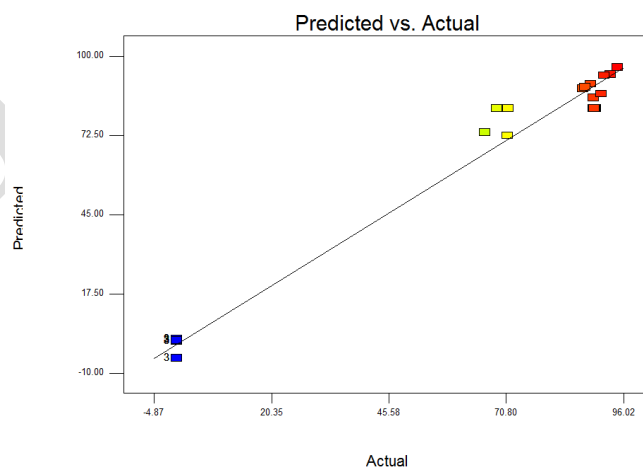
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-value prob>F
Linear	34056.26	20	1702.81	16.32	0.0029
2FI	26615.17	14	1901.08	18.22	0.0024
<b>Quadratic</b>	<b>2552.24</b>	<b>10</b>	<b>255.22</b>	<b>2.45</b>	<b>0.1678</b>
Cubic	56.82	2	28.41	0.27	0.7723
Pure Error	521.75	5	104.35		

The nominal probability value ( $P < 0.0001$ ) and high F-value ( $F_{\text{model}} = 45.96$ ) presented a high significance of the embedded model. The F value implies that the model is important; this shows that the model is considerably less than  $p < 0.0001$  (9). The higher the F values, the lower the p values are the suitability of the model. Signal/ noise is required to have greater than 4. This rate for the model is 15,60.

Fig. 1 has clearly shows that the plot of the normal probability of the residual. The straight lines promote the normality of the data. On the other hand Fig 2 shows that plot of predicted versus actual plot. The corrected coefficient of determination ( $R^2$ ) pointed to the favour of the model while the significance of all of the coefficients as shown by the individual P-value. ( $R^2$ ) of the model is 0.9654.



**Fig.1** Normal probability plot of residuals



**Fig.2** Predicted versus actual plot of the model

For Lipozyme TL IM; the highest ester conversion (86%) was achieved when the enzyme mixture was 5% and the reaction time was 48 hours. With the increase in the reaction time, it does not appear to have a significant effect on ester conversion. When the relationship between the amount of enzyme and the molar ratio (Fig.3) were examined, the maximum ester conversion was obtained with the increase of both. The TMP :WOME mole ratio is 1:3 and the enzyme content is 5%. When the relationship between the reaction temperature and the amount of enzyme (Fig. 4) was examined, the increase in the amount of enzyme decreased and the conversion was decreased after the increase.

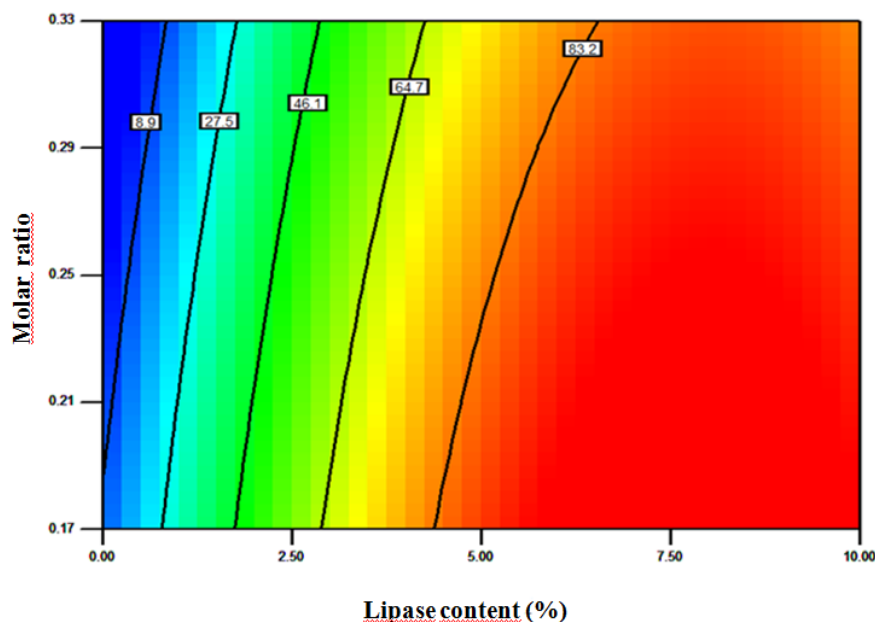


Fig.3. 2D graph of relationship between the amount of enzyme and the molar ratio

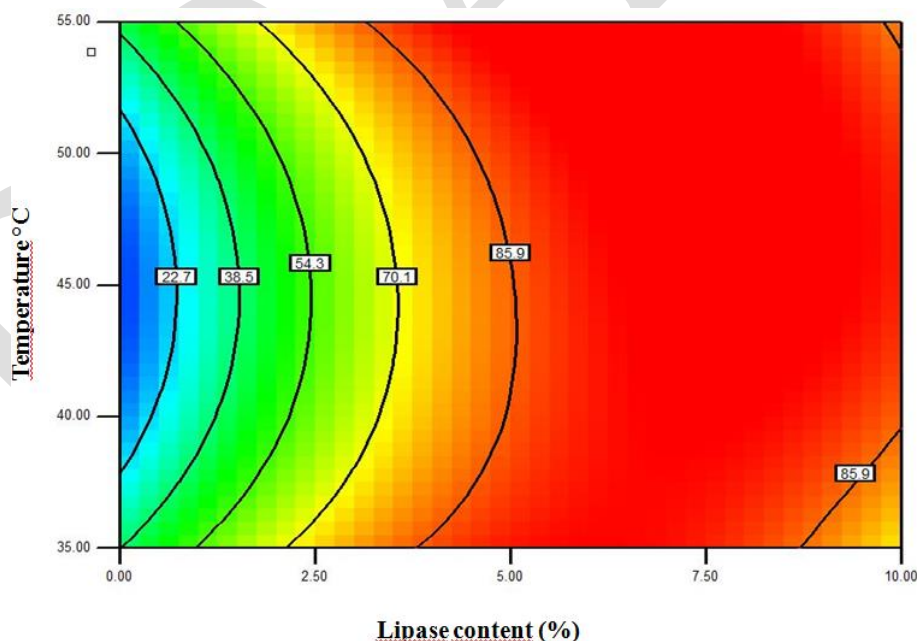


Fig.4. 2D graph of relationship between the amount of enzyme and the reaction temperature

## CONCLUSION

The transesterification reaction between waste edible oil methyl ester and TMP was successfully optimized by response surface methodology. The optimum reaction conditions were determined to be the temperature at 35°C; the amount of catalyst, 5 wt%; molar ratio (TMP:WOME), 3:1 and 48 h of reaction time. The actual

yield of ester conversion was 86 % but the predicted yield was 89 %. In addition, only 89% of the TMP diester was obtained for this reaction. It is predicted that the tri ester content may be increased by the reaction time.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This study financially supported by Tübitak (Project No: 217M525) and the authors thank to Novo Nordisk for presenting Novozyme 435 and Lipozyme TL IM.

#### REFERENCES

1. Carlsson, A.S. "Production of wax esters in *crambe*", Outputs from the EPOBIO Project, "EPOBIO: Realising the Economic Potential of Sustainable Resources – Bioproducts from Non-food Crops", November 2006, CNAP, University of York
2. Salimon J., Salih N., Yousif E., Review Article-Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits, European Journal of Lipid Science Technology, 2010, 112, 519–53
3. Gunam-Resul M. F. M., Ghazi T. I. M., Idris A., Kinetic study of jatropha biolubricant from transesterification of Jatropha curcas oil with trimethylolpropane: Effects of temperature, Industrial Crops and Products, 2009, 38, 87– 92.
4. Nagendramma, P., Kaul, S., "Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview", Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012,16, 764– 774.
5. Bremmer, B. J., Plonsker, L., "Bio-Based Lubricants-A Market Opportunity Study Update", United Soybean Board, 2008,1-21,
6. Aziz N. A.M., Yunus R., Rashid U., Syam A.M., Application of Response Surface Methodology (RSM) for optimizing the palm-based pentaerythritol ester synthesis, Industrial Crops and Products, 2014, 305–312.
7. Borugadda V.B., Goud V.V., Response surface methodology for optimization of bio-lubricant basestock synthesis from high free fatty acids castor oil, Energy Science & Engineering, 2015, 371– 383.
8. David F, Sandra P, Vickers AK (2005) Column selection for the analysis of fatty acids methyl esters. Application Agilent Technologies Inc
9. Kumar T., Kumar S., Kumar S., Adsorption of resorcinol and catechol on granular activated carbon: equilibrium and kinetics, Pergamon Carbon,41,2003, 3015–3025.

## ***Ocimum basilicum* L. (Fesleğen) kallus kültürlerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi**

Aykut TOPDEMİR<sup>\*1</sup>, Abayhan BURAN<sup>1</sup>, Nazmi GÜR<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu Yazar e-mail: [atopdemir@firat.edu.tr](mailto:atopdemir@firat.edu.tr)

### **Özet**

Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) baharat ve ilaç olarak kullanılan tek yıllık aromatik ve hoş kokulu bir bitkidir. Ürettiği sekonder metabolitler bakımından değerli bir bitki olan bu bitkinin farklı bitki büyüme düzenleyicileriyle yetiştirilen kalluslarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesinin amaçlandığı bu araştırmada kallus geliştirme ortamı olarak Murashige Skoog besiyeri kullanılmıştır. Kalluslarının üretiminde beş farklı bitki büyüme düzenleyicisinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonları kullanılmıştır (NAA, 2,4-D, BAP, IBA ve KIN). İklim odasında kontrollü şartlar altında geliştirilen kallusların etanol ekstratlarının antioksidan madde miktarının 2.826±0.141 – 5.736±0.201 mmol/g TEAC arasında olduğu, metanol ekstratlarının antioksidan madde miktarının ise 1.050±0.211 – 4.180±0.394 mmol/g TEAC arasında olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Ocimum basilicum* L., kallus, antioksidan

### **Determination of antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. (Basil) callus cultures**

#### **Abstract**

Basil (*Ocimum basilicum* L.) is an annual aromatic and fragrant plant used as spice and medicine. In this study, it is aimed to determine the antioxidant capacity of this plant, which is a valuable plant in terms of secondary metabolites, which are grown with different plant growth regulators, and Murashige Skoog medium was used as callus development medium. Different combinations and concentrations of five different plant growth regulators were used in the production of callus (NAA, 2,4-D, BAP, IBA and KIN). It was determined that the amount of antioxidant substance of the ethanol extracts of the callus developed under controlled conditions in the climate room was between 2.826 ± 0.141 - 5.736 ± 0.201 mmol / g TEAC, while the amount of antioxidant substance in the methanol extracts was between 1.050 ± 0.211 - 4.180 ± 0.394 mmol / g TEAC.

**Keywords:** *Ocimum basilicum* L., callus, antioxidant

#### **GİRİŞ**

Dünya ticaretinde de “Basil” adı ile bilinen fesleğenin eski Yunancada kral anlamına gelen “Basilicos” ismi ile kullanılmakta olduğu belirtilmektedir (Lawrence ve ark., 1980). Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) baharat ve ilaç olarak kullanılan tek yıllık aromatik ve hoş kokulu bir bitkidir. İran, Güney Asya ve özellikle Hindistan kökenli olan fesleğen ılıman ve sıcak iklimlerde doğal olarak yetişmektedir. Aynı zamanda *O. basilicum* L. bitkisinin Avrupa’da Fransa, İtalya ve İspanya’da kültürü yapılmaktadır (Akgül, 1993; Özcan ve Chalchat, 2002).

Tıbbi ve aromatik bitkiler; beslenme, sağlığı sürdürme ve koruma, hastalıkları önleme ve tedavi etme, güzel koku, tat ve çeşni sağlama amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 20.000 bitkinin tıbbi amaçlı kullanıldığı ve yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel droglarla gidermeye çalıştıkları bildirilmektedir. Diğer yandan ülkemizde, zengin bitki çeşitliliği içinden yaklaşık 1.000 kadar bitki türünün tedavi amaçlı olarak kullanıldığı ve ticaretinin yapıldığı ifade edilmiştir (Özgen, 2014).

Fesleğen bitkisinin içinde barındırdığı faydalı özellikler ve kullanım alanlarındaki ihtiyaçlar göz önüne alındığında daha geniş alanlarda tarımının yapılması gerekliliği karşımıza çıkmaktadır. Fesleğen tohumunun çok küçük oluşu makinalı hassas ekime olanak tanımamakta ayrıca fide yetiştirme zorlukları nedeniyle de ülkemizde fesleğen üretiminin yeteri kadar yapılamadığı bilinmektedir (Karakuzu ve ark., 2015).

#### **Fesleğen Bitkisi Hakkında**

Fesleğende esansiyel yağ oranı % 1-3 arasında değişmektedir (Akgül, 1993). Esansiyel yağ % 0,3-1,0 yaklaşık verim ile su buharı damıtması yapılarak sarımsak renkte bir akışkan olarak elde edilir ve başlıca bileşenleri; linalol, metil kavikol, öjenol, limonen, cis-osimen, geraniol, sitronellol, 1,8-sineol, terpineol asetat ve kafur içermektedir. *O. basilicum*’un İran’da yapılan kültüründe bitkinin yapraklarındaki uçucu yağında, metil kavikol, geraniol, neral ve karyofillen asit analiz edildiği bildirilmiştir (Sajjadi, 2006).

*O. basilicum* L. (Fesleğen) bitkisinin taksonomik olarak sınıflandırılması aşağıdaki Tablo 1.'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde Fesleğen bitkisi, ballıbabagiller (*Lamiaceae*) familyasından tek yıllık ve ılıman iklim bölgelerinde görülen bir bitki türüdür.

**Tablo 6.** Fesleğenin taksonomik sınıflandırılması

<b>Alem</b>	Plantae (Bitkiler)
<b>Bölüm (Division)</b>	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
<b>Sınıf (Class)</b>	Magnaliopsida (Çift Çenekliler)
<b>Alt Sınıf (Sub-class)</b>	Asteridae
<b>Takım (Order)</b>	Lamiales
<b>Familiya (Family)</b>	Lamiaceae (Ballıbabagiller)
<b>Cins (Genus)</b>	<i>Ocimum</i>
<b>Tür (Species)</b>	<i>Ocimum basilicum</i>

Fesleğenin fonksiyonel özellikleri şunlardır:

- Mide ağrılarını bastırır, sindirime yardımcı olur.
- İdrar ve balgam söktürücü olarak kullanılabilir.
- Uyarıcı ve spazm çözücüdür (Akgül, 1993).
- Baş ağrısını kesmek için kullanılır.
- Öksürüğü kesmek için de kullanılabilir (Katzung, 1995).
- Sinirlerin güçlenmesinde rol oynar.
- Bitki, bedeni güçlendiren tonik etkisi de yapar.
- Bir antiseptik görevi görerek bağırsakların çalışmalarını düzene sokar.
- İştah açıcıdır.
- Uykusuzluk durumunda direnç kazandırır.
- Adet döneminde duyulan ağrıların giderimine yardımcı olur (Kayaalp, 2001).

### Antioksidanlar

Antioksidanlar, gıdada veya vücutta çok düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, vücutta dejeneratif hastalıkların başlatılması ve çoğaltılması veya gıda kalitesinin bozulmasına neden olan oksidatif süreçleri geciktiren, kontrol eden veya önleyen maddelerdir. Antioksidanlar, sağlıklı bölgelerde vücudu oksidatif hasara karşı koruyabilme yetenekleri sayesinde hastalık riskini azaltma ve sağlık desteklerinde kullanılırlar. Bu tanıma uyan antioksidanlar, serbest radikal süpürücüler, singlet (tekli) oksijen sönmleyiciler, peroksit inaktivatörleri, metal iyonu kenetleme maddeleri, sekonder oksidasyon ürünlerinin sönmleyicileri ve prooksidatif enzimlerin önleyicileridir (Shahidi ve Zhong, 2007).

Bir antioksidanın kimyasal yapısı, serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine (ROS) dolayısıyla antioksidan aktiviteye karşı esas reaktivitesini belirler. Antioksidanların etkinliği, konsantrasyonlarına ve sistemdeki konumlarına (örn., arayüzeydeki dağılım) da bağlıdır (Shahidi ve Zhong, 2011; Zhong ve Shahidi, 2012).

Antioksidanlar oksidanlar üzerinde dört yolla etki ederler (Gökpinar ve ark., 2006).

- a.** Süpürücü etki (Scavenging): Oksidanları zayıf bir moleküle çevirir ve böylece onların etkilerini kaybetmelerini sağlar. Antioksidan enzimler ve moleküller bu şekildedir.
- b.** Sönmleyici etki (Quenching): Oksidanlara bir hidrojen vererek etkisiz hale gelmesini sağlayan bu etki flavonoidler ve vitaminlerde görülmektedir.
- c.** Onarıcı etki (Repair): Hasar görmüş molekülün tamiri ve yenilenmesini sağlar.
- d.** Zincir kırma etkisi (Chain breaking): Oksidanları kendileri bağlayarak aktivelilerini engelleyen hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller bu şekilde etki ederler.

Genellikle butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) ve *tert*-butilhidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar yıllardır gıda muhafazasında kullanılmıştır. Bununla birlikte tüketicilerin tüm doğal maddelerde temiz etiket talebi nedeniyle bu antioksidanlar gözden düşmüştür. (Sherwin, 1990; Wattenberg, 1986).

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada *O. basilicum* L. bitkisinin tohumlarından saksıda yetiştirilip elde edilen fesleğen fideleri kullanılmıştır. Fidelerden kültüre alınacak bitki kısımları, kültüre alınacakları gün yıpratılmadan toplanmıştır.

### Kullanılan Malzemeler ve Laboratuvar Cihazları

UV-VIS Spektrofotometre: Shimadzu, UV-1800  
Hassas terazi: Shimadzu TXB622L  
pHmetre: Thermo Scientific Orion Star A111  
Otoklav: JeioTech ST-85G  
Sterilizatör: Jeo tech., ON-21E  
Laminar kabin (Laminarflow): Thermo Scientific S2020 1.2  
Blender: Spice&Herb Grinder, IC-10B  
Otomatik pipetler: Brand Transferpette S,100-1000 µl  
Manyetik karıştırıcı: Isolab MS-010  
Buzdolabı: Hotpoint, Ariston, A+ Class  
Murashige ve Skoog (MS): Caisson Biochemie  
Sükroz: Carlo Erba  
Agar: Lab M  
Etil alkol %96: Merck  
Metanol: Sigma-Aldrich  
2,4-Diklorofenoksi asit (2,4-D): Duchefa  
Indol Butyric Asit (IBA): Merck  
Benzil Amino Pürin (BAP): Carl Roth  
Kinetin (KIN): Caisson Biochemie  
ABTS %98-HPLC: AFG Scientific  
Trolox %97: Acros Organics  
Dipotasyumhidrojenfosfat ( $K_2HPO_4$ ): Merck  
Potasyumdihidrojenfosfat ( $KH_2PO_4$ ): Merck

### Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tampon çözeltisi (50 mmol/L): Çözelti için 3.57 g dipotasyumhidrojenfosfat ( $K_2HPO_4$ ) ve 0.615 g potasyumdihidrojenfosfat ( $KH_2PO_4$ ) katı kimyasalı tartılarak 500 ml'lik balon jöjelerde saf suyla hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin pH değeri 7.2-7.4 arası değerlerde sabitlenene kadar karıştırılmıştır.

7 mM ABTS stok çözeltisi: Çözelti için 77 mg ABTS kimyasalı üzerine 20 ml fosfat tampon çözeltisi eklenmiş çözünene kadar karıştırılmıştır. Farklı bir beherde 13 mg potasyum persülfat ve 20 ml fosfat tamponu çözeltisi birleştirilmiş ve karıştırıcı yardımıyla çözünmüştür. Bu iki çözelti karıştırılmış ve folyo kaplı erlene aktarılmıştır. Karışım daha sonra oda sıcaklığında en az 16 saat koyu mavi renk oluşana kadar bekletilmiştir.

Troloks stok çözeltisi (2.5 mmol/L): Çözelti için 32 mg troloks katı kimyasalı tartılarak bir beherde çözünmesi için üzerine birkaç damla etil alkol eklenmiştir. Çözünen bu çözelti 50 ml'lik ölçülü balona aktarılmış ve fosfat tamponu ile balon çizgisine kadar tamamlanmıştır.

Çalışmada kullanılan *O. basilicum* L. fidelerinden elde edilen yaprak ve gövde parçaları steril bir bisturiyle alındıktan sonra ilk olarak musluk suyuyla yıkanmıştır. Kültüre alınmadan önce bitki kısımları 30 saniye %70'lik etil alkolde bekletilmiştir. Bekletilirken yavaşça karıştırma uygulanmıştır. Etil alkolden süzülen bitki eksplantları alkollenerek kabin içerisine alınmıştır. 5 dakika da %50 oranda saf su ile seyreltilmiş sodyum hipokloritte ( $NaClO$ ) bekletilmiştir.

Çalışmada bitki doku kültürü için neredeyse bütün çalışmalarda görülmesi mümkün olan ve temel besi ortamı ihtiyaçlarını karşılayan MS besi yeri kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). Yapılan çalışmada, MS besi ortamında Naftalin Asetik Asit (NAA), 2,4 Dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D), Benzil amino pürin (BAP), İndol Bütirik Asit (IBA) ve Kinetin (KIN) bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanılmıştır. Bu kombinasyonların her BBD için katılım miktarları Tablo 2.'de ve Tablo 3.'te verilmiştir.

**Tablo 2.** Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları-1 (BAP)

Besi yeri ortamı	2,4-D(mg/L)	IBA(mg/L)	BAP(mg/L)	NAA(mg/L)	KIN(mg/L)
0,5B-0,25N	-	-	0.5	0.25	-
0,5B-0,5N	-	-	0.5	0.5	-
0,5B-1N	-	-	0.5	1	-
0,5B-2N	-	-	0.5	2	-
0,5B-0,25D	0.25	-	0.5	-	-
0,5B-0,5D	0.5	-	0.5	-	-
0,5B-1D	1	-	0.5	-	-
0,5B-2D	2	-	0.5	-	-
0,5B-0,25 I	-	0.25	0.5	-	-
0,5B-0,5 I	-	0.5	0.5	-	-
0,5B-1 I	-	1	0.5	-	-
0,5B-2 I	-	2	0.5	-	-

**Tablo 3.** Kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonları-2 (KIN)

Besi yeri ortamı	2,4-D(mg/L)	IBA(mg/L)	BAP(mg/L)	NAA(mg/L)	KIN(mg/L)
0,5K-0,25N	-	-	-	0.25	0.5
0,5K-0,5N	-	-	-	0.5	0.5
0,5K-1N	-	-	-	1	0.5
0,5K-2N	-	-	-	2	0.5
0,5K-0,25D	0.25	-	-	-	0.5
0,5K-0,5D	0.5	-	-	-	0.5
0,5K-1D	1	-	-	-	0.5
0,5K-2D	2	-	-	-	0.5
0,5K-0,25 I	-	0.25	-	-	0.5
0,5K-0,5 I	-	0.5	-	-	0.5
0,5K-1 I	-	1	-	-	0.5
0,5K-2 I	-	2	-	-	0.5

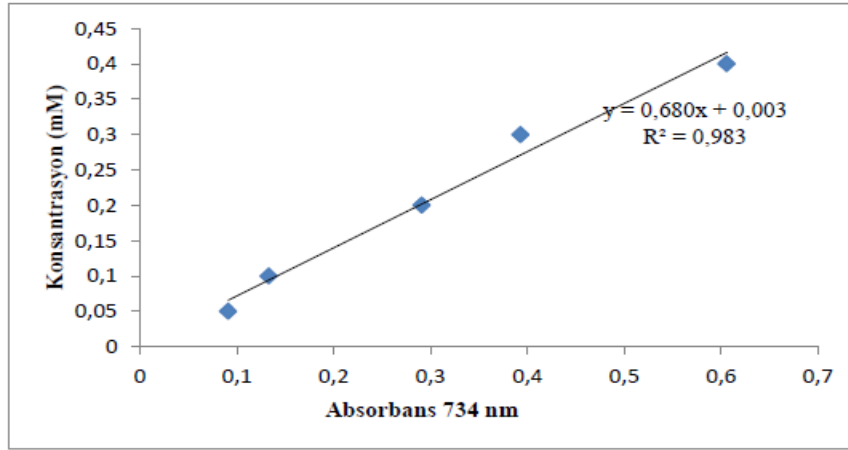
Besi ortamı hazırlanırken içerik için 4.4 g/L MS - 30 g/L sükröz oranında tartılıp, karıştırıldıktan sonra çalkalayıcı ile çözünmesi sağlanmıştır. Besi ortamı çözüldükten sonra pH değeri 5.7-5.8 aralığına getirilmiş ve katılaştırma için 8 g/L katılaştırıcı jel (Agar) ilave edilmiştir. Farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları ekleneceği için karıştırmamak amacıyla besiyerlerine kodlama işlemi uygulanmıştır.

Besiyerleri sterilizasyondan işleminden sonra steril kabinde ekim yapılacak olan toplam 144 petriye, her petri için 30 ml besiyeri aktarılacak şekilde eklenmiştir. Besiyerleri aktarılan petriyer streç film ile sarılarak katılma ve kontaminasyon riskini azaltmak için 24 saat steril kabinde bekletilmiştir. Ekim yapılırken her petri örneğine 3 adet *O. basilicum* L. eksplantı karşılıklı olarak ekilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Antioksidan Kapasite Analizi

*O. basilicum* L. bitkisinden elde edilen kallus ekstraktlarının antioksidan kapasitesini belirleyebilmek için troloks eşdeğer antioksidan kapasite testi yapılmıştır. Okunan absorbans değerleri troloks kalibrasyon eğrisine göre mmol/g TEAC şeklinde ifade edilmiştir. Etanol ve metaol kallus ekstraktlarından okunan değerler kalibrasyon eğrisi grafiğinden (Şekil 1.) elde edilen  $y = 0.680x - 0.003$  denkleminde absorbanslar 'x' yerine yazılarak konsantrasyon sonuçları hesaplanmıştır.



Şekil 1. Troloks kalibrasyon eğrisi grafiği ve denklemi

Tablo 4. Etanol kallus ekstralarının Antioksidan Kapasitesi (mmol/g TEAC)

BBD Kombinasyonları	Antioksidan Kapasite (mmol/g TEAC) Etanol
0,5B-0,25N (Y)	4.145±0.230
0,5B-1N (G)	3.662±0.162
0,5B-1N (Y)	4.084±0.145
0,5B-2N (G)	3.526±0.133
0,5B-2N (Y)	4.404±0.108
0,5B-0,5D (G)	4.384±0.207
0,5B-0,5D (Y)	3.914±0.156
0,5B-1D (G)	2.826±0.141
0,5B-2D (G)	3.302±0.167
0,5B-2D (Y)	4.261±0.105
0,5K-0,25N (Y)	4.349±0.130
0,5K-0,5N (Y)	4.050±0.100
0,5K-1N (G)	4.424±0.141
0,5K-1N (Y)	3.676±0.132
0,5K-2N (G)	4.295±0.096
0,5K-0,25D (Y)	5.607±0.254
0,5K-0,5D (Y)	5.736±0.201
0,5K-1D (G)	5.016±0.263
0,5K-1D (Y)	3.343±0.188
0,5K-2D (Y)	2.853±0.152
0,5K-0,25 I (G)	3.914±0.077



0,5K-1 I (G)	3.717±0.159
0,5K-1 I (Y)	4.186±0.202
0,5K-2 I (G)	4.002±0.091
0,5K-2 I (Y)	4.274±0.128

Aynı şartlarda gelişen yaprak-gövde eksplantlarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde Tablo 4.'e göre genel olarak yaprak eksplantlarından elde edilen antioksidan madde miktarının gövde eksplantlarından elde edilen antioksidan madde miktarlarından daha fazla olduğu ya da iki değer birbirlerine oldukça yakın olduğu saptanmıştır.

Troluks kalibrasyon eğrisine göre *O. basilicum* L. kalluslarının etanol ekstralarının antioksidan madde miktarı 2.826±0.141– 5.736±0.201 mmol/g TEAC arasında olduğu saptanmıştır. Farklı BBD kombinasyonlarıyla geliştirilen kallusların her biri için antioksidan kapasite analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında en yüksek antioksidan madde miktarı etanol ekstraları için 5.736±0.201 mmol/g TEAC olarak 0.5 mg/L KIN – 0.5 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki yaprak eksplantının kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. En düşük antioksidan madde miktarı ise etanol ekstraları için 2.826±0.141 mmol/g TEAC olmak üzere 0.5 mg/L BAP – 1 mg/L 2,4-D bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki gövde eksplantının kallus etanol ekstralarından elde edilmiştir.

Metanol ekstraları ile yapılan antioksidan kapasite analizinin sonuçları Tablo 5.'te verilmiştir.

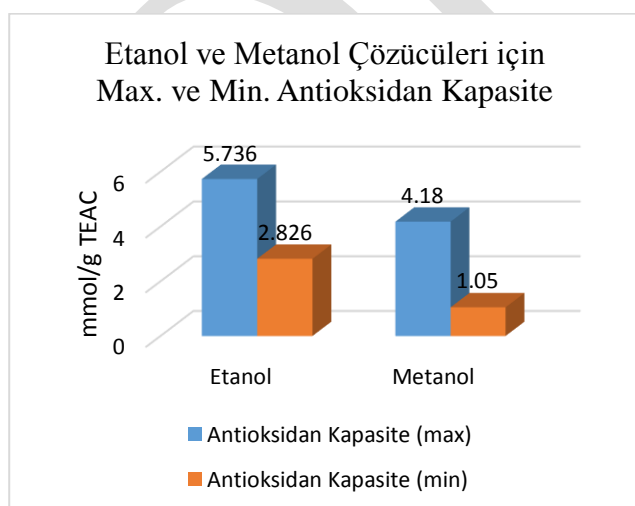
**Tablo 5.** Metanol kallus ekstralarının Antioksidan Kapasitesi (mmol/g TEAC)

BBD Kombinasyonları	Antioksidan Kapasite (mmol/g TEAC) Metanol
0,5B-0,25N (G)	3.057±0.288
0,5B-0,5N (G)	3.227±0.186
0,5B-0,5N (Y)	4.186±0.263
0,5B-1N (G)	3.744±0.146
0,5B-1N (Y)	3.819±0.133
0,5B-2N (G)	3.173±0.107
0,5B-0,25D (G)	3.010±0.088
0,5B-0,25D (Y)	2.459±0.082
0,5B-0,5D (G)	1.942±0.125
0,5B-0,5D (Y)	1.806±0.175
0,5B-1D (Y)	3.683±0.210
0,5B-2D (G)	2.214±0.167
0,5B-2D (Y)	2.085±0.132
0,5B-0,5 I (G)	4.111±0.211
0,5B-0,5 I (Y)	3.448±0.153
0,5B-1 I (Y)	3.785±0.113
0,5B-2 I (G)	1.050±0.211
0,5B-2 I (Y)	1.970±0.095
0,5K-0,25N (G)	1.269±0.101

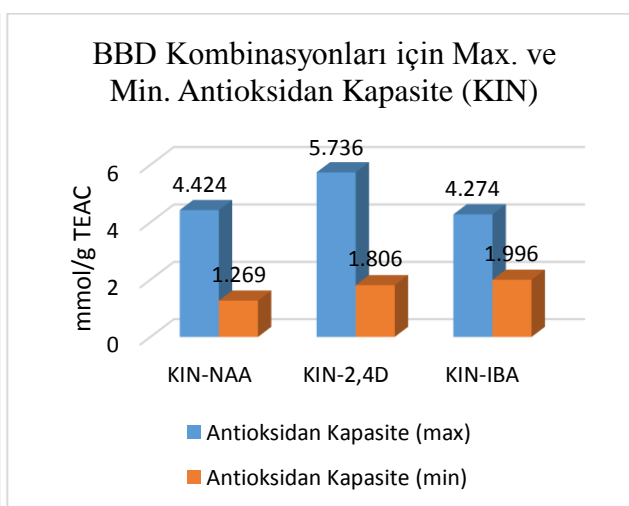
0,5K-0,25N (Y)	1.738±0.79
0,5K-0,5N (G)	1.942±0.81
0,5K-1N (G)	3.118±0.143
0,5K-2N (G)	3.342±0.219
0,5K-2N (Y)	4.180±0.394
0,5K-0,25D (Y)	2.432±0.149
0,5K-0,25D (G)	2.989±0.104
0,5K-0,5D (Y)	2.459±0.096
0,5K-0,5D (G)	2.500±0.130
0,5K-1D (G)	1.792±0.079
0,5K-2D (G)	1.344±0.085
0,5K-2D (Y)	3.472±0.186
0,5K-1 I (G)	1.996±0.109
0,5K-2 I (G)	2.785±0.128

Troluks kalibrasyon eğrisi denklemine göre *O. basilicum* L. kalluslarının metanol ekstrelerinin antioksidan madde miktarı 4.180±0.394–1.050±0.211 mmol/g TEAC arasında olduğu saptanmıştır. Farklı BBD kombinasyonlarıyla geliştirilen kallusların her biri için antioksidan kapasite analizi gerçekleştirilmiştir.

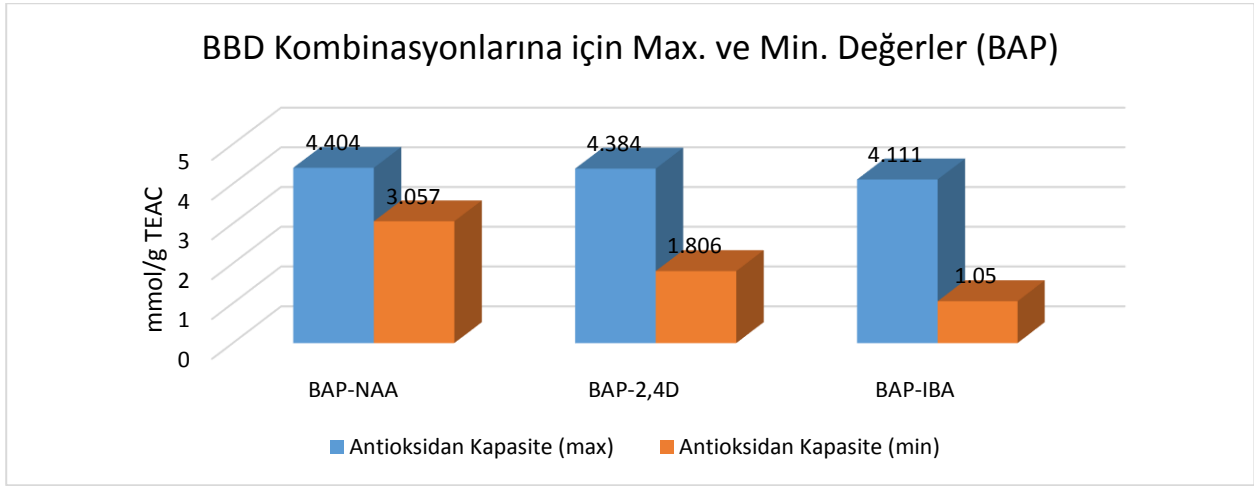
Analiz sonuçlarına göre metanol ekstreleri için toplam antioksidan kapasite miktarları birkaç örneğin bazı değerlerinde benzer sonuçlar görülmesine karşın, genel örneklerde birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında en yüksek antioksidan kapasite miktarı metanol ekstreleri için 4.180±0.394 mmol/g TEAC olarak 0.5 mg/L KIN – 2 mg/L NAA bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki yaprak eksplantının kallus etanol ekstresinden elde edilmiştir. En düşük antioksidan kapasite miktarı ise metanol ekstreleri için 0.341±0.041 mg kuersetin/g olmak üzere 0.5 mg/L BAP – 2 mg/L IBA bitki büyüme düzenleyici kombinasyonundaki gövde eksplantının kallus metanol ekstrelerinden elde edilmiştir.



Şekil 2. Etanol ve Metanol çözücülerini için max.ve min. Antioksidan Kapasite



Şekil 3. BBD kombinasyonları için max. ve min. Antioksidan Kapasite (KIN)



**Şekil 4.** BBD kombinasyonları için max. ve min. Antioksidan Kapasite (KIN)

Sonuçlara göre elde edilen karşılaştırmalı grafikler yukarıda gösterilmiştir. Şekil 2.'de Antioksidan Kapasite için etanol ve metanol çözümleri karşılaştırılmıştır. Etanol çözücüsünde elde edilen max. değerler daha fazla olduğu görülmüştür. Şekil 3. ve Şekil 4.'te ise BBD kombinasyonları için elde edilen max. ve min. Değerler gösterilmiştir. Buna göre yapılan analizde Antioksidan Kapasite için optimum madde miktarına BAP-NAA kombinasyonunda ulaşılmıştır.

## SONUÇ

Yapılan literatür araştırmalarında, *O. basilicum* L. ile elde edilen çalışmalarda daha çok ham bitki (yaprak, yaprak sapı, gövde vb.) üzerine araştırmaların ve çalışmaların yapıldığı gözlenmiştir. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve kombinasyonları ile gelişen bu kallusların kimyasal ortamları birbirinden farklı olduğu için, çalışmalarda yapılan analizlerin sonuçlarında her kallus için farklı değerler elde edilmiştir. Grafiklerden elde edilen değerlere göre Antioksidan Aktivite analizi için optimum madde miktarı BAP-NAA BBD kombinasyonundan saptanmıştır.

Gövde-Yaprak eksplantları kıyaslandığında ise, optimum değerlere yaprak eksplantının Etanol çözeltilerinde ulaşıldığı görülmüştür. Etanol ve metanol çözümleri kıyaslandığında ise, analizler için kullanılacak optimum çözücünün Etanol olduğu görülmüştür. Bitkinin içerdiği bileşenlerin spesifik olarak saptanabilmeleri için bir karakterizasyon işlemi uygulanabilir.

Bitkinin yetiştirildiği ortam kombinasyonları optimize edilip en yüksek değerlerin sağlandığı kombinasyonlar uygulanarak, daha verimli kallus üretimi sağlamak amacıyla farklı ekstraksiyon seçenekleri ve farklı çözümler kullanılarak tıbbi ve ticari çalışmalar yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- Akgül, A., 1993. Baharat bilimi ve teknolojisi. Gıda teknolojisi derneği yayınları. Yayın no:15 Ankara. pp. 451.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S., 2011. Geçmisten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 11(1): 52-67.
- Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y., 2006. Algal Antioksidanlar, *Su Ürünleri Dergisi*, 23, 85-89.
- Karakuzu, E., 2015. Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Tohumunun Ekim Olanakları, *Yüksek lisans tezi*, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Katzung B.G., 1995. Temel ve Klinik Farmakoloji. (Çeviren: Z. Özuner). Melisa Matbaası, İstanbul, Türkiye, pp. 1387.
- Kayaalp, S.O., 2001. (Editör): TİK-5 Türkiye İlaç Kılavuzu Formülleri (TIK-5 Turkish Drug Guide 2007 Formulary), Turgut Yayıncılık, İstanbul, 2007.
- Lawrence, B. M., Powell, R. H., Peele, D. M. 1980. Variation in the Genus *Ocimum*. 9th International Essential Oil Congress, pp.34. Cannes.

- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473-497.
- Özcan, M. and Chalchat, J.C., 2002. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* and *O. minimum* in Turkey. *Czech. J. Food. Sci.* 20 (6): pp. 223-228.
- Özgen, Y., 2014. Farklı reyhan (*Ocimum basilicum* L.) hatlarının bazı kimyasal ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara.
- Sajjadi, S.E., 2006. Analysis of the Essential Oils of Two Cultivated Basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *DARU*, 14, pp. 128-130.
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2007. Measurement of antioxidant activity in food and biological systems, *Antioxidant Measurement and Applications*, 956, pp. 36-66.
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2011. Revisiting the polar paradox theory: a critical overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3499-3504.
- Sherwin, E.R., 1990. Antioxidants, in *Food additives*, Eds. Branen, L., Davidson, P.C. & Salminen, S., Marcel Dekker, pp. 139-193. New York.
- Wattenberg, L.W., 1986. Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), pp. 1099-1102.
- Zhong, Y. and Shahidi, F., 2011. Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), pp. 4-6.

## Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisi kallus kültürlerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarının tespiti

Aykut TOPDEMİR<sup>\*1</sup>, Abayhan BURAN<sup>1</sup>, Nazmi GÜR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu Yazar e-mail: [atopdemir@firat.edu.tr](mailto:atopdemir@firat.edu.tr)

### Özet

Anavatanı Hindistan olan ve Ülkemizde fesleğen olarak bilinen *Ocimum basilicum* L. türü, dünyanın önemli uçucu yağ içeren bitkilerinden biri olup, birçok ülkede ticari şekilde ekimi yapılmaktadır. Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Ocimum* türleri fenolik bileşikler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi polifenoller de dahil olmak üzere çeşitli metabolitler içerir. Araştırmamızda farklı bitki büyüme düzenleyiciler (Naftalin Asetik Asit, 2,4 Dichloro phenoxyacetic acid, Benzil amino pürin, İndol Bütirik Asit ve Kinetin) farklı konsantrasyon ve kombinasyonları kullanılarak kontrollü şartlarda in vitro olarak üretilen kallusların etanolik ve metanolik ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid miktarını tespit etmek amaçlanmıştır. Kalluslarının etanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarının  $1.044 \pm 0.188 - 0.417 \pm 0.049$  mg GAE/g arasında olduğu, metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarının ise  $2.547 \pm 0.110 - 0.701 \pm 0.095$  mg GAE/g arasında olduğu saptanmıştır. Flavonoid madde tayini için; etanol ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarının  $2.058 \pm 0.122 - 0.446 \pm 0.063$  mg kuersetin/g arasında olduğu, metanol ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarının ise  $3.010 \pm 0.336 - 0.341 \pm 0.041$  mg kuersetin/g arasında olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Ocimum basilicum* L., Kallus, Fenolik, Flavonoid

### Determination of total phenolic and flavonoid content of callus cultures of Basil (*Ocimum basilicum* L.)

#### Abstract

*Ocimum basilicum* L., the motherland of India and known as basil in our country, is one of the most important essential oil containing plants in the world and is cultivated commercially in many countries. *Ocimum* species, a member of the Lamiaceae family, contain a variety of metabolites including polyphenols such as phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins. In our study, to determine the total phenolic and flavonoid amounts of ethenolic and methanolic extracts of calluses produced in vitro under controlled conditions using different plant growth regulators (Naphthalene Acetic Acid, 2,4 Dichloro phenoxyacetic acid, Benzyl amino purine, Indole Butyric Acid and Kinetin). intended. The total phenolic content of ethanol extracts of calluses was found to be between  $1.044 \pm 0.188 - 0.417 \pm 0.049$  mg GAE / g, while the total phenolic content of methanol extracts was between  $2.547 \pm 0.110 - 0.701 \pm 0.095$  mg GAE / g. For the determination of flavonoid substances; The total flavonoid content of ethanol extracts was found to be between  $2.058 \pm 0.122 - 0.446 \pm 0.063$  mg quercetin / g, while the total flavonoid content of methanol extracts was between  $3.010 \pm 0.336 - 0.341 \pm 0.041$  mg quercetin / g.

### GİRİŞ

Fesleğenlerden elde edilecek olan uçucu yağlar, tıpta mide rahatsızlıklarında, yatıştırıcı, idrar söktürücü, gaz söktürücü, idrar yolları antiseptiği, ağrı dindirici, balgam söktürücü, solucan düşürücü, sakinleştirici, öksürük kesici, ağız ve diş şikayetlerinde, ishal ve kronik dizanteride, solunumla ilgili rahatsızlıklarda ve mantar hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Asımgil, 1996; Baytop, 1999).

Epidemiyolojik çalışmalar, fenolik açıdan zengin yiyecek ve içeceklerin tüketimi ile hastalıkların önlenmesi arasında pozitif ilişki olduğunu göstermektedir (Scalbert ve Williamson 2000). Bu etkiler, flavonoidler ve fenilpropanoidler de dahil olmak üzere bitki fenolikleri gibi antioksidan bileşenlere atfedilmektedir (Rice-Evans vd., 1996).

Basiller (*Ocimum spp.*, Lamiaceae), fenolik bileşikler (Simon vd 1990; Phippen ve Simon, 2000), flavonoidler ve antosiyaninler gibi polifenoller de dahil olmak üzere çeşitli doğal ürünlerden oluşan çok çeşitli esansiyel yağlar içerir. Birçok çalışmada fesleğen ekstraktlarının ve esansiyel yağların antioksidan aktivitesi değerlendirilmektedir (Juliani ve Simon, 2002).

## Fenolik Bileşikler

Bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkası içeren bileşikler grubuna fenolik bileşikler veya polifenoller denir. En az bir aromatik halka ve bu halkada çok miktarda hidroksil substitüenti bulunduran bileşiklerin tümüne fenolik bileşikler denir.

Polifenolik bileşikler, temel maddeleri fenol olan, güneş ışığından faydalanarak bitkilerin yaprak, dal, meyve ve çiçeklerinde oluşan organik bileşiklerdir. Organik çözücülerde daha iyi çözünmekle birlikte, suda daha az çözünmektedirler. Polifenollerin antioksidan özellikleri, indirgeyici ve hidrojen verici olmalarıyla ilgilidir (Bursal, 2009). Fenolik bileşikler birçok bitki organında bulunur ve bu nedenle insan beslenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır. Çeşitli çalışmalar, fenoliklerin antioksidatif etkiler ortaya koyduğunu, in vitro sistemlerde DNA oksidasyon inhibisyonu ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolden sorumlu olduğunu göstermiştir (Adom ve Liu, 2002; Chandrasekara ve Shahidi, 2010; Liyana-Pathirana vd., 2006; Madhujith ve Shahidi, 2007).

Fenolik asitlerin iki türü olan hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asitler bitkilerde bulunur. Hidroksibenzoik asitler gallik, *p*-hidroksibenzoik, vanilik, şiringik ve protokateşik asitlerdir. Hidroksisinnamik asitler, kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerdir. Bir fenil halkası (C6) ve bir C3 yan zincirine bileşik hidroksisinnamik asitler, diğer fenolik bileşiklerin sentezi için öncü olarak görev yapmaktadırlar (Shahidi ve Naczki, 2003).

## Flavonoidler

Flavonoidler C6–C3–C6 difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır (flavan halkası). Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır.

Flavonoidler fenolik bileşikler içerisinde en önemli grubu oluşturan flavan (2- fenolbenzo-dihidro-piran) türevleridir.

Sarı renkli olmaları sebebiyle Latince “sarı” anlamına gelen “flavus” kelimesinden türetilerek flavonoid ismini almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiran (difenilpropan) yapısına (C6-C3-C6) sahiptirler. Flavonoidlerin iskelet yapıları farklı olmasına rağmen flavonler, flavonoller, flavanonlar, flavanoller, izoflavonlar, antosiyanidinler ve kalkon olarak adlandırılan farklı alt sınıfları vardır (Bors vd., 1990; Ptittin, 1987; Formica ve Regelson, 1995).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle tepkimeye girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizması şöyledir;

1. Serbest radikali ( $O_2^-$ ), hidroksil radikalini ( $\bullet OH$ ) ve singlet oksijeni ( $^1O_2$ ) temizler.
2. Peroksil radikalini ( $ROO\bullet$ ) ve alkoksil radikalını ( $RO\bullet$ ) yakalar, lipid peroksil ( $LOO\bullet$ ) zincirini kırar.
3. Demir ve bakır gibi geçiş metallarını şelatlar (Morel vd., 1993; Moreney vd., 1988).
4. Protein kinaz enzimini inhibe eder.
5. Laktat transportunu engeller (Formica ve Regelson, 1995).

## MATERYAL ve METOT

### Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

2 N’lik Folin-Ciocalteu reaktifi: Stok olarak saklanacak çözeltilerdir. Çalışmalarda çözeltinin 10 kat seyreltilmiş hali kullanılmıştır.

%7.5’lik sodyum karbonat çözeltisi: Çözelti için 7.5 g  $Na_2CO_3$  katı kimyasalı tartılarak 100 ml saf suda çözülmüştür.

1 ml %2’lik  $AlCl_3$  (metanol/glasiyel asetik asit (v/v)) çözeltisi: Çözelti için koruyucu maske kullanılarak 2 g  $AlCl_3$  katı kimyasalı tartılmış, 100 ml’lik eşit oranda karıştırılmış metanol/glasiyel asetik asit (50/50 ml) karışımında çözdürülmüştür.

Gallik asit çözeltisi: Çözelti için 50 mg gallik asit katı kimyasalı tartılıp bir behere konulmuş ve çözünmesi için üzerine bir iki damla etil alkol eklenmiştir. Çözeltinin konsantrasyonun ayarlanması için bu çözelti 100 ml’lik balon jöjeye aktarılmış ve üzeri balon jöjenin çizgisine kadar saf suyla tamamlanmıştır.

Kuersetin çözeltisi: Çözelti için 50 mg kuersetin katı kimyasalı tartılarak 100 ml’lik ölçülü bir balona aktarılmış ve balon çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır.

Çalışmada bitki doku kültürü için neredeyse bütün çalışmalarda görülmesi mümkün olan ve temel besi ortamı ihtiyaçlarını karşılayan MS besi yeri kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962). MS besi ortamı bitkilerin temel olarak ihtiyacı olan makro-mikro besin elementleri yanında su ve vitaminleri de içermektedir.

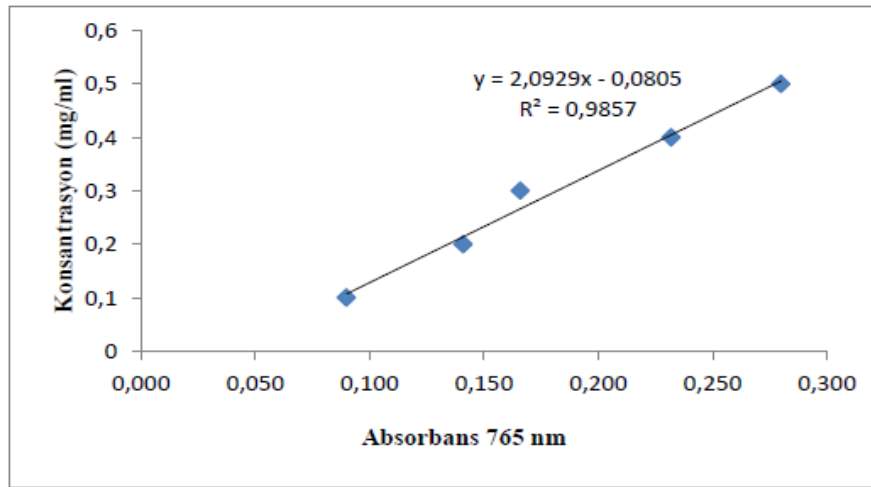
Yapılan çalışmada, MS besi ortamında Naftalin Asetik Asit (NAA), 2,4 Dichloro phenoxycedic acid (2,4-D), Benzil amino pürin (BAP), İndol Bütirik Asit (IBA) ve Kinetin (KIN) bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanılmıştır.

Çalışmada gerçekleştirilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan kapasite tayini için yapılan analizlerde kullanılan her bir kallus ekstresinde, etanol-metanol çözücüler için yapılan ayrı analizlerde ve gövde-yaprak olarak ayrılan eksplantlarda her bir ölçüm için 3 tekrarlı okuma yapılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmış ve bu konsantrasyon değerlerinin standart sapmaları hesaplanarak verilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Toplam Fenolik Madde Analizi

*O. basilicum* L. bitki türünden elde edilen kallus ekstrelerinin toplam fenolik madde içeriği analiz edilmiştir. Okunan absorbans değerleri gallik asit kalibrasyon eğrisine göre mg gallik asit eşdeğer/g şeklinde ifade edilmiştir (mg GAE/g). Gallik asit kalibrasyon eğrisinden (Şekil 1.) elde edilen  $y = 2.092x + 0.080$  denkleminde absorbanslar 'x' yerine yazılarak konsantrasyon sonuçları hesaplanmıştır.



Şekil 1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği ve denklemi

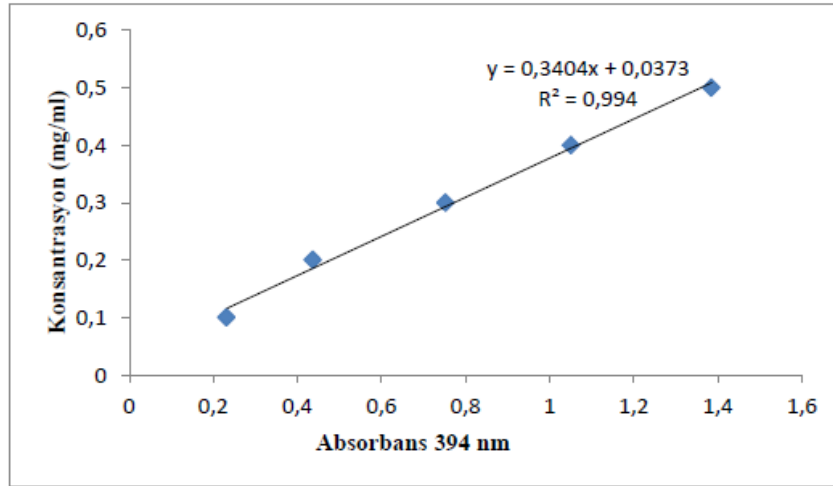
*O. basilicum* L. kallus etanol ekstrelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarına göre toplam fenolik madde miktarları Tablo 1.'de gösterilmiştir.

Gallik asit kalibrasyon eğrisine göre *O. basilicum* L. kalluslarının etanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı  $1.044 \pm 0.188 - 0.417 \pm 0.049$  mg GAE/g arasında olduğu saptanmıştır. Sonuçlara ait tablo EKLER kısmında belirtilmiştir ( Tablo 1.).

Gallik asit kalibrasyon eğrisine göre *O. basilicum* L. kalluslarının metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı  $2.547 \pm 0.110 - 0.701 \pm 0.095$  mg GAE/g arasında olduğu saptanmıştır. Sonuçlara ait tablo EKLER kısmında belirtilmiştir ( Tablo 2.)

### Toplam Flavonoid Madde Analizi

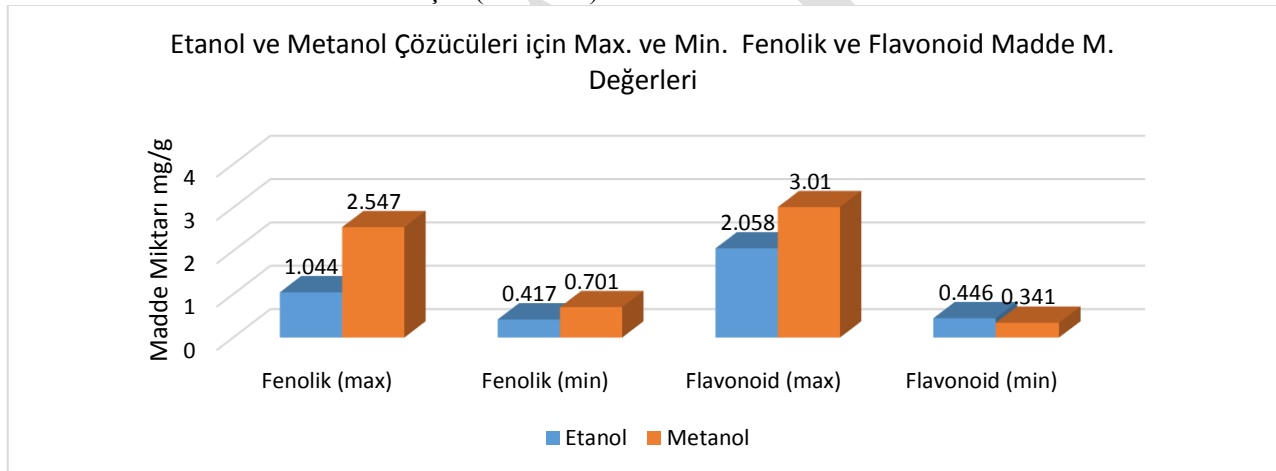
*O. basilicum* L. bitkisinden elde edilen kallus ekstrelerinin toplam flavonoid madde içeriği analiz edilmiştir. Okunan absorbans değerleri kuersetin kalibrasyon eğrisine göre mg kuersetin/g şeklinde ifade edilmiştir. Kuersetin kalibrasyon eğrisi grafiğinden (Şekil 2.) elde edilen  $y = 0.340x - 0.037$  denkleminde absorbanslar 'x' yerine yazılarak konsantrasyon sonuçları hesaplanmıştır.



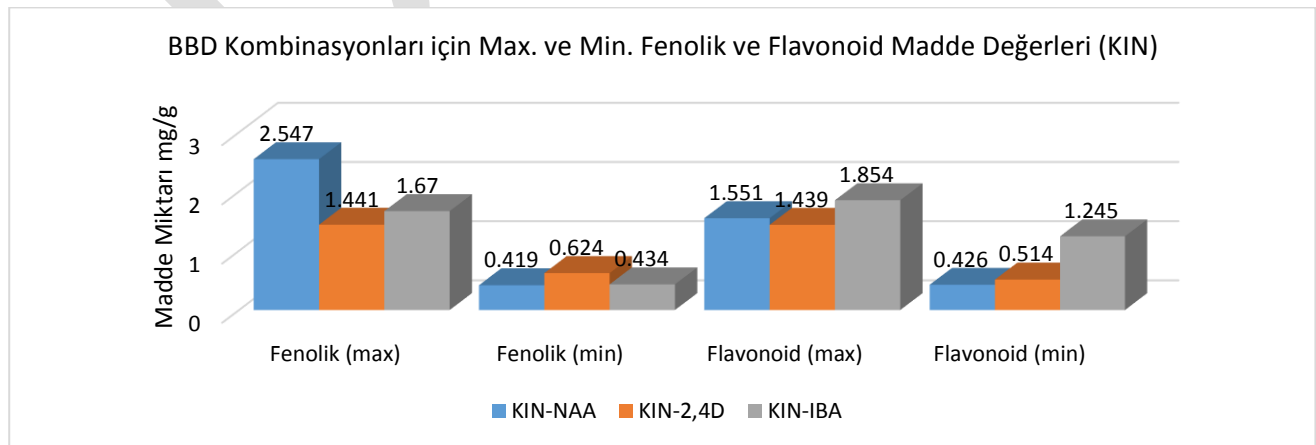
Şekil 2. Kuersetin kalibrasyon eğrisi grafiği ve denklemi

Kuersetin kalibrasyon eğrisine göre *O. basilicum* L. kalluslarının etanol ekstralarının toplam flavonoid madde miktarı  $2.058 \pm 0.122 - 0.446 \pm 0.063$  mg kuersetin/g arasında olduğu saptanmıştır. Sonuçlara ait tablo EKLER kısmında belirtilmiştir ( Tablo 3.).

Kuersetin kalibrasyon eğrisi denklemine göre *O. basilicum* L. kalluslarının metanol ekstralarının toplam flavonoid madde miktarı  $3.010 \pm 0.336 - 0.341 \pm 0.041$  mg kuersetin/g arasında olduğu saptanmıştır. Sonuçlara ait tablo EKLER kısmında belirtilmiştir ( Tablo 4.).

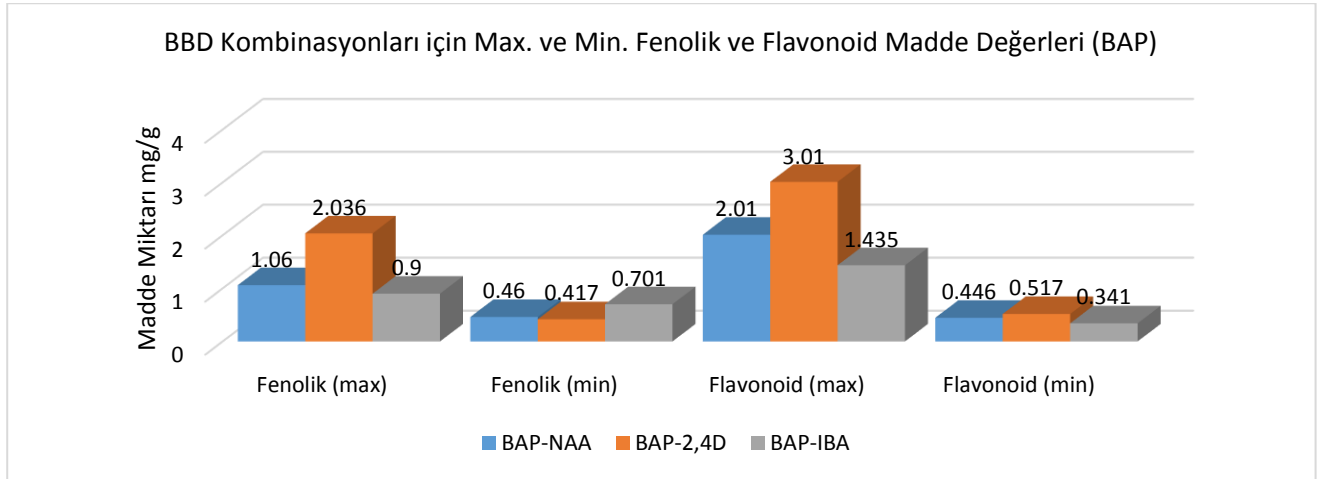


Şekil 3. Etanol ve Metanol Çözücüler için Max. ve Min. Fenolik ve Flavonoid Madde M. Değerleri



Şekil 4. BBD Kombinasyonları için Max. ve Min. Fenolik ve Flavonoid Madde Değerleri (KIN)





Şekil 5. BBD Kombinasyonları için Max. ve Min. Fenolik ve Flavonoid Madde Değerleri (BAP)

## SONUÇ

Grafiklerden elde edilen değerlere göre Toplam Fenolik Madde miktarı için optimum madde miktarı KIN-NAA BBD kombinasyonundan elde edilmiştir. Gövde-Yaprak eksplantları kıyaslandığında ise, optimum değerlere gövde eksplantının Metanol çözeltilerinde ulaşıldığı görülmüştür.

Toplam Flavonoid Madde miktarı için optimum madde miktarı ise, BAP-2,4D BBD kombinasyonundan elde edilmiştir. Gövde-Yaprak eksplantları kıyaslandığında ise, optimum değerlere gövde eksplantının Metanol çözeltilerinde ulaşıldığı görülmüştür.

Etanol ve metanol çözücüleri kıyaslandığında ise, analizler için kullanılacak optimum çözücünün Metanol olduğu görülmüştür. Bitkinin içerdiği bileşenlerin spesifik olarak saptanabilmeleri için bir karakterizasyon işlemi uygulanabilir. Bitkinin yetiştirildiği ortam kombinasyonları optimize edilip en yüksek değerlerin sağlandığı kombinasyonlar uygulanarak, daha verimli kallus üretimi sağlamak amacıyla farklı ekstraksiyon seçenekleri ve farklı çözücüler kullanılarak maximum değerler elde edilebilecek bitki doku kültürü çalışmaları yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- Adom, K.K. and Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187.
- Asımgil A., 1996. Şifalı Bitkiler, Timaş Yayınları İstanbul pp.352
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün (2. Basım). Nobel Tıp Kitapevleri.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, in *Methods in Enzymology*, Eds. Lorsch J., Academic Press, USA. pp.343-355.
- Formica, J.V. and Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- Juliani, H.R. and Simon, J.E., 2002. Antioxidant Activity of Basil, Trends in new crops and new uses.. J. Janick and A. Whipkey (eds.). Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 575-579.
- Liyana-Pathirana, C., Dexter, J. and Shahidi, F., 2006. Antioxidant properties of wheat as affected by pearling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6177-6184.
- Madhujith, T. and Shahidi, F., 2007. Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5018-5024.
- Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P. and Cillard, J., 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures, *Biochemical Pharmacology*, 45(1), 13-19.
- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F. and Houlst, J.R.S., 1988. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40(11), 787-792.

- Phippen, W.B. and Simon J.E., 2000. Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol* (in press)
- Ptittin, E.A., 1987. *Centaurea thracica* (Janka) Hayek ve *Centaurea pichleri* boiss. subsp. *Pichleri* flavonoidleri, *Doktora tezi*, T.C. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 20, pp. 933-956.
- Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, 2073S-2085S.
- Shahidi, F. and Naczki, M., 2003. Biosynthesis, classification and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals, in *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, Eds. Taylor & Francis Group, CRP Press, ABD. pp.1-9
- Simon, J.E., J. Quinn, and R.G. Murray. 1990. Basil: A Source of Essential Oils. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, 484-489.

## EKLER

**Tablo 1.** Etanol kallus ekstralarının Toplam Fenolik Madde miktarları (mg GAE/g)

BBD Kombinasyonları	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g) Etanol
0,5B-0,25N (Y)	0.490±0.123
0,5B-1N (G)	0.519±0.060
0,5B-1N (Y)	0.569±0.153
0,5B-2N (G)	0.460±0.044
0,5B-2N (Y)	0.477±0.144
0,5B-0,5D (G)	0.482±0.033
0,5B-0,5D (Y)	0.417±0.049
0,5B-1D (G)	0.477±0.101
0,5B-2D (G)	0.632±0.095
0,5B-2D (Y)	0.766±0.091
0,5K-0,25N (Y)	0.419±0.063
0,5K-0,5N (Y)	0.446±0.047
0,5K-1N (G)	0.455±0.051
0,5K-1N (Y)	0.472±0.060
0,5K-2N (G)	0.720±0.077
0,5K-0,25D (Y)	0.799±0.082
0,5K-0,5D (Y)	0.701±0.094
0,5K-1D (G)	0.773±0.077
0,5K-1D (Y)	0.624±0.069
0,5K-2D (Y)	1.044±0.188
0,5K-0,25 I (G)	0.605±0.087
0,5K-1 I (G)	0.434±0.044
0,5K-1 I (Y)	0.517±0.063
0,5K-2 I (G)	0.545±0.160
0,5K-2 I (Y)	0.561±0.026

**Tablo 2.** Metanol kallus ekstralarının Toplam Fenolik Madde miktarları (mg GAE/g)

BBD Kombinasyonları	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g) Metanol
0,5B-0,25N (G)	0.854±0.182
0,5B-0,5N (G)	0.812±0.093
0,5B-0,5N (Y)	0.650±0.078
0,5B-1N (G)	1.060±0.034
0,5B-1N (Y)	0.950±0.145

0,5B-2N (G)	0.752±0.088
0,5B-0,25D (G)	0.894±0.097
0,5B-0,25D (Y)	1.201±0.208
0,5B-0,5D (G)	2.036±0.184
0,5B-0,5D (Y)	1.235±0.155
0,5B-1D (Y)	1.168±0.121
0,5B-2D (G)	1.653±0.097
0,5B-2D (Y)	1.487±0.064
0,5B-0,5 I (G)	0.900±0.149
0,5B-0,5 I (Y)	0.806±0.175
0,5B-1 I (Y)	0.890±0.088
0,5B-2 I (G)	0.739±0.177
0,5B-2 I (Y)	0.701±0.095
0,5K-0,25N (G)	1.258±0.069
0,5K-0,25N (Y)	1.143±0.100
0,5K-0,5N (G)	2.547±0.110
0,5K-1N (G)	1.348±0.071
0,5K-2N (G)	0.911±0.091
0,5K-2N (Y)	0.940±0.133
0,5K-0,25D (Y)	1.100±0.159
0,5K-0,25D (G)	0.875±0.040
0,5K-0,5D (Y)	1.441±0.089
0,5K-0,5D (G)	1.214±0.199
0,5K-1D (G)	1.670±0.053
0,5K-2D (G)	1.160±0.062
0,5K-2D (Y)	0.927±0.157
0,5K-1 I (G)	1.406±0.111
0,5K-2 I (G)	0.877±0.086

**Tablo 3.** Etanol kallus ekstralarının Toplam Flavonoid Madde miktarları (mg kuersetin/g)

BBD Kombinasyonları	Toplam Flavonoid (mg kuersetin/g) Etanol
0,5B-0,25N (Y)	0.446±0.063
0,5B-1N (G)	1.106±0.132
0,5B-1N (Y)	1.653±0.096
0,5B-2N (G)	0.806±0.044
0,5B-2N (Y)	0.786±0.031
0,5B-0,5D (G)	2.004±0.148
0,5B-0,5D (Y)	0.517±0.121
0,5B-1D (G)	1.184±0.066
0,5B-2D (G)	0.950±0.047
0,5B-2D (Y)	1.466±0.142
0,5K-0,25N (Y)	0.950±0.059
0,5K-0,5N (Y)	2.058±0.122
0,5K-1N (G)	0.606±0.070
0,5K-1N (Y)	0.704±0.061

**Tablo 3.'ün devamı.**

<b>BBD Kombinasyonları</b>	<b>Toplam Flavonoid (mg kuersetin/g) Etanol</b>
0,5K-2N (G)	0.912±0.084
0,5K-0,25D (Y)	0.514±0.028
0,5K-0,5D (Y)	0.657±0.039
0,5K-1D (G)	1.656±0.079
0,5K-1D (Y)	0.912±0.103
0,5K-2D (Y)	0.970±0.076
0,5K-0,25 I (G)	1.490±0.140
0,5K-1 I (G)	1.320±0.074
0,5K-1 I (Y)	1.503±0.033
0,5K-2 I (G)	1.245±0.080
0,5K-2 I (Y)	1.644±0.103

**Tablo 4.** Metanol kallus ekstralarının Toplam Flavonoid Madde miktarları (mg kuersetin/g)

<b>BBD Kombinasyonları</b>	<b>Toplam Flavonoid Madde (mg kuersetin/g) Metanol</b>
0,5B-0,25N (G)	1.939±0.230
0,5B-0,5N (G)	1.874±0.156
0,5B-0,5N (Y)	2.010±0.244
0,5B-1N (G)	1.286±0.163
0,5B-1N (Y)	1.126±0.100
0,5B-2N (G)	1.378±0.128
0,5B-0,25D (G)	3.010±0.336
0,5B-0,25D (Y)	1.673±0.184
0,5B-0,5D (G)	1.755±0.200
0,5B-0,5D (Y)	2.234±0.193
0,5B-1D (Y)	1.630±0.096
0,5B-2D (G)	1.585±0.176
0,5B-2D (Y)	1.354±0.139
0,5B-0,5 I (G)	1.187±0.186
0,5B-0,5 I (Y)	0.409±0.076
0,5B-1 I (Y)	1.435±0.089
0,5B-2 I (G)	0.341±0.041
0,5B-2 I (Y)	1.122±0.098
0,5K-0,25N (G)	1.551±0.134
0,5K-0,25N (Y)	0.701±0.061
0,5K-0,5N (G)	1.150±0.103
0,5K-1N (G)	0.426±0.041
0,5K-2N (G)	1.148±0.133
0,5K-2N (Y)	1.129±0.207
0,5K-0,25D (Y)	1.133±0.164
0,5K-0,25D (G)	0.524±0.060
0,5K-0,5D (Y)	1.072±0.144
0,5K-0,5D (G)	0.776±0.063
0,5K-1D (G)	1.439±0.179
0,5K-2D (G)	0.568±0.033
0,5K-2D (Y)	1.194±0.099
0,5K-1 I (G)	1.854±0.145
0,5K-2 I (G)	1.333±0.212

## Study of Intermetallic BaZn in B2 Structure for Elastic and Thermodynamic Properties

İ.Kars Durukan<sup>1\*</sup>, Y.Öztekin Çiftci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi University, Faculty of Science, Department of Physics, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: ilknurdurukan@gazi.edu.tr

### Abstract

Recently, new intermetallic materials which have suitable for several applications particularly at high pressure and high temperature have been studied to develop the technology. These materials are used in both theoretical and experimental applications as structural ceramics and classical metallic alloys. Intermetallic components attract the attention of researchers due to their superior mechanical and physical properties such as thermal stability, good ductility, high tensile strength and high corrosion resistance. Intermetallic BaZn compound crystallizes in B2 structure. Here, structural, elastic and thermodynamic properties of the BaZn have been studied by first-principles method based on Generalized Gradient Approximation (GGA) using VASP program. For these purpose, the temperature and pressure-dependent behaviour of the volume, heat capacity are investigated in wide pressure and temperature range. The results on the basic mechanical and structural parameters, such as the lattice constant, bulk modulus, elastic constants are also evaluated.

**Keywords:** B2 structure, BaZn, Thermodynamic Properties

### INTRODUCTION

The intermetallicities are composed of two or more metals. Two or more metals are brought together in a certain combination and in a certain ratio. The new element is formed to produce a distinctly different solid state phase when the constituent elements react. The reason why intermetallic compounds are of interest in the scientific field is due to their mechanical and physical properties such as low density, high melting point, good thermal conductivity, corrosion resistance (Fu et al., 2007a, Fu et al., 2007b, Sob et al., 1998).

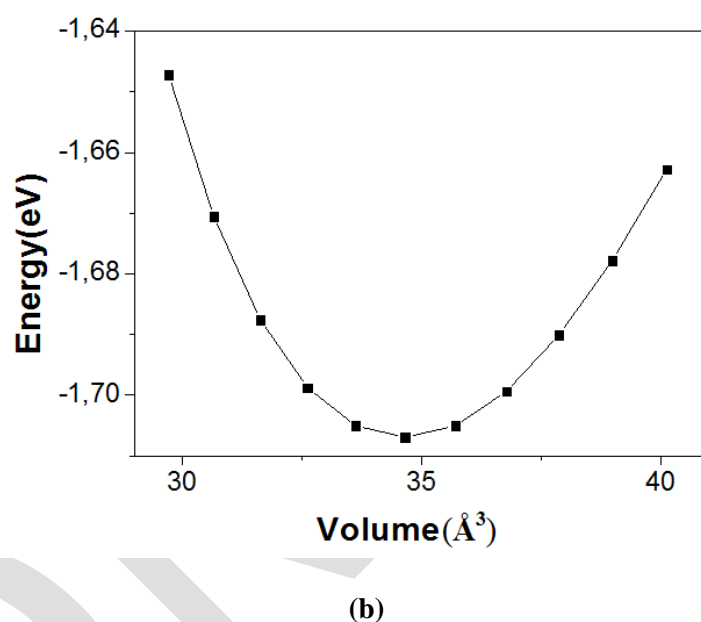
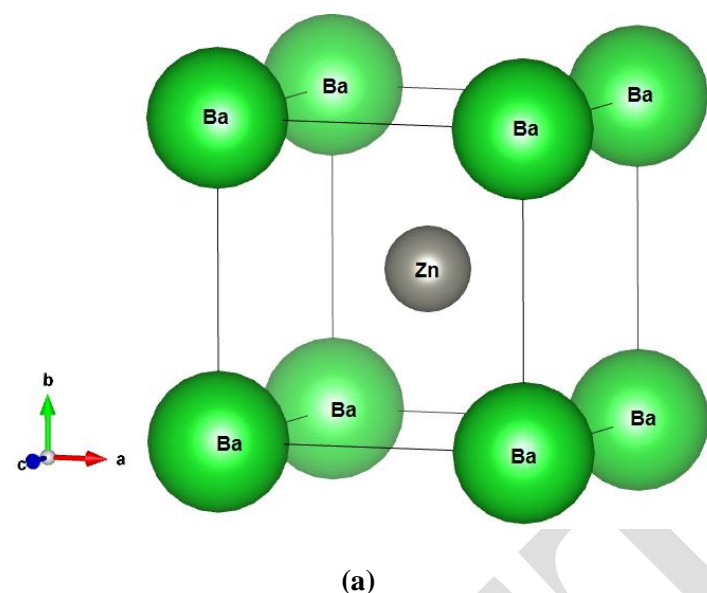
Intermetallic BaZn compound crystallizes in B2 structure. Here, structural, elastic and thermodynamic properties of the BaZn have been studied by first-principles method based on Generalized Gradient Approximation (GGA) using VASP program.

### MATERIALS AND METHODS

All the calculations have been carried out using the VASP (Kresse and Hafner, 1993) based on the density functional theory (DFT). The electron-ion interaction was considered in the form of the projector-augmented-wave (PAW) method with plane wave up to an energy of 700 eV. For the exchange and correlation terms in the electron-electron interaction, Perdew and Zunger-type functional is used within the generalized gradient approximation (GGA). The k-point meshes for Brillouin zone sampling is constructed using the Monkhorst-Pack scheme. The 16x16x16 Monkhorst and Pack grid of k-points have been used for integration in the irreducible Brillouin zone. Thus, this mesh ensures a convergence of total energy to less than 10<sup>-8</sup> eV/atom. The elastic properties are exploited to estimate with stress-strain method (Page and Saxe, 2002, Mehl et al., 1990). The quasi-harmonic Debye model (Blanco et al., 2004, Peng et al., 2007, Peng et al., 2008a, Peng et al., 2008b) has been applied to calculate the thermodynamic properties of BaZn compounds by using GIBBS code (Blanco et al., 2004).

### RESULTS and DISCUSSION

In this study, intermetallic BaZn compound was investigated in B2 (CsCl) phase. The coordinates for this compound are Ba (0, 0, 0) and Zn (0.5, 0.5, 0.5). The crystal structure of the BaZn compound in the structure is shown in Figure 1a. To determine the equilibrium geometry, we relaxed (ISIF=3 in VASP) the volume of unit cell and the all atomic positions. With the relaxed equilibrium lattice constant, the Murnaghan equation of state (Murnaghan, 1944) was fitted to the E (V) curves in order to determine the Bulk modulus (B). The obtained results of investigated compound are given in Table I and compared with the other experimental result (Taylor and Kagle, 1963).



**Figure 31.** a) Crystal structure of BaZn compound, b) Total energies as a function of volume for BaZn compound

It is seen from Table I, calculated lattice constant  $a_0$ , Bulk module B and derivative of bulk module B' of BaZn alloy is in good agreement with the experimental study (Taylor and Kagle, 1963).

**Table 1.** Lattice constant, Bulk module, first derivative bulk module and total energy of BaZn compound.

Structures	a (Å)	B(GPa)	B'	V(Å <sup>3</sup> )	E <sub>tot</sub> (ev)
BaZn	4.107	21.08	4.37	69.20	-3.41
BaZn(exp.)	4.09				

The elastic constants of solids provide a link between the mechanical and dynamical behaviour of crystals and give important information concerning the nature of the forces operating in solids. In particular, they provide information on the stability and stiffness of materials and their ab initio calculation requires precise methods. Since the forces and the elastic constants are functions of the first-order and second-order derivatives of the potentials, their calculation will provide a further check on the accuracy of the calculation of forces in solids.

Hence, to study the stability of these compounds in B2 structure, we have calculated the elastic constants at equilibrium lattice parameter.

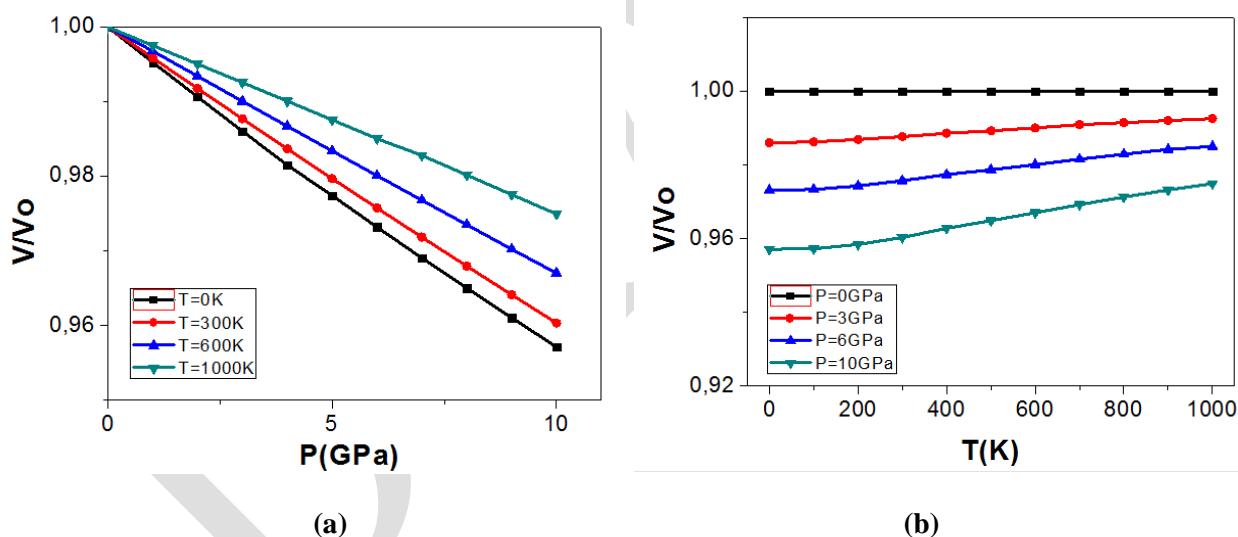
**Table 2.** Elastic constants  $C_{ij}$  (GPa), bulk modulus B (GPa)

Material	$C_{11}$	$C_{12}$	$C_{44}$	B
BaZn	37.8	13.1	16	21.3

The second-order elastic constants ( $C_{ij}$ ) are calculated by using the ‘stress-strain’ technique. The obtained results are listed in Table II. There are no study to compare our obtained results.

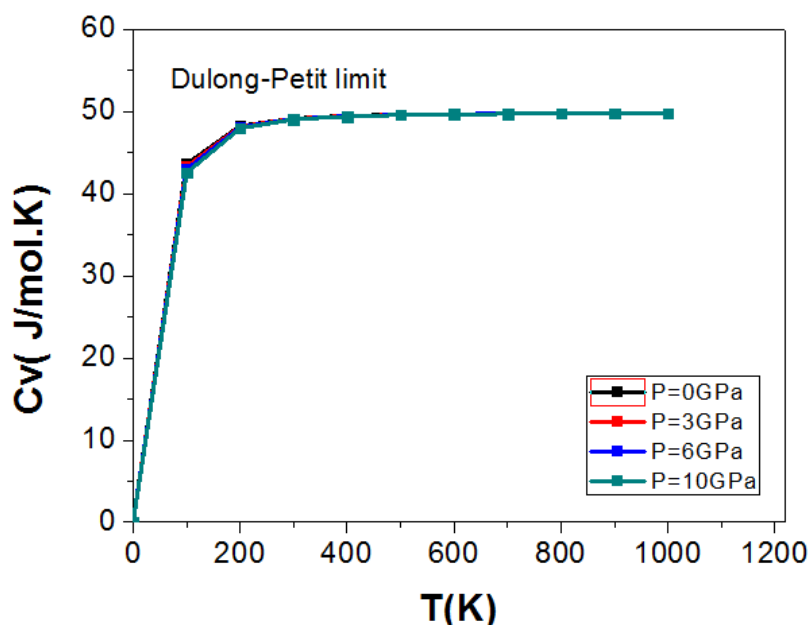
The elastic properties of a cubic crystal are defined exactly by three independent elastic constants.  $C_{11}$ ,  $C_{12}$  and  $C_{44}$ . The mechanical stability of the cubic crystals must be in accordance with the Born stability criteria (Born and Huang, 1954). According to this criteria, BaZn is stable mechanically.

The Debye temperature ( $\theta_D$ ) is known as an important fundamental parameter closely related to many physical properties such as specific heat and melting temperature. Thermal properties were determined using the Debye model at a temperature in the range of 0-1000 K. The pressure effect was studied in the 0-10GPa range. The volume pressure relationship at different temperatures is shown in Figure 4a. The volume decreases with increasing pressure. This is because the atoms in the intermediate layer become closer and interact more strongly with each other. On the other hand, the volume increases with temperature but increases reasonably. Because the effect of pressure on the structure is much higher than the temperature.



**Figure 2.** (a) The variations of volume with the pressure at different temperatures of BaZn, (b) The variations of volume with the temperature at different volumes of BaZn.

In addition, the variation of heat capacity with temperature at constant pressure was evaluated. When the temperature is lower than 100 K, the heat capacity value shows a rapid increase, while the increase in the heat capacity value slows down at values greater than 100 K, then the heat capacity value is fixed at high temperatures. This behavior in the constant heat capacity at high temperatures is called the Dulong Petit limit (Landau and Lifshitz, 1969).



**Figure 3.** The variations of  $C_v$  with temperature at different pressures for BaZn.

## CONCLUSION

In this study, the first principles calculations have been performed to investigate the structural, elastic and thermodynamic properties of BaZn compound. The obtained lattice parameter of BaZn structure is in good agreement with experimental data. According to our calculations, BaZn is mechanically stable. In the thermodynamic calculations according to the Debye model, the appropriate temperature range for BaZn compound was between 0-1000 K, and the pressure range was between 0-10 GPa.

## REFERENCES

- Blanco M A, Francisco E, Luano V 2004. GIBBS: Isothermal-Isobaric Thermodynamics of Solids From Energy Curves Using a Quasi-Harmonic Debye Model. *Comp. Phys. Commn.* 158: 57.
- Born M, Huang K 1954. Elasticity and stability, *Dynamical Theory of Crystal Lattices*. Clarendon: Oxford. 142 pp.
- Fu H Z, Chen D, Cheng X L, Gao T, Yang X D 2007a. The Influence of the X Atoms and Al 3p Occupied States in  $AlTiX_2$  (X = Fe, Cu, Co, Ni). *Physica B*, 388:303.
- Fu H Z, Peng F, Cheng D, Gao T, Cheng X L, Yang X D 2007b. The ab initio calculations of the doping Zr's influence on the electronic structure of  $AlCo_2Ti$ . *J Phys Chem Solids*, 68: 1598.
- Kresse G, Hafner J 1993. Ab initio molecular dynamics for liquid metals. *Phys Rev B*. 47:558–561.
- Landau L D and Lifshitz E M 1969. *Statistical Physics*. Nauka: Moscow, 196 pp
- Mehl M J, Osburn J E, Papaconstantopoulos D A and Klein B M 1990. Structural properties of ordered high-melting-temperature intermetallic alloys from first-principles total-energy calculations. *Phys. Rev. B*, 41: 10311.
- Murnaghan F D 1944. The Compressibility of Media under Extreme Pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 30: 244–247.
- Page L. and Saxe P 2002. Symmetry-general least-squares extraction of elastic data for strained materials from ab initio calculations of stress. *Phys. Rev. B* 65: 104104.
- Peng F, Fu H Z, Cheng X L 2007. First-principles calculations of thermodynamic properties of  $TiB_2$  at high pressure. *Physica B*, 400:83.



Peng F, Fu H Z, Yang X D 2008a. Transition phase and thermodynamic properties of PtC from first-principles calculations. *Solid State Commun.* 145:91.

Peng F, Fu H Z, Yang X D 2008b. Ab initio study of phase transition and thermodynamic properties of PtN. *Physica B*, 403:2851.

Sob M, Wang L G and Vitek V 1998. The role of higher-symmetry phases in anisotropy of theoretical tensile strength of metals and intermetallics. *Philos. Mag. B*, 78: 653–658.

Taylor A, Kagle B J 1963. *Crystallographic Data on Metal and Alloy structures*. USA: New York, 693 pp.

DRAFT

## Grafen oksit-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> katalizörü kullanılarak bisfenol-A'nın ultrasonik destekli fotokatalitik oksidasyonu

Ezgi Yakar<sup>1\*</sup>, Belgin Gözmen Sönmez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi, Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Bölümü, Mersin, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversite, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Mersin, Türkiye

\*ezgiyakar92@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada, hidrotermal metot ile önceden hazırlanmış grafen oksit (GO) üzerine CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> bileşiği yüklendi. Elde edilen Grafen oksit-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> bileşiğinin XRD analizleri gerçekleştirildi. Hazırlanan GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> heterojen katalizörü, endokrin yıkıcı özelliğe sahip Bisfenol A (BPA) bileşiğinin ultrasonik destekli fotokatalitik oksidasyonunda kullanıldı. BPA oksidasyonunda katalizör, UV, ultrasonik sistem ve oksidanların (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) tek başına etkili olmadığı gözlemlendi. En etkili fotokatalitik oksidasyon, ultrasonik destekli ortamda S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> oksidantı ve GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> katalizörü varlığında elde edildi. 25 mg/L derişimde BPA çözeltisi pH 7,0 de 16 mM PS ve 5 mg/50 mL GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> kullanımı sonrası 1 ve 2 saatte sırasıyla %65 ve %81 mineralizasyona uğratıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Bisfenol A, fotokatalizör, spinel magnetik

### Ultrasonic assisted photocatalytic oxidation of bisphenol-A using graphene oxide-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> catalyst

#### Abstract

In this study, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> was loaded onto graphene oxide (GO) prepared by hydrothermal method. XRD analyzes of Graphene oxide - CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> were performed. The prepared GO- CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> heterogeneous catalyst was used in ultrasonic assisted photocatalytic oxidation of Bisphenol-A (BPA) compound having endocrine degrading properties. It was observed that catalyst, UV, ultrasonic system and oxidants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) alone were not effective in BPA oxidation. The most effective photocatalytic oxidation was obtained in the presence of S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> oxidant and GO- CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> catalyst in an ultrasonic assisted medium. BPA solution at a concentration of 25 mg / L was subjected to 65% and 81% mineralization at 1 and 2 hours, respectively, after the use of 16 mM PS and 5 mg / 50 mL GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> at pH 7.0.

**Keywords:** Bisphenol-A, photocatalyst, spinel magnetite.

### GİRİŞ

Bisfenol-A (2,2-bis- (4-hidroksifenil) propan) polimer endüstrisinde ve epoksi reçinelerin üretiminde monomer olarak kullanılan sentetik organik bileşiktir (Buysch, 1991). BPA bazlı üretilen plastikler, şeffaf ve sert özellikleri nedeniyle su ve gıda şişeleri, biberonlar, saklama kapları, oyuncaklar, CD ve DVD yapımında kullanılır (Asimakopoulos ve ark., 2012; Cunha ve Fernandes, 2013; Laws ve ark., 2000; Pivnenko ve ark., 2015). BPA, endokrin yıkıcı maddeler sınıfında yer alır, hücre moleküler yapısını ve biyokimyasını değiştirerek östrojen gibi davranabilir (Nakamura ve Daishima, 2004). Endüstriyel atık su deşarjlarıyla kirlenmiş yüzey sularında (Huang ve ark., 2014; Im ve Löffler, 2016; Matsumoto, 1982; Peteffi ve ark., 2019) farklı derişimlerde BPA bileşiği belirlemiştir. Hatta çeşme suyunda yapılan analizlerde bile yüksek derişimlerde BPA'ya rastlanmıştır (Colin ve ark., 2014).

BPA, biyolojik giderime karşı dirençli bir bileşik olduğundan oksidasyonu için daha etkili yöntemlere ihtiyaç vardır. İleri oksidasyon yöntemleri yüksek oksidasyon potansiyeline sahip radikallerin oluşumuna dayalı etkili yöntemlerdir. BPA bileşiğinin oksidasyonunda bu yöntemlerden elektro-Fenton (Gözmen ve ark., 2003), çeşitli katalizörler ile fotokatalitik oksidasyon (Dong ve ark., 2018; Fanga ve ark., 2019; Mady ve ark., 2017), Fenton (Luca ve ark., 2015), ozonlama (Umar ve ark., 2013) gibi yöntemler uygulanmıştır.

Grafen iki boyutlu bir malzemedir ve bu yüzden diğer tüm boyutlardaki grafitik meteryaller için yapıtaşı olarak düşünülebilir. GO, grafit oksitin pul pul dökülmesinden üretilen, olağanüstü elektronik özellikler sergileyen, grafenin büyük ölçekte üretiminde sıkça kullanılan, bir madde olarak oldukça dikkat çekmiştir. GO yapılarına metal oksit yapısının katılmasıyla nanokompozitler oluşmaktadır. Ancak Van der Waals etkileşimleri sebebiyle indirgenmiş grafen tabakaları dönüşümsüz olarak bir araya toplanmaya meyillidir ve tekrardan grafit yapısına gidebilir. Bazal düzlemde bol miktarda oksijenlenmiş fonksiyonel gruplar bulunur ve bu gruplar

çeşitli metal ve metaloksitlerin destekçisi olarak kullanılabilir (Yang ve ark., 2009; Zeng ve ark., 2012; Zubir ve ark., 2014).

Spinel ferritler ( $MFe_2O_4$ ), kübik ferritleri olarak da adlandırılır. Kobalt spinal ferritler, güçlü anizotropisi, orta derecede mıknatıslanma, yüksek sıcaklıkta iyi mekanik ve mükemmel kimyasal stabilite özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Wang ve ark., 2008) ve kobalt ferritleri sensörler, kayıt cihazları, manyetik kartlar, güneş pilleri, manyetik ilaç dağıtımı, biyomedikal, kataliz ve biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Kazemi ve ark., 2018).

İleri oksidasyon tekniklerinden biri Fenton yöntemidir. Fenton reaktifleri olarak bilinen  $Fe^{2+}$  ile hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) tepkimesi sonucu yüksek oksidasyon potansiyeline ( $E^\circ = 2,7$  V) sahip olan ve seçici olmadan reaksiyona giren hidroksil radikalleri ( $\bullet OH$ ) oluşur (Fenton, 1894).



Persülfat, çözünürlüğü yüksek, kararlı ve bir oksidanttır ( $E^\circ = 2,1$  V). Ancak persülfatın aktivasyonu sonucu üretilen sülfat radikali ( $SO_4^{\bullet-}$ ) kendisinden çok daha yüksek oksidasyon potansiyeline sahiptir ( $E^\circ = 2,6$  V). Persülfat, aşağıdaki reaksiyonlarda gösterildiği gibi  $SO_4^{\bullet-}$  radikal üretmek üzere ısı, baz,  $H_2O_2$ , UV, ultrasonik sistem (US), geçiş metalleri veya katodik indirgeme kullanılarak aktive edilebilir (Tsitonaki ve ark., 2010; Vicente ve ark., 2011).



Sülfat radikalinin ise hidroksil radikaline dönüşebildiği bilinmektedir.

Bu çalışmada manyetik özelliğe sahip GO- $CoFe_2O_4$  heterojen katalizörü sentezlenerek, BPA bileşiğinin fotokatalitik oksidasyonunda heterojen katalizör olarak etkinliği incelendi. Ultrasonik sistemin, oksidant türünün, pH'nın ve oksidant derişiminin etkisi incelendi.

## MATERYAL VE METOT

### *Katalizör Sentezi ve Karakterizasyonu*

Grafen oksit sentezi geliştirilmiş Hummers metodu kullanılarak gerçekleştirildi (Hummers ve Offeman, 1958; Xu ve ark., 2008). Ön oksidasyon basamağında 20 g grafit üzerine 10 g  $P_2O_5$ , 10 g  $K_2S_2O_8$  ve 50 mL derişik sülfirik asit ( $H_2SO_4$ ) eklendi ve 80 °C'de 6 saat bekletildi. Oda sıcaklığında karışıma 200 mL ultra ultra saf su eklendi. Yaklaşık nötral pH'ya ulaşınca kadar yıkama ve filtreleme işlemleri uygulandı. Sonuç olarak 70 °C'de etüvde kurutuldu ve oksitlenmiş grafit elde edildi.

Oksitlenmiş grafitten 1 g alındı ve üzerine 1 g  $NaNO_3$  ve 50 mL derişik  $H_2SO_4$  eklendi. Buz banyosunda iken üzerine 5 g  $KMnO_4$  yavaş yavaş eklendi ve 30 dakika bekletildi. Karışımın sıcaklığı 35 °C ye çıkarıldı ve 3 saat bu sıcaklıkta karıştırıldı. Daha sonra karışım buz banyosuna alınarak 50 mL ultra saf su damla damla eklendi, 30 dk karıştırıldı. Süre sonunda 100 mL deiyonize saf su ve oksidasyon reaksiyonunu durdurarak, kalıntı permanganatı çözünür manganey iyonlarına indirgemek için 80 mL %30' luk  $H_2O_2$  damla damla ekledi, sarı renge yakın bir karışım elde edildi. Üsteki süzüntü dekantasyon ile ayrıldı, sırasıyla %10'luk HCl ve deiyonize su ile yıkama işlemleri gerçekleştirildi.

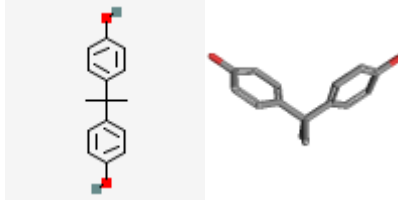
Manyetik özellikte heterojen GO- $CoFe_2O_4$  (1:2) sentezinde, sentezlenmiş GO ultra saf su (150 mL) içerisinde ultrasonik banyoda ve dağıtıldı. Bu çözeltiye 10 mL ultra saf su içinde çözülmüş  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  ve  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  yavaşça eklendi. Çözelti pH'sı NaOH çözeltisi ile 11'e ayarlandıktan sonra 5 saat ultrasonik banyoda bekletildi.

Toz haline getirilen  $CoFe_2O_4$  ve GO- $CoFe_2O_4$  katalizörlerinin yapısal karakterizasyonunu belirlemek için Rigaku Smartlab X-ışınları Toz Difraktometresi (XRD) kullanıldı. XRD analizlerinde 40 KW ve 30 mA koşullarında bakır  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,541$  Å) ışını kullanıldı ve numuneler 5°/dk ile  $2\theta = 3^\circ$  den 80°'ye kadar tarandı.

### *Fotokatalitik Oksidasyon Yöntemi*

BPA ( $\geq 99$ , Aldrich) bileşiğinin kimyasal yapısı ve özellikleri Tablo 1 de verildi. 50 mL, 25 mg/L BPA çözeltisine 5 mg katalizör ve belirlenen miktarlarda oksidant eklendi. Deneyler manyetik karıştırıcı veya ultrasonik banyo içerisinde gerçekleştirildi. Işık kaynağı olarak mavi led lamba (kessil) kullanıldı. Işık kaynağının ölçümlerinde ışık yeğniliğinin 113,95 Mw/cm<sup>2</sup> ve maksimum dalga boyunun (470,6 nm (28,1nm maksimum yarısı tam genişlik ile) olduğu belirlendi. Fotokatalitik oksidasyon sistemi Şekil 1 de verildi. Çeşitli zamanlarda örnekler alınarak 0,45µm ve 0,22 µm PTFE şırınga filtreden geçirildikten sonra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Toplam Organik Karbon (TOK) analizleri gerçekleştirildi.

**Tablo 1.** Bisfenol A'nın Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri (PubChem).

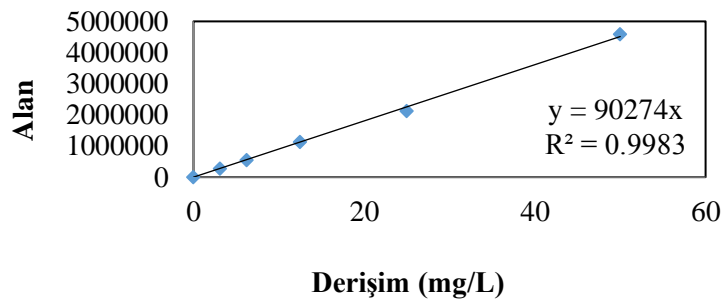
Özellikleri	BPA
Moleküler yapısı (2D ve 3D)	
Sistemik (IUPAC) adı	4-[2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol
Kimyasal formülü	$C_{15}H_{16}O_2$
Molekül ağırlığı	228,291 g/mol
Suda çözünürlüğü	300 mg/L at 25 °C
pK <sub>a</sub>	9,6
log K <sub>ow</sub>	3,32



**Şekil 1.** Ultrasonik destekli fotokatalitik oksidasyon sistemi.

#### **HPLC ve TOK Analizleri:**

BPA'nın başlangıç ( $C_0$ ) ve çeşitli zamanlarda alınan örneklerdeki ( $C_t$ ) derişimi HPLC analizi ile belirlendi. HPLC analizi için kalibrasyon grafiğı Şekil 2 de verildi. HPLC analizleri Agilent 1100 HPLC sistemi ile ZORBAX Eclipse plus C18 (4,6 ×100 mm×3,5 µm) HPLC kolonu, % 45:%55 (v:v) Asetonitril : ultra saf su mobil fazı kullanılarak 215 nm de 0,8 mL/dk akış hızında gerçekleştirildi. BPA'nın giderimi  $C/C_0$  değerinin zamana karşı grafiğı geçirilmesi ile verildi.



**Şekil 2.** BPA analizi için kalibrasyon grafiğı.

BPA mineralizasyon başarısı TOK içeriğı ölçülerek değerlendirildi. Analizler TOK Analizörü (Shimadzu TOC- L serisi) ile gerçekleştirildi. Yüzde mineralizasyon miktarı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

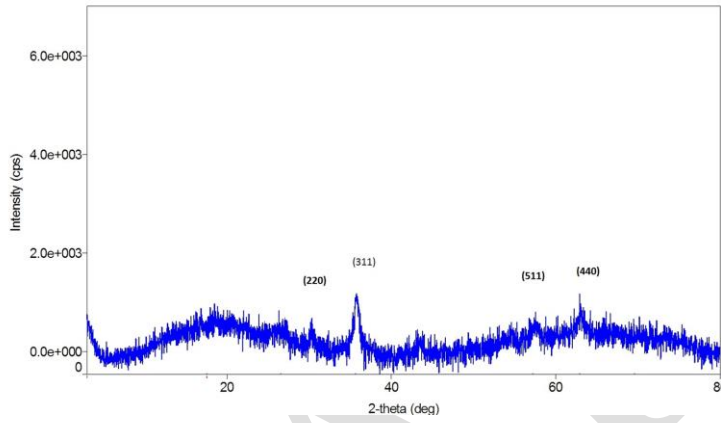
$$\% \text{ Mineralizasyon ( TOK Giderimi) } = \frac{(TOK_0 - TOK_t)}{TOK_0} \times 100 \quad (5)$$

Bu eşitlikte  $TOK_0$  ve  $TOK_t$ , başlangıç ve t zamanında alınan örneğin TOK içeriğini ifade eder.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### XRD Analizi

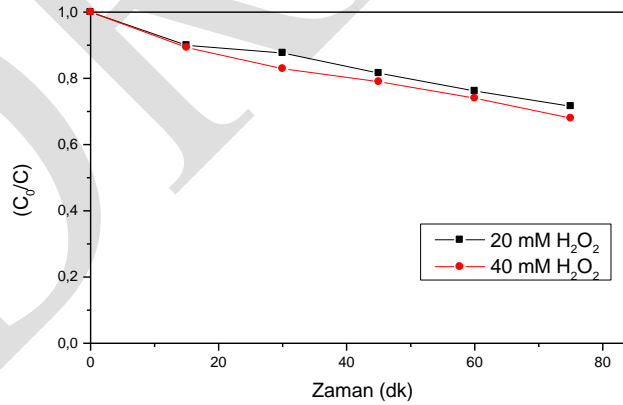
Şekil 3’de hidrotermal yöntem ile GO üzerinde sentezlenen GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> katalizörüne ait XRD spektrumu görülmektedir. XRD analiz sonucu yükleme işinin gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3. XRD spektrumu

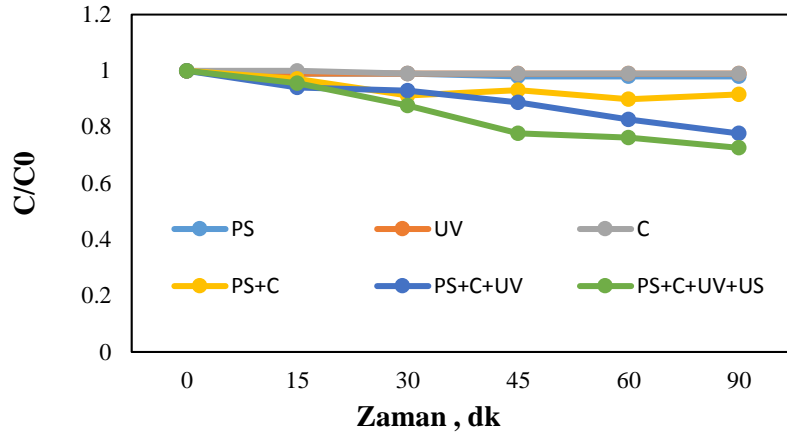
### Oksidant Seçimi

Oksidant olarak farklı derişimlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanıldı. Ancak bu çalışmada 2-40 mM derişimlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmasına rağmen Şekil 4 de görüldüğü gibi 40 mM da bile etkili bir giderim sağlanamadı.



Şekil 4. BPA çözeltisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantı ile fotokatalitik oksidasyonu (GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>= 5 mg, V=50 mL, [BPA]=25 mg/L, pH=7,0)

Oksidant olarak persülfat kullanılan deneylerde BPA çözeltisinin oksidasyonunda tek başına ultrasonik sistem (US), UV lamba, oksidant (PS) ve katalizörün (C) etkili olmadığı belirlendi (Şekil 5).

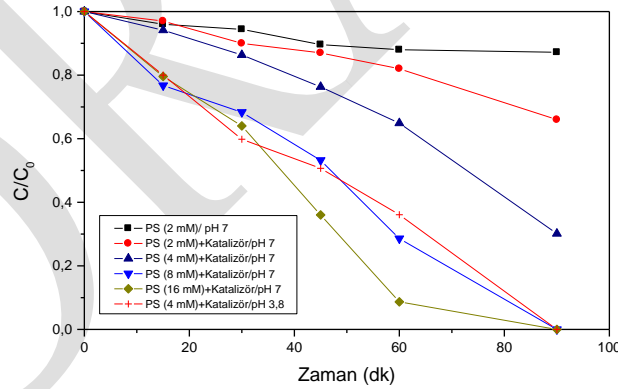


Şekil 5. BPA çözeltisinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantı ile fotokatalitik oksidasyonu (GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>= 20 mg, V=50 mL, [PS]=2 mM, [BPA]=25 mg/L, pH=7,0)

Şekil 5 incelendiğinde, persülfat ve katalizörün beraber kullanımı ile eşitlik 3 de gösterilen sülfat radikali oluşumuna bağlı bir miktar oksidasyonun sağlandığı görülmekte. Persülfat, katalizör ve UV kullanımı ile yaklaşık %23 giderim sağlanırken, Ultrasonik sisteminde eklenmesi ile giderimin % 28'e yükseldiği görülmüştür.

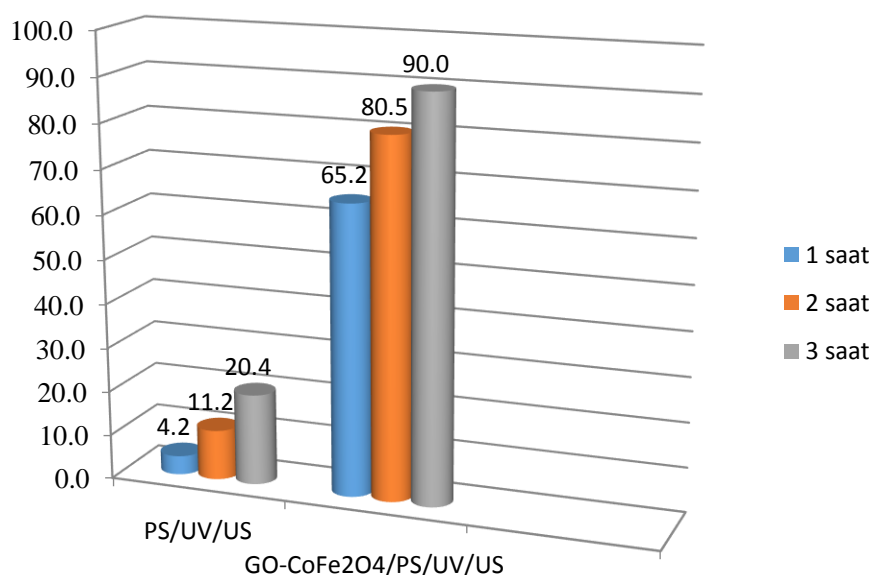
#### pH ve Derişimin Etkisi

Şekil 6'de görüldüğü gibi katalizörün bulunmadığı ortamda 2 mM PS/UV/US sistemi BPA oksidasyonunda etkili değildir. Ortama 5 mg katalizör eklendiğinde oksidasyon etkili bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Oksidant miktarı 2 mM'dan 16 mM'a yükseldikçe oksidasyon miktarında artış görülmektedir. Çözelti pH'sı 7,0 iken 8 mM ve 16 mM oksidant kullanımında 90 dakikada %100 BPA oksidasyonu gerçekleştirilmiştir. pH 3,8 de 4 mM PS kullanıldığında ise daha etkili bir oksidasyon gözlenmiş 60 dakikada %90 oksidasyona ulaşılmıştır. Bunun nedeni metal iyonlarının asidik ortamda çözeltiye geçmesi olabilir. Serbest haldeki demir metal iyonları homojen ortamda tepkimeyi hızlandırabilir.



Şekil 6. BPA çözeltisinin persülfat oksidantı ile fotokatalitik oksidasyonu (GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>= 5 mg, V=50 mL, [BPA]=25 mg/L)

Şekil 7'de 1, 2 ve 3 saat sonrası alınan örneklerin TOK giderimleri görülmektedir. Persülfatın katalizörsüz kullanımında %20 mineralizasyon sağlanırken katalizör kullanımı ile % 90 mineralizasyona ulaşılmıştır.



Şekil 7. BPA çözeltisinin mineralizasyonu (GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>= 5 mg, V=50 mL, [BPA]=25 mg/L, [PS]=16 mM)

## SONUÇ

Bu çalışmada GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> heterojen katalizörü sentezlenerek BPA'nın ultrasonik destekli fotokatalitik oksidasyonunda kullanıldı. Katalizör ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidantının etkili sonuç vermediği ancak persülfatın oksidasyonu arttırdığı belirlendi. Çözelti pH'sının 7,0 olduğu koşullarda katalizörün BPA'yı adsorplama özelliği olmadığı, ancak katalizörün PS oksidantını katalizlemesine bağlı ortamda oluşan sülfat radikalinin oksidasyonu arttırdığı belirlendi. Ultrasonik sistem ile hem kullanılan katalizörün topaklanması engellendi hem de oksidasyonun daha etkili olması sağlandı. Katalizörün harici mıknatıs ile toplanabilmesi nedeniyle daha çevreci bir yöntem ile oksidasyon gerçekleştirildi. 25 mg/L derişimde BPA çözeltisi pH 7,0 de 16 mM PS ve 5 mg/50 mL GO-CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> kullanımı sonrası 1 ve 2 saatte sırasıyla %65 ve %81 mineralizasyona uğrattıldı.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülebilmesi için gerekli alt yapının oluşturulmasında büyük katkısı olan ve BAP 2019-1-TP2-3442 proje numaralı tez projesine maddi desteğini sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Asimakopoulos AG, Thomaidis NS, Koupparis MA, 2012. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology Letters*, 210: 141-154.
- Buysch, HJJ, 1991. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th ed., VCH: Weinheim, Germany, Vol. A19, pp 348-352.
- Colin A, Bach C, Rosin C, Munoz JF, Dauchy X, 2014. Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66: 86-99.
- Cunha SC, Fernandes JO, 2013. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography-mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Control*, 33: 549-555.
- Dong X, Sun Z, Zhang X, Li C, Zheng S, 2018. Construction of BiOCl/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/kaolinite composite and its enhanced photocatalysis performance under visible-light irradiation. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 84: 203-211.
- Fanga Z, Hua Y, Chenga J, Chen Y, 2019. Continuous removal of trace bisphenol A from water by high efficacy TiO<sub>2</sub> nanotube pillared graphene-based macrostructures in a photocatalytically fluidized bed. *Chemical Engineering Journal*, 372: 581-589.
- Fenton HJH, 1894. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society. Transactions*, 65: 899-910.

- Gözmen B, Oturan MA, Oturan N, Erbatur O, 2003. Indirect electrochemical treatment of bisphenol A in water via electrochemically generated Fenton's reagent. *Environmental Science & Technology*, 37(16): 3716-3723.
- Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlstrom B, Neretin L, Wong MH, 2012. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42: 91-99
- Hummers WS, Offeman RE, 1958. Preparation of graphitic oxide, *Journal of American Chemical Society*, 80: 1339-1339.
- Im J, Loffler FE, 2016. Fate of Bisphenol A in terrestrial and aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 50: 8403-8416.
- Kazemi M, Ghobadi MI, Mirzaie A, 2018. Cobalt ferrite nanoparticles (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> MNPs) as catalyst and support: Magnetically recoverable nano-catalysts in organic synthesis. *Nanotechnology Reviews*, 7(1): 43-68.
- Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL, 2000. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicological Science*, 54: 154-167.
- Luca A, Dantas R, Esplugas S, 2015. Study of Fe(III)-NTA chelates stability for applicability in photo-Fenton at neutral pH. *Applied Catalysis B: Environmental*, 179: 372-379.
- Mady AH, Baynosa ML, Tuma D, Shim JJ, 2017. Facile microwave-assisted green synthesis of Ag-ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@rGO nanocomposites for efficient removal of organic dyes under UV-and visible-light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 203: 416-427.
- Matsumoto, G. 1982. Comparative study on organic constituents in polluted and unpolluted inland aquatic environments-III. *Water Research*, 16: 551-557.
- Nakamura S, Daishima S, 2004. Simultaneous determination of alkylphenols and bisphenol A in river water by stir bar sorptive extraction with in situ acetylation and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1038: 291-294.
- Petteffi GP, Fleck JD, Kael IM, Rosa DC, Antunes MV, Linden R, 2019. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin - Rio Grande do Sul - Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 79(4): 712-721
- Pivnenko KG, Pedersen A, Eriksson E, Astrup TF, 2015. Bisphenol A and its structural analogues in household waste paper. *Waste Manage*, 44: 39-47.
- Tsitonaki A, Petri B, Crimi M, Mosbaek H, Siegrist RL, Bjerg PL, 2010. In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater Using Persulfate: A Review. *Critical Review Environmental Science & Technology*, 40: 55-91.
- Umar M, Roddick F, Fan L, Aziz HA, 2013. Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater-a review. *Chemosphere*, 90: 2197-2207.
- Vicente F, Santos A, Romero A, Rodriguez S, 2011. Kinetic study of diuron oxidation and mineralization by persulphate: Effects of temperature, oxidant concentration and iron dosage method. *Chemical Engineering Journal*, 170: 127-135.
- Wang B, Li B, Zhao B, Li CY, 2008. Amphiphilic Janus gold nanoparticles via combining "Solid-State Grafting-to" and "Grafting-from" methods. *Journal of American Chemical Society*, 130: 11594-11595.
- Xu Y, Bai H, Lu G, Li C, Shi G, 2008. Flexible graphene films via the filtration of water-soluble noncovalent functionalized graphene sheets, *Journal of the American Chemical Society*, 130, 18, 5856-5857.
- Yang XY, Zhang XY, Ma YF, Huang Y, Wang YS, Chen YS, 2009. Superparamagnetic grapheneoxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers, *Journal of Materials Chemistry*, 19: 2710-2714.
- Zeng T, Zhang XL, Ma YR, Niu H-Y., Cai YQ, 2012. A novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-graphene-Au multifunctional nanocomposite: green synthesis and catalytic application. *Journal of Materials Chemistry*, 22: 18658-18663.
- Zubir NA, Yacou C, Motuzas J, Zhang X, Diniz daCosta JC, 2014. Structural and functional investigation of grapheneoxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites for the heterogeneous Fenton-like reaction. *Scientific Reports*, 4: 4594.



## Structural, Elastic and Electronic Properties of CdSr compound : first-principles study

İ.Kars Durukan<sup>1\*</sup>, Y.Öztekin Çiftçi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi University, Faculty of Science, Department of Physics, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: ilknurdurukan@gazi.edu.tr

### Abstract

Early, cadmium element was often used to electroplate steel and protect it from corrosion. Nowadays, It is still used to protect critical components of aeroplanes and oil platforms. Cadmium coatings are particularly useful in the automotive, aerospace, offshore, mining, electrical, electronic, and defence industries where they are applied to bolts and other connectors, chassis, fasteners and other components. Strontium is a trace mineral found naturally in your body. Although strontium is often overlooked, it's incredibly beneficial to your bones and is an important factor in your overall bone health. There are no any theoretical study of elastic and electronic properties of intermetallic compound CdSr in B2 structure up to now. In this study, our aim is to fill deficiency in the literature about physical properties of this compound. We have computed structural and elastic constants, electronic band structure and density of states based on density functional theory using VASP program. Obtained results show that this compound stable both mechanically.

**Keywords:** B2 structure, CdSr, Elastic Properties

### INTRODUCTION

Cadmium is mostly used in steel plating because of its resistance to oxidation and easy coating in industry. Iron, copper and zinc are also coated with cadmium to increase corrosion resistance. Cadmium, which is a good neutron absorber, is therefore also used as a retarder in the control rods in nuclear reactors. Vapor or electrolysis coating applications can be made. It is an important component of alloys due to its low melting point. Areas such as ball bearings requiring friction resistance are coated with cadmium. nickel alloy of cadmium is used in some batteries. Cadmium sulfate is a mildly antiseptic substance used in medicine. Cadmium chloride is an important compound used in cotton dyeing, galvanoplasty and photography. Cadmium is an element that is harmful to human health, although it has benefits in the production of many products. It is one of the most dangerous heavy metal pollutants in the ecosystem. It is among the toxic metals for living organisms. The compounds are also highly toxic. Cadmium used in batteries shows carcinogenic effects. It is not an essential element for biological functions (Eskier, 2017).

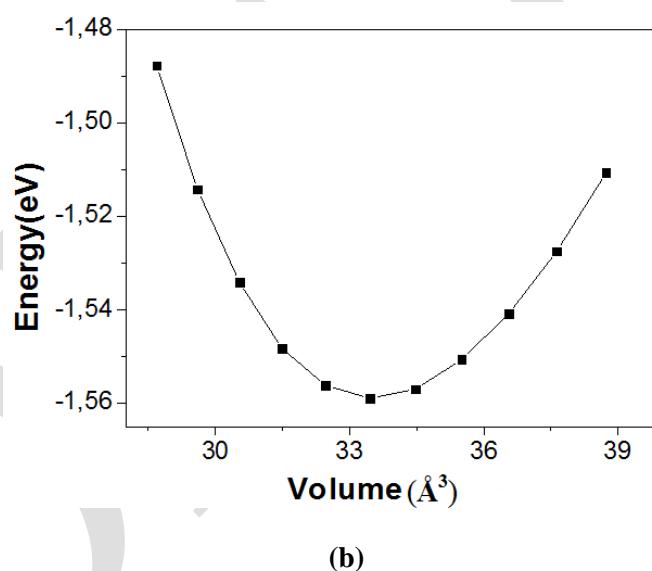
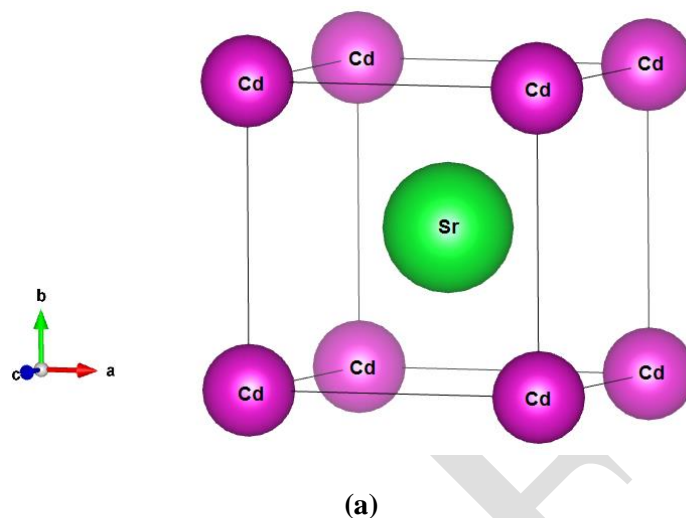
Strontium, which is the 15th most abundant element in the Earth's crust, is the substance that gives fireworks a red color. Consumption of strontium is usually strontium carbonate. It is widely used in high-voltage television tubes in the form of carbonate. Strontium is also used in the production of ceramic ferrites used in the automotive industry, iron ore separators, copiers and special alloys. Strontium with a large atomic radius is also used to neutralize x-rays. Strontium chromate, an important compound of strontium; It is used as a rust inhibitor in pigments, as a coloring agent in polyvinyl chloride resins, as a rust inhibitor in pyrotechnic applications, in aluminum flake coatings and in some alloys. Strontium is a trace element recommended for the treatment of osteoporosis (bone fragility, skeletal disease). The effect on the bone varies according to the dose. High doses of strontium disrupt bone mineralization. Low dose reduces bone resorption (Eskier, 2017). There are no any theoretical study of structural, elastic and electronic properties of intermetallic compound CdSr in B2 structure up to now. In this study, our aim is to fill deficiency in the literature about physical properties of this compound.

### MATERIALS AND METHODS

The density functional theory (DFT) (Hohenberg and Khon, 1964, Khon and Sham, 1965) has successfully been applied to the first principles calculations for ground state properties. In view of these circumstances, we have applied to the GGA (Generalized Gradient Approximation) (Perdew and Burke, 1996) for the exchange-correlation functional. All properties of calculations are investigated by using the Vienna Ab-initio Simulation Package (VASP) (Kresse and Hafner, 1993, Kresse and Hafner, 1994, Kresse and Furthmüller 1996, Kresse and Furthmüller, 1976). The plane-wave basis sets with energy cut-off 650 eV and the 16x16x16 Monkhorst and Pack (Monkhorst and Pack, 1976) k-points are used in the Brillouin zone for CdSr. The elastic properties are exploited to estimate with stress-strain method (Page and Saxe, 2002, Mehl et al., 1990)

## RESULTS and DISCUSSION

CdSr crystallizes in the cubic B2 structure with space group 221. The coordinates due to two atoms on CdSr are Cd = (0, 0, 0) and Sr = (0.5, 0.5, 0.5). as depicted in Figure 1. To determine the equilibrium geometry, we relaxed (ISIF=3 in VASP) the volume of unit cell and the all atomic positions. With the relaxed equilibrium lattice constant, the Murnaghan equation of state (Murnaghan, 1944) was fitted to the E (V) curves in order to determine the Bulk modulus (B), and its pressure derivative  $B' = dB/dP$ . The obtained results of investigated compound are given in Table 1 and compared with the other experimental result.



**Figure 32.** a) Crystal structure of CdSr compound, b) Total energies as a function of volume for CdSr compound

It is seen from Table I, calculated lattice constant  $a_0$ , Bulk module B and derivative of bulk module  $B'$  of CdSr compound is in good agreement with the experimental study.

**Table 1.** Lattice constant, Bulk module, first derivative bulk module and total energy of BaZn compound.

Structures	a (Å)	B(GPa)	$B'$	$V(\text{Å}^3)$	$E_{\text{tot}}(\text{ev})$
CdSr	4.05	24.75	4.22	67.08	-3.11
CdSr(exp.)	4.011				

The second order elastic constants for the CdSr compound have been calculated using stress-strain method in their B2-phase at ambient pressure. Our calculated elastic constant in cubic crystal fit in the mechanical stability criteria (Born and Huang, 1982), i. e.

$$C_{11} - C_{12} > 0 \quad C_{11} > 0 \quad C_{44} > 0 \quad C_{11} + 2C_{12} > 0 \quad C_{12} < B < C_{11}$$

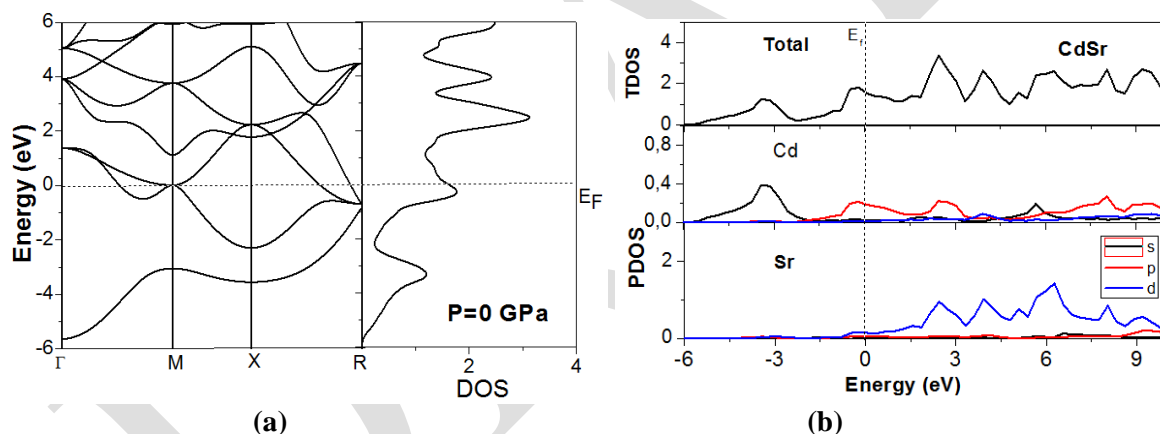
The elastic constants of  $C_{ij}$  are fundamental and indispensable for defining the mechanical properties of materials. For a crystal in the cubic structure,  $C_{11}$  characterizes the elasticity of the length, whereas  $C_{12}$  and  $C_{44}$  represent the elasticity of the shape (Prihodko et al., 2002). The results of calculated elastic constants are shown in Table II together with the other available theoretical data (Taylor and Kagle, 1963).

**Table 2.** Elastic constants  $C_{ij}$  (GPa) and bulk modulus  $B$  (GPa)

Material	$C_{11}$	$C_{12}$	$C_{44}$	$B$
CdSr	37	19.5	19.8	25.3

In order to make sense of the electronic behavior of CdSr compound, we have computed the electronic band structure as shown in Figure 2(a). Fermi level is set 0 eV. Our calculation shows that CdSr compound is of metallic character due to there is no band gap near the Fermi level.

The total and partial density of states are also plotted in Figure 2 (b). Valance band consists of Cd - s states. Conduction band, above the Fermi energy level, the major contribution comes from Cd p-states and Sr d-states.



**Figure 2.** Calculated (a) electronic band structure and (b) partial density of states for CdSr compound.

## CONCLUSION

First principle calculations have been made to study the structural, elastic and electronic properties of CdSr using VASP program. The ground state properties such as lattice constant is calculated and compared with the other experimental result. Calculated elastic constants obey the structural stability conditions. The computed band structures and density of states show that the studied CdSr compound is metallic in nature.

## REFERENCES

- Born M, Huang K 1982. Dynamical theory and experiment I. Berlin: Springer Verlag.  
 Eskier U, 2017. Kadmiyum nedir?. Available at: <http://www.makaleler.com/kadmiyum-nedir-ozellikleri-kullanimi-zararlari>  
 Eskier U, 2017. Stronsiyum nedir?. Available at: <http://www.makaleler.com/strosiyum-nedir>  
 Hohenberg P, Khon W 1964. Inhomogeneous Electron Gas. Phys. Rev. 136, B864.  
 Jain E, Pagare G, Chouhan S S, 2014. Full Potential Linearized Augmented Plane Wave (FP-LAPW) Study of Intermetallic Compound: BeCu. IJAECE. 3, 306-309.

- Khon W, Sham L J 1965. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects Phys. Rev. 140, A1133.
- Kresse G, Furthmüller J 1996. Efficiency of ab-initio total energy calculations for metals and semiconductors using a plane-wave basis set. Comput Mat Sci. 6:15–50.
- Kresse G, Furthmüller J 1996. Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set. Phys Rev B. 54:11169–11186.
- Kresse G, Hafner J 1993. Ab initio molecular dynamics for liquid metals. Phys Rev B. 47:558–561.
- Kresse G, Hafner J 1994. Ab initio molecular-dynamics simulation of the liquid-metal–amorphous-semiconductor transition in germanium. Phys Rev B. 49:14251–14269.
- Mehl M J, Osburn J E, Papaconstantopoulos D A, and Klein B M 1990. Structural properties of ordered high-melting-temperature intermetallic alloys from first-principles total-energy calculations. Phys. Rev. B, 41: 10311.
- Monkhorst H J and Pack J D 1976. Special points for Brillouin-zone integrations. Phys.Rev. B. 13:5188.
- Murnaghan F D 1944. The Compressibility of Media under Extreme Pressures. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 30: 244–247.
- Page L and Saxe P 2002. Symmetry-general least-squares extraction of elastic data for strained materials from ab initio calculations of stress. Phys. Rev. B, 65:104104.
- Perdew JP, Burke K 1996. Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple. Phys Rev Lett. 77:3865–3868.
- Prikhodko M, Miao M S , Lambrecht W R L. 2002. Pressure dependence of sound velocities in 3C–SiC and their relation to the high-pressure phase transition. Phys Rev B., 66: 125201.
- Taylor A, Kagle B J 1963. Crystallographic Data on Metal and Alloy structures, New York.

## Treatment of p-aminophenol production wastewater by electrochemical oxidation process using boron-doped diamond anode

Mihrican Yurtarslan<sup>1\*</sup>, Mehmet Kobya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gebze Technical University, Engineering Faculty, Environmental Engineering, Kocaeli, Turkey.

<sup>2</sup>Gebze Technical University, Engineering Faculty, Environmental Engineering, Kocaeli, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: myurtarslan@gtu.edu.tr

### Abstract

Pharmaceutical wastewater has complex pollutants to treat them effectively. Treatment of p-aminol production wastewater by electrochemical oxidation process was investigated in this paper. The effects of significant wastewater characteristics such as pH and conductivity, current density, and additive salt concentrations on the chemical oxygen demand (COD) and total organic carbon (TOC) removal efficiencies were researched. The removal efficiencies COD and TOC were high, being up to %95 and %93 respectively. Moreover, anode efficiency for each experiment set was calculated.

**Keywords:** Electrochemical oxidation, p-aminophenol wastewater, boron-doped diamond anode, the removal efficiency

### INTRODUCTION

Treatment of industrial effluents consisting of pharmaceuticals has usually been difficult to provide discharge standards. Phenols that are complex aromatic organic compounds are common pollutants in pharmaceutical wastewaters. These substances are highly toxic and phenolic substances affect the function of microbes in negatively. Hence, phenolic substances are impervious to biological degradation and, conventional wastewater treatment methods are ineffective for the removal of phenolic substances. (Rajkumar and Palanivelu, 2004; Ratiu et al., 2010; Tekin et al., 2006; Zhu et al., 2007)

In recent years, biological, physical, chemical treatment technologies and advanced oxidation processes (AOPs), which contain ozonation, photocatalytic oxidation, Fenton oxidation, wet air oxidation, and electrochemical oxidation, have been researched for the treatment of phenolic wastewater. Electrochemical oxidation is an optimistic alternative within these technologies with respect to simplicity, environmentally friendly, versatility, and oxidizing toxic complex organic substances easily. (Rajkumar and Palanivelu, 2004; Ratiu et al., 2010; Zhu et al., 2007) In the electrochemical oxidation process, using proper electrode material by analyzing the wastewater characteristics is critical for the success of the process. Different types of electrode materials have been studied with regard to the cost and process efficiency. Lately, boron-doped diamond (BDD) electrode is favorite anode material in electrochemical oxidation to treat phenolic wastewater. BDD electrode has various distinguished properties like high anodic stability, high corrosion stability in different media, strong oxidation potential. In addition to this, the BDD electrode is very successful for the complete mineralization of organics to CO<sub>2</sub> with acceptable potentials or current densities. (Britto-Costa and Ruotolo, 2012; Iniesta et al., 2001; Polcaro et al., 2003; Ratiu et al., 2010; Zhu et al., 2007)

Electrochemical oxidation has been confirmed to be an effective alternative for the removal of pollutants from wastewater. Different types of wastewater were studied in the literature by using electrochemical oxidation methods such as domestic wastewater (Vlyssides et al., 2002), industrial wastewater (Rajkumar and Palanivelu, 2004), oily wastewater (Cañizares et al., 2007), paint wastewater (Körbahti et al., 2007), phenolic wastewater (Comninellis and Nerini, 1995; Comninellis and Pulgarin, 1993) and textile wastewater (Radha et al., 2009)

Although an exciting amount of research for the treatment of industrial wastewaters was studied in the literature, treatment of phenolic wastewater is still an issue. The reason for this, most of the researches were done with synthetic wastewaters and most of the time, results do not make an agreement for the real phenolic wastewater. Therefore, the purpose of this study is to treat phenolic wastewater by electrochemical oxidation and investigate the effects of different process parameters like pH of wastewater, current density, and additive salt concentration on the chemical oxygen demand and total organic carbon rates.

## MATERIALS AND METHODS

### Wastewater source and characterization of produced wastewater

The wastewater, which is used in this study, was founded from a pharmaceutical factory placed in the city of Gebze. The factory products paracetamol. To produce paracetamol, primarily, the factory products p-aminophenol (PAP) which is the raw substance of paracetamol, by using catalytic hydrogenation process. At the end of the hydrogenation process, the wastewater that contains very high concentrations of p-aminophenol is produced. Then, p-aminophenol is converted to paracetamol by acetylation reaction. In this work, p-aminophenol wastewater that has a dark color and disgusting odor is treated by using electrochemical oxidation process. The wastewater consists of organic, inorganic and suspended compounds. Characteristics of PAP wastewater are like this: chemical oxygen demand (COD) around 70,000 mg/L, total oxygen demand (TOC) about 23,000 mg/L, initial pH 5.5-6.5 and initial conductivity 119.7 mS/cm.

### Experimental set-up and procedure

The experiments were performed by batch processes. Before starting the experiments, the wastewater was filtered by using a roughing filter to remove PAP residuals. Then, filtered wastewater was diluted in different dilution ratios and one liter of it was taken into a beaker. An electrode that comprises of BDD anode and stainless-steel cathode were submerged to the wastewater. The electrode was attached to a dc digital power supply (6675A DC Power Supply). In the experiments, the effects of different current densities, the presence of the changed amount of salt, and alteration of pH were observed. All tests were accomplished at constant temperature (25 °C) and mixing speed (400 rpm). At the end of the test, the solution was filtered, and the necessary analyses were done. The used electrode materials were washed methodically with water and phosphoric acid to eliminate solid residuals on the surfaces. (Kobyta et al., 2006)

### Analytical procedures

Chemical oxygen demand, total organic carbon, conductivity, and pH were determined according to Standard Methods. (APHA, 2012) COD of the samples that were taken at intervals during electrolysis was conducted by using COD reactor (WTW Thermoreactor CR3000). TOC of the samples that were taken at intervals during electrolysis was conducted by using Shimadzu TOC-L. The pH was assessed by pH meter (Mettler Toledo, S220 SevenCompact pH/ion). The conductivity was measured by a conductivity meter (Mettler Toledo, SG7-SevenGo pro conductivity).

For the calculation of removal efficiency, the following formula is expressed as a percentage and defined: (M. Kobyta et al., 2009)

$$\text{Removal Efficiency} = [(C_0 - C_t) / C_0] * 100 \quad (1)$$

At the end of the experiments, electrical energy consumption (kWh/m<sup>3</sup>) was calculated according to the following formula:

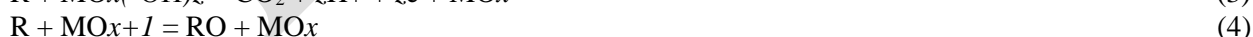
$$\text{Electrical Energy Consumption} = U * I * t / v \quad (2)$$

where U is cell voltage (V), t is operating time (s), I is current (A) and v is the volume of wastewater (m<sup>3</sup>). (Gengec, 2017)

### A brief description of EO

Electrochemical oxidation of contaminants can happen with two oxidation mechanisms as follows:

Direct oxidation (Anodic oxidation): Contaminants are electro oxidized on anodes by producing adsorbed hydroxyl radicals. Oxidation happens in two steps: diffusion of contaminants from solution to the anode surface and oxidation of contaminants on the anode surface. The reactions that take place in the process are like this:



where R is the organic compound and MO<sub>x</sub>+I is the chemisorbed active oxygen. (Anglada et al., 2009; Chen, 2004)

Indirect oxidation: In this process, a strong oxidizing agent is produced at the anode surface then this agent destroys the contaminants in the solution. The most common oxidant is chlorine, which is generated at the anode surface. (Anglada et al., 2009)

## RESULTS and DISCUSSION

### Effect of pH

The pH of wastewater impacts chemical properties of pollutants and also, the interaction of pollutants with BDD electrode in the EO process. (Gengec, 2017) Therefore, the effect of initial pH on the treatment of PAP wastewater was analyzed at constant operating conditions (current density: 75 mA/cm<sup>2</sup>, initial COD: 70,000 mg/L, initial TOC: 23,000 mg/L and EO time: 240 min.). To investigate the effect of pH, experiments were

accomplished at different pH values (3-6-9). The removal efficiencies of COD and TOC were observed with respect to changing the initial pH. The COD removal efficiency was increased almost continuously within operating time as shown in Figure 1-(a) and best COD removal rate was obtained at pH 9, 95%. However, for TOC reduction, pH had a remarkable effect as shown in Figure 1-(b). While at pH 9, 93 % of TOC was removed, at the original pH value (pH 6) of wastewater TOC removal rate was stayed around 70 %. The maximum removal efficiencies were acquired for COD (95 %) and TOC (93 %) at pH 9. Therefore, the optimum pH range depends on the nature of wastewater.

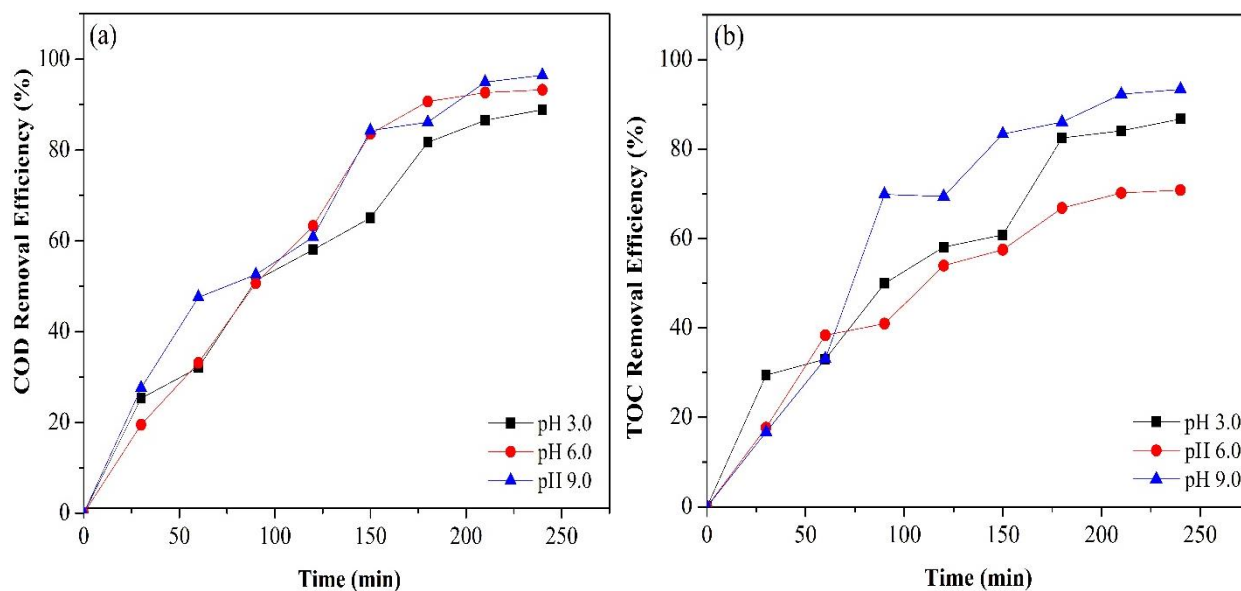
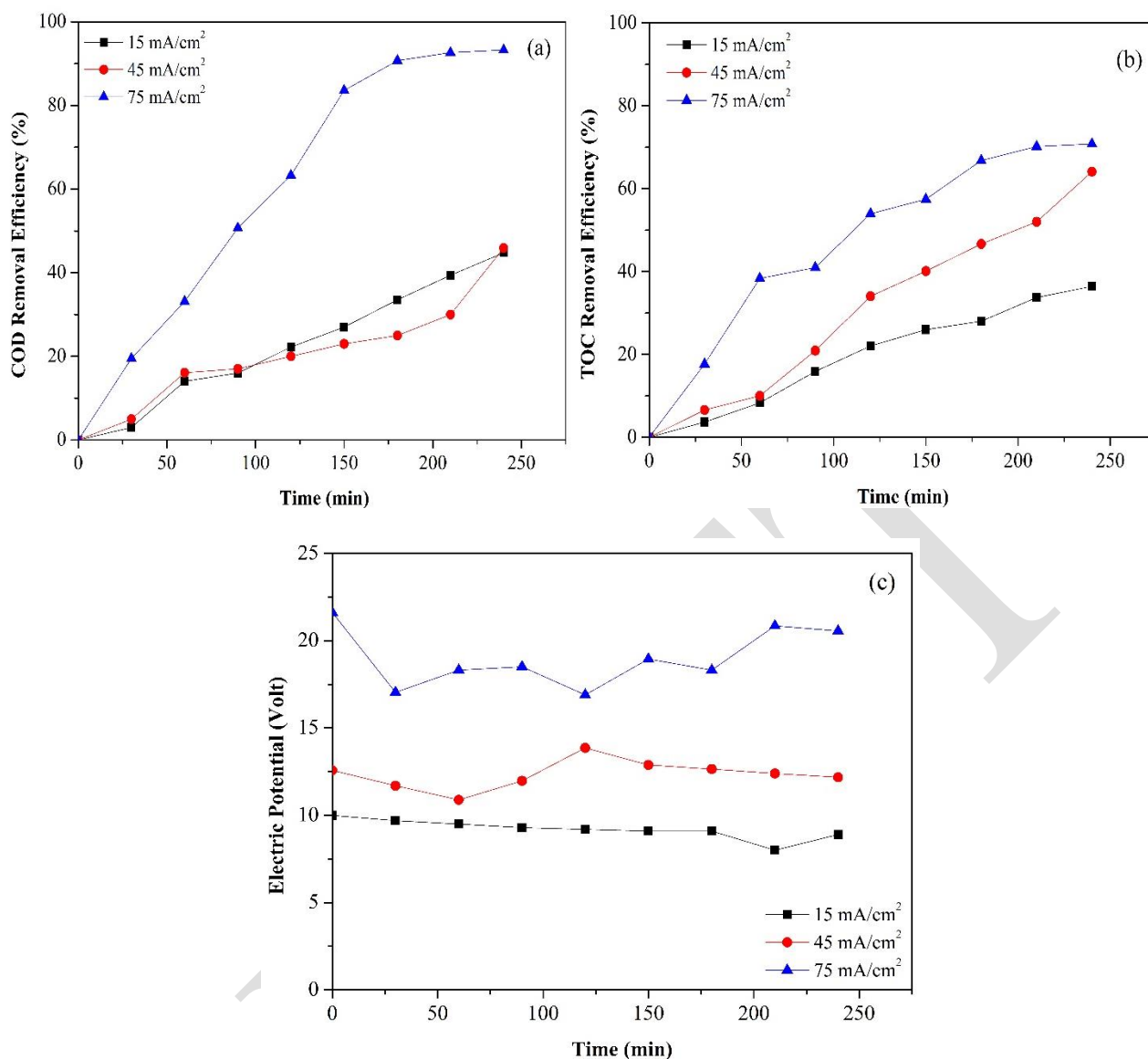


Figure 1. Effect of pH on (a) COD removal, (b) TOC removal

#### Effect of current density

Current density is one of the most important parameters with respect to altering the degradation rate and reaction rate. (Gengec, 2017) Figure 2-(a) and (b) represent the effects of the current density on COD and TOC removal efficiencies, with pH: 6.0, initial COD: 70,000 mg/L, initial TOC: 23,000 mg/L and EO time: 240 min. Generally the higher the applied current, the higher the efficiency of COD and TOC removal. When 15, 45 and 75 mA/cm<sup>2</sup> current densities were applied, the removal efficiencies were 45 %, 46 % and 93 % for COD and 36%, 64 % and 70 % for TOC. The increase in the current density generates more OH radicals on the BDD anode and that means higher removal efficiency. (Gengec, 2017)

Current efficiency also affects the electrical consumption as seen in Figure 2-(c). With increasing current efficiency, 15 mA/cm<sup>2</sup> to 75 mA/cm<sup>2</sup>, electrical consumption was raised to 35.60 kWh/m<sup>3</sup> to 364.88 kWh/m<sup>3</sup> (average volt 8.9 to 20.85). (Gengec, 2017)



**Figure 2.** Effect of current density on (a) COD removal, (b) TOC removal and (c) electric potential

Current density had an impact on anode efficiency. In the less current density, BDD anode was more efficient. The reason for that could be the increasing difficulty in the oxidation of inorganics and residuals with raising current density.

**Table 1.** Calculation of BDD efficiency

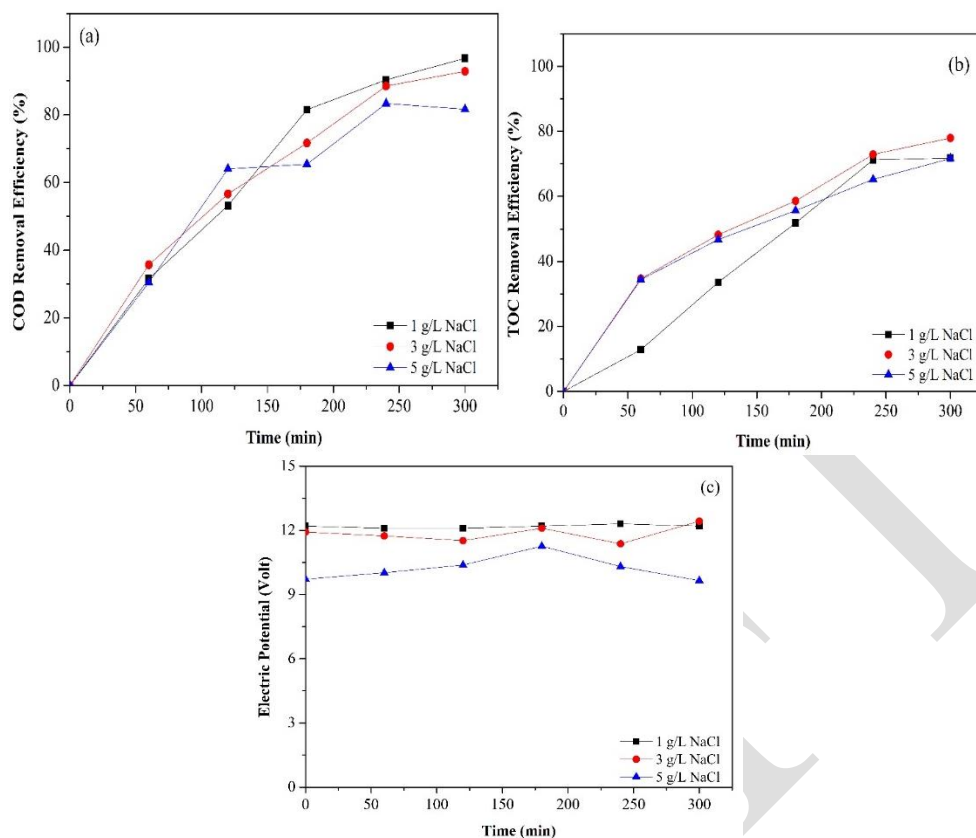
Current Density (mA/cm <sup>2</sup> )	BDD Efficiency (mg CODr / Ah cm <sup>2</sup> )	BDD Efficiency (mg TOCr / Ah cm <sup>2</sup> )
15	91,11	22,8
45	30,3	13,9
75	40,88	13,15

### Effect of additive salt concentration

In order to decrease electrical consumption and increase the removal efficiencies, the effect of additive salt concentration on the treatment of PAP wastewater was analyzed at constant operating conditions (pH: 6.0, current density: 45 mA/cm<sup>2</sup>, initial COD: 70,000 mg/L, initial TOC: 23,000 mg/L and EO time: 300 min.). The conductivity of the wastewater was changed to the desired levels by adding the different amount (1g/L, 3 g/L and 5 g/L) of NaCl. As seen in Figure 3-(a) and (b), while best COD removal efficiency was obtained with 1 g/L NaCl addition, 96%, TOC reduction performance stayed around 70 %. In Figure 3-(c), electrical



consumption was decreased according to Figure 2-(c). Therefore, increasing salt concentration contributed to decreasing electrical consumption.



**Figure 3.** Effect of additive salt concentration on (a) COD removal, (b) TOC removal and (c) electric potential

### Comparison with literature

As seen in Table 2, phenol, paracetamol, and derivatives are treated using advanced electrochemical oxidation (AEO) method with different types of electrodes in the literature. COD and TOC are parameters to determine the removal efficiencies. COD and TOC removal efficiencies are changing within 41-95 % and 80-100 %, respectively. However, most of the studies in the literature carried with synthetic wastewaters and obtained good removal efficiencies. While this study carried out with real PAP wastewater, removal efficiencies are remarkable.

**Table 2.** Comparison of phenol degradation using the same treatment method with literature

Type of wastewater	Treatment Method	Removal Efficiency	Reference
Aqueous phenol solution	AEO (with Ti/PbO <sub>2</sub> electrode)	86 % TOC, 91 % COD	(Duan et al., 2013)
Aqueous phenol solution	AEO (with Ti/PbO <sub>2</sub> - Sn electrode)	41.2 % COD	(Li et al., 2013)
Aqueous phenol solution	AEO (with Ti/PbO <sub>2</sub> electrode)	90 % TOC, 78 % COD	(Saratale et al., 2015)
Synthetic paracetamol wastewater	AEO	100 % TOC	(Dalgic et al, 2017)
Synthetic paracetamol wastewater	AEO	80-99 % TOC	(Dalgic et al., 2017)
Aqueous phenol solution	AEO (with BDD electrode)	52 % COD	(Britto-Costa and Ruotolo, 2012)
Real PAP wastewater	AEO (with BDD electrode)	93 % TOC, 95 % COD	Present study

## CONCLUSION

The electrochemical oxidation process was studied to treat p-aminophenol wastewater using BDD anode. The satisfactory removal efficiencies were caught under the following conditions, pH 9, 75 mA/cm<sup>2</sup> and 240 min. for operating time. In order to decrease electrical consumption, the salt (electrolyte) addition was essential. This study gives remarkable information about the treatment of real PAP wastewater.

## REFERENCES

- Anglada Á, Urtiaga A, Ortiz I 2009. Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: Fundamentals and review of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(12): 1747–1755.
- APHA (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22<sup>nd</sup> Edition, American Public Health Association, Water Environment Federation.
- Britto-Costa PH., Ruotolo LAM 2012. Phenol removal from wastewaters by electrochemical oxidation using boron-doped diamond (BDD) and Ti/Ti<sub>0.7</sub>Ru<sub>0.3</sub>O<sub>2</sub> DSA electrodes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(04): 763–773.
- Cañizares P, Martínez F, Lobato J, Rodrigo MA 2007. Break up of oil-in-water emulsions by electrochemical techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 145(1–2): 233–240.
- Chen G 2004. Electrochemical technologies in wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, 38(1): 11–41.
- Comninellis C, Nerini A 1995. Anodic oxidation of phenol in the presence of NaCl for wastewater treatment. *Journal of Applied Electrochemistry*, 25(1): 23–28.
- Comninellis C, Pulgarin C 1993. Electrochemical oxidation of phenol for wastewater treatment using SnO<sub>2</sub> anodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 23(2): 108–112.
- Dalgic G, Türkdoğan FI, Yetilmezsoy K, Kocak E 2017. Treatment of real paracetamol wastewater by fenton process. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 23(2): 177–186.
- Duan X, Ma F, Yuan Z, Jin X, Chang L 2013. Electrochemical degradation of phenol in aqueous solution using PbO<sub>2</sub> anode. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(1): 95–102.
- Gengec E 2017. Treatment of highly toxic cardboard plant wastewater by a combination of electrocoagulation and electrooxidation processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(6): 184–192.
- Iniesta J, Michaud P, Panizza M, Cerisola G, Aldaz A, Comninellis C 2001. Electrochemical oxidation of phenol at boron-doped diamond electrode. *Electrochimica Acta*, 46: 3573–3578.
- Kobyas M, Demirbas E, Akyol A 2009. Electrochemical treatment and operating cost analysis of textile wastewater using sacrificial iron electrodes. *Water Science and Technology*, 60(9): 2261–2270.
- Kobyas M, Senturk E, Bayramoglu M 2006. Treatment of poultry slaughterhouse wastewaters by electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, 133(1–3): 172–176.
- Körbahti BK, Aktaş N, Tanyolaç A 2007. Optimization of electrochemical treatment of industrial paint wastewater with response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 148(1–2), 83–90.
- Li H, Chen Y, Zhang Y, Han W, Sun X, Li J, Wang L 2013. Preparation of Ti/PbO<sub>2</sub>-Sn anodes for electrochemical degradation of phenol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 689: 193–200.
- Polcaro AM, Vacca A, Palmas S, Mascia M 2003. Electrochemical treatment of wastewater containing phenolic compounds: oxidation at boron-doped diamond electrodes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 33: 885–892.
- Radha KV, Sridevi V, Kalaivani K 2009. Electrochemical oxidation for the treatment of textile industry wastewater. *Bioresource Technology*, 100(2): 987–990.
- Rajkumar D, Palanivelu K (2004). Electrochemical treatment of industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 113: 123–129.
- Ratiu C, Manea F, Lazau C, Grozescu I, Radovan C, Schoonman J 2010. Electrochemical oxidation of p-aminophenol from water with boron-doped diamond anodes and assisted photocatalytically by TiO<sub>2</sub>-supported zeolite. *Desalination*, 260(1–3): 51–56.
- Saratale RG, Hwang KJ, Song JY, Saratale GD, Kim DS 2015. Electrochemical oxidation of phenol for wastewater treatment using Ti/PbO<sub>2</sub> electrode. *Journal of Environmental Engineering*, 142(2): 1–9.
- Tekin H, Bilkay O, Ataber SS, Balta TH, Ceribas IH, Sanin FD, Yetis U 2006. Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 136(2): 258–265.
- Vlyssides AG, Karlis PK, Rori N, Zorpas AA 2002. Electrochemical treatment in relation to pH of domestic wastewater using Ti/Pt electrodes. *Journal of Hazardous Materials*, 95(1–2), 215–226.
- Zhu X, Shi S, Wei J, Lv F, Zhao H, Kong J 2007. Electrochemical oxidation characteristics of p-substituted phenols using a boron-doped diamond electrode. *Environmental Science & Technology*, 41(18): 6541–6546.

## Removal of Cu(II) from aqueous solutions by wheat bran biomass as a low cost biosorbent

Neşe Ertugay

Department of Civil Engineering, Erzincan Binali Yıldırım University, Erzincan, Turkey

Corresponding author e-mail: nertugay@erzincan.edu.tr

### Abstract

In this study, wheat bran biomass was used for Cu(II) removal in the batch condidation from aqueous solutions. Experiments were performed to evaluate the effect of contact time, pH, biosorbent dosage, initial Cu(II) concentration and temperature on the Cu(II) removal. The results indicated that a contact time of 60 minutes, a dose of 3 g L<sup>-1</sup> of biosorbents in solutions with an initial pH of 7.0, an initial Cu(II) concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> and 25 °C temperature resulted in the maximum Cu(II) removal efficiency. The successful removal of Cu(II) from the studied water samples indicates that wheat bran biomass can be used efficiently for pollution remediation of fresh water from Cu(II) and removal efficiency of 95.7% was obtained.

**Keywords:** Biosorption, heavy metal removal, wheat bran, Cu(II)

### 1. Introduction:

As a result of the development of the modern industrial economy, the discharge of heavy metal sewage is becoming more and more serious, which has a great threat to biological health and the environment. Heavy metals such as lead, copper, cadmium, zinc, mercury, chromium and so on, are characterized by their high toxicity, bio-enrichment, and the hard degradable natural degradati- tion process, so the treatment of heavy metal sewage is particularly urgent (Chu et al. 2019). Cu(II) is regarded as one of the important and hazardous inorganic contaminants that can be accumulated in human bodies throughout the food chain and cause various diseases such as nausea and stomach ache (Hosseini, Shokri, and Karami 2019). The World Health Organization recommends that permissible limit of copper ions in drinking water should be <2mg/L. Different techniques have been developed for the removal of heavy metals from polluted water including chemical precipitation, ion exchange, membrane separation, reverse osmosis, solvent extraction, adsorption, etc. (Ahmadpoor, Shojaosadati, and Mousavi 2019). Among all of these adsorption technique is one of the common, in terms of its low cost and operational value. Other advantages of adsorption include the flexibility in the selection of the adequate adsorbent and the possibility of enriching the trace metal amounts (Ahmad et al. 2016). However, some effective industrial adsorbents, such as resin and activated carbon have a high price and restricted their applications in treatment of large scale wastewater. Hence, the preparation of an effective absorbent with abundant, inexpensive and renewable raw material sources has been the focus of considerable studies.(B. Li et al. 2019). Various materials, including zeolite, agricultural wastes, activated carbon and modified silica gel have been studied for Cu(II) ions adsorption from aqueous solutions. However, a couple of key issues, such as slow adsorption kinetics and low adsorption capacity, limit the practical applications of these materials. Hence, the development of a cost effective and highly efficient sorbent to remove Cu(II) ions from contaminated water is highly desirable (M. Li et al. 2019). Wheat Bran biomass is abundant in nature, it is cheap and easy to get. It is an environmentally friendly natural adsorbent for wastewater treatment.

In this study, is to investigate the possible use of wheat bran as an alternative biosorbent material for removal of Cu(II) ions from aqueous solutions. The study investigated effects of contact time, adsorbent concentration, initial metal ion concentration, temperature of solution and pH on the removal of Cu(II).

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used in this study were of analytical grade. Sodium diethyl dithiocarbamate, ammonia (NH<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and NaOH were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solution of Cu(II) was prepared using CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O obtained from Sigma-Aldrich. Wheat bran of biomass was taken from the Erzincan flour factory used in this investigation as an adsorbent. Before use, it was dried at 80 °C for 24 h.

#### 2.2. Batch sorption experiments

The batch biosorption experiments were carried out in 250 ml erlenmeyers containing 100 ml Cu(II) on a rotary shaker at 150 rpm at a temperature of 25 °C. The samples were taken at definite time intervals (at 3, 5, 10, 15, 20, 30 and 60) and were filtered to remove biomass with filter paper (0.45 µm membran filter). The

Cu(II) in the remaining solution was then analyzed spectrophotometrically at 460 nm using sodium diethyl dithiocarbamate reagent in 1.5 N NH<sub>3</sub> as the complexing agent for Cu(II) (Ertugay and Bayhan 2010).

Adsorption capacity of the adsorbent was calculated according to the following Eq. (1): (Wu et al. 2019)

$$q_e = \frac{C_o - C_e}{m} * V \quad (1)$$

where  $q_e$  (mg/g) is the amount of Cu(II) ion adsorbed at equilibrium,  $C_o$  and  $C_e$  (mg/L) are the initial and the equilibrium concentration of Cu(II) ion in the solution,  $m$  (g) is the weight of dried adsorbents used,  $V$  (L) is the volume of solution.

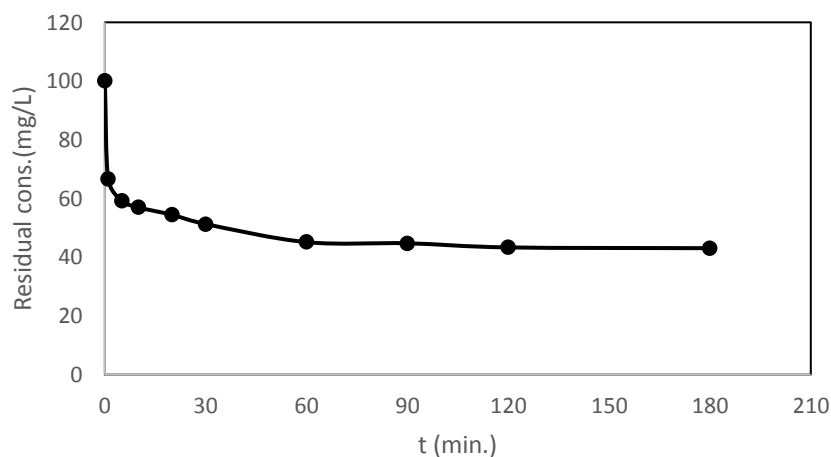
The removal rate of Cu (II) was then measured by Eq. (2): (Hosseini, Shokri, and Karami 2019)

$$\text{Removal \%} = \frac{C_o - C_e}{C_o} * 100 \quad (2)$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of contact time on adsorption of Cu(II)

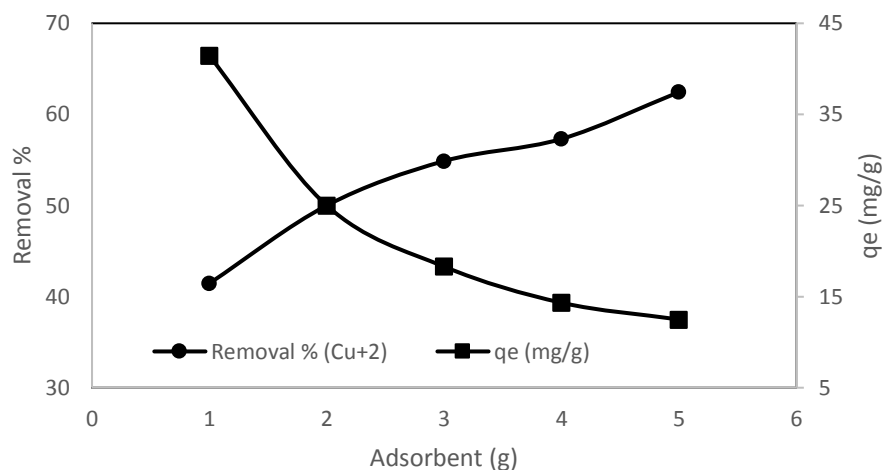
0.3 g adsorbent was added to 100 mL 100 mg/L Cu(II) solution. The natural pH value was 5,4, and the effect of contact time on the adsorption was studied. As can be seen in Fig. 1, the adsorption amount increased with the contact time increases. Adsorption capacity rose rapidly in the first minutes and reached balance quickly. At equilibrium, the maximum adsorption amounts of Cu(II) were 54.87% at 60 minutes.



**Figure 1.** Effect of contact time on Cu(II) adsorption ( $C_o=100$  mg/L, adsorbent dosage=3g/L,  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=5,4$  (natural)).

#### 3.2. The effect of adsorbent dose on adsorption of Cu(II)

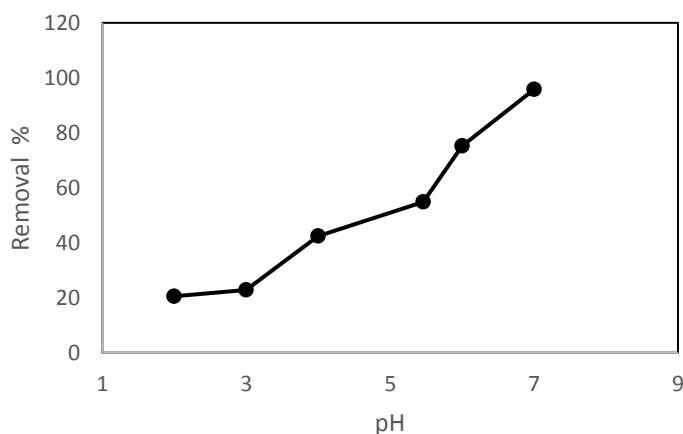
To get the impact of adsorbent amount on removal of Cu (II), different amounts of wheat bran (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g) were put into Cu (II) solution (100 mL, 100 mg/L, pH 5,4(natural)). Adsorption experiments were taken for 60 min. at  $25^\circ\text{C}$ . The obtained results have been indicated in Fig. 2. It was found that the removal rate increased with the wheat bran dose rising due to increase in adsorption sites. However, the amount of Cu (II) adsorbed per unit weight of the adsorbent decreased. This was due to the reason that as adsorbent dose increased active sites responsible for adsorption remain unoccupied as the concentration of metal ions remained constant while active sites keep on increasing. Consequently, all the following experiments went on using 0.3 g of the adsorbent dosage (Hosseini, Shokri, and Karami 2019).



**Figure 2.** The effect of adsorbent dose on adsorption of Cu(II) ( $C_0=100$  mg/L,  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=5,4$  (natural),  $t=60$  min.).

### 3.3. The effect of pH on adsorption of Cu(II)

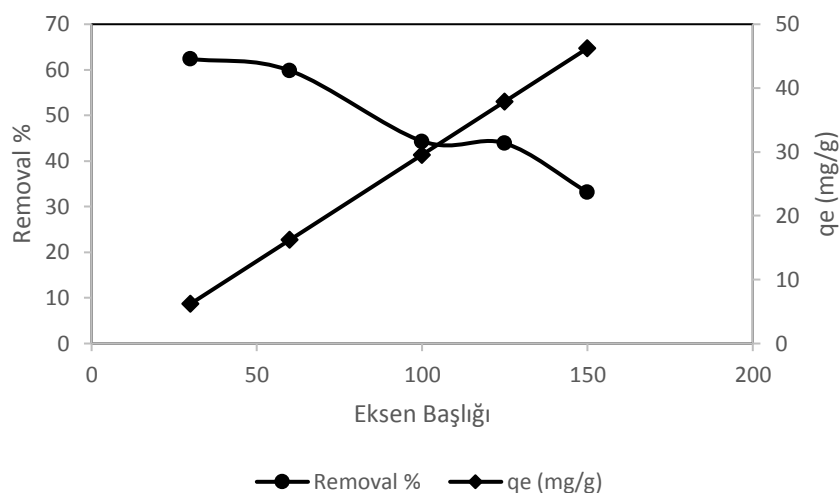
The pH value is the most important factor influencing heavy metal adsorption. Fig. 3 displays the effect of pH on Cu(II) adsorption. The pH of the metal solution was varied from 2 to 7. In this study, 0.3 g wheat brain was added to 100 mL, 100 mg/L Cu(II) solution. As shown in Fig. 3, the adsorption increases as pH changed from 1 to 7. At  $\text{pH}=2$ , Cu(II) uptake (20.5%) was inhibited due to higher  $\text{H}^+$  concentration, masking the adsorbent surface and repelling Cu(II) ions. At  $\text{pH}=3$ , Cu(II) adsorption slightly increased to 22.8%. However, when pH was set to 5,4, Cu(II) uptake increased to 54%. Increase in Cu(II) uptake at higher pH occurred as a result of lesser  $\text{H}^+$  ions in the solution. The percent adsorption of Cu(II) continued to increase (95.7%) up to pH 7 (Khatoun and Khan Rao 2019).



**Figure 3.** The effect of pH on adsorption of Cu(II) ( $C_0=100$  mg/L, adsorbent dosage=3g/L,  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $t=60$  min.).

### 3.4. The effect of concentration on adsorption of Cu(II)

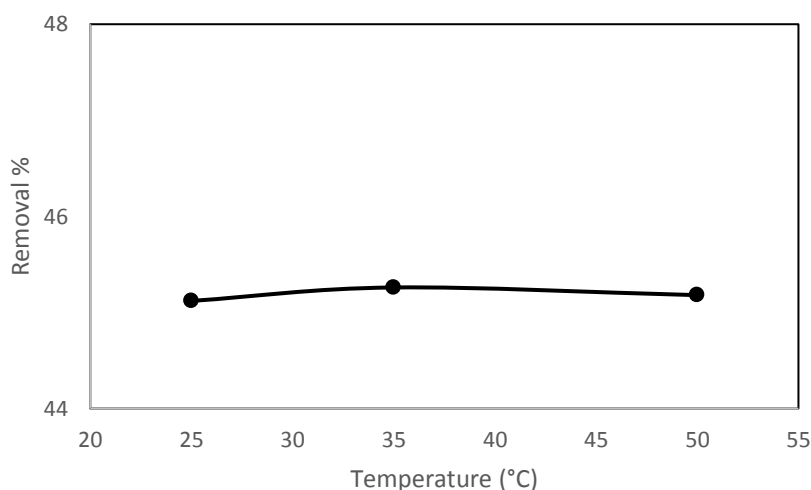
The initial heavy metal ions concentrations in aqueous solutions play a vital role as a favorable driving force in conquering mass transfer resistance of metal ions between the aqueous and solid biosorbents (Liu et al. 2016). As shown in Fig. 4, the adsorption capacity of the biomass increased from 6 to 42 with increasing Cu(II) concentration, however, the percentage removal of Cu(II) decreased from 62.4 to 33. The higher removal of Cu(II) at low concentration might be attributed to the availability of more active sites on the surface of the biosorbents, while the lower removal of Cu(II) at high concentration may be due to the lack of available active sites on the surface of biosorbents (Wang et al. 2018).



**Figure 4.** The effect of Cu(II) concentration on adsorption of Cu(II) (adsorbent dosage=3g/L,, T=25°C, pH=5,4 (natural), t=60 min.).

### 3.5. The effect of temperature on adsorption of Cu(II)

Temperature dependence of Cu (II) adsorption on wheat bran was carried out at 25, 35 and 50°C as shown in Fig. 5. It was found that the adsorption capacity did not change with the increase in temperature from 25 to 50 °C for an initial concentration of 100 mg/L/ and adsorbent dosage 0.3 g/100 mL.



**Figure 5.** The effect of temperature on adsorption of Cu(II) (Co=100 mg/L, adsorbent dosage=3g/L, pH=5,4 (natural), t=60 min.).

## 4. Conclusion

The results indicate that wheat bran biomass could act as an effective and potentially low-cost adsorbent for Cu(II) removal from aqueous solution. The equilibrium time for adsorption of Cu(II) ions from aqueous solutions was achieved within 60 min contact time. The Cu(II) removal efficiencies with wheat bran were found to be greatly dependent on solution pH and the maximum removal of 95.7 occurred at pH 7.0. The sorption capacity was found to increase with the increase of Cu(II) concentration. The adsorption capacity decreased as the adsorbent concentration increased. This adsorbent offers an alternative material for chemical remediation and is economically viable and environmental friendly.

## References

- Ahmad, Mudasir, Kaiser Manzoor, Perumal Venkatachalam, and Saiqa Ikram. 2016. "Kinetic and Thermodynamic Evaluation of Adsorption of Cu(II) by Thiosemicarbazide Chitosan." *International Journal of Biological Macromolecules* 92: 910–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.075>.
- Ahmadpoor, Fatemeh, Seyed Abbas Shojaosadati, and Seyedeh Zahra Mousavi. 2019. "Magnetic Silica Coated Iron Carbide/alginate Beads: Synthesis and Application for Adsorption of Cu (II) from Aqueous Solutions." *International Journal of Biological Macromolecules* 128: 941–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.173>.
- Chu, Yuting et al. 2019. "Kinetics and Equilibrium Isotherms of Adsorption of Pb(II) and Cu(II) onto Raw and Arginine-Modified Montmorillonite." *Advanced Powder Technology* 30(5): 1067–78. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2019.03.002>.
- Ertugay, N., and Y.K. Bayhan. 2010. "The Removal of Copper (II) Ion by Using Mushroom Biomass (*Agaricus Bisporus*) and Kinetic Modelling." *Desalination* 255(1–3).
- Hosseini, Seyed Ali, Zahra Shokri, and Shiva Karami. 2019. "Adsorption of Cu(II) to mGO@Urea and Its Application for the Catalytic Reduction of 4-NP." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 75: 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.02.010>.
- Khatoon, Amna, and Rifaqat Ali Khan Rao. 2019. "Efficient Cu(II) Adsorption from Aqueous Medium Using Organic-Inorganic Nanocomposite Material." *Groundwater for Sustainable Development* 9(March): 100214. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2019.100214>.
- Li, Bing et al. 2019. "The Polyaminocarboxylated Modified Hydrochar for Efficient Capturing Methylene Blue and Cu(II) from Water." *Bioresource Technology* 275(October 2018): 360–67.
- Li, Min et al. 2019. "Amino Group Functionalized SiO<sub>2</sub>@graphene Oxide for Efficient Removal of Cu(II) from Aqueous Solutions." *Chemical Engineering Research and Design* 145(Ii): 235–44. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.03.028>.
- Liu, Huan et al. 2016. "Effect of Anions on the Polymerization and Adsorption Processes of Cu(II) Ion-Imprinted Polymers." *Chemical Engineering Journal* 303: 348–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.06.004>.
- Wang, Guiyin et al. 2018. "Removal of Pb(II) from Aqueous Solutions by *Phytolacca Americana* L. Biomass as a Low Cost Biosorbent." *Arabian Journal of Chemistry* 11(1): 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.011>.
- Wu, Jianming, Xi Cheng, Yulin Li, and Guisheng Yang. 2019. "Constructing Biodegradable Nanochitin-Contained Chitosan Hydrogel Beads for Fast and Efficient Removal of Cu(II) from Aqueous Solution." *Carbohydrate Polymers* 211(August 2018): 152–60. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.004>.

## PLA-PMMA karışımlarından gözenekli polimerik filmlerin nefes figürü yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu

İpek Kazan<sup>1</sup>, İkrime Orkan Uçar<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kompozit Malzeme Teknolojileri Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup>Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Düzce, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ikrimeucar@duzce.edu.tr

### Özet

Nemi sabitlenmiş bir ortama bırakılan katı bir yüzey üzerine dökülen polimer çözeltisinin içerdiği polimerin buharlaşması sırasında ortamdaki nemin yüzeye kondense olması ilkesine dayanan Nefes Figürü (Breath Figure) yöntemi, mikro veya nano ölçekte düzgün gözeneklere sahip polimerik filmler elde etme amaçlı kullanılmakta olup, ucuz olması ve pahalı ekipmanlar gerektirmemesi açısından bilinen pahalı litografik tekniklere alternatif olarak tercih edilebilecek bir metottür. Kullanılan polimerlerin sahip olduğu özelliklere göre bu tip yüzeyler seçimli adsorpsiyonun tercih edildiği bir implant malzemenin yüzeyinin sentezinde kullanılabileceği gibi, tümüyle tutunmanın veya tutunmamanın istendiği fonksiyonellikte biyomedikal amaçlı yüzeylerin sentezinde de tercih edilebilir. Bu çalışmada belirli nem ve sıcaklık değerlerine sahip statik koşullar altında farklı konsantrasyonlarda kloroform çözütüsü içerisinde hazırlanan Poli(laktik asit) (PLA), Poli(metil metakrilat) (PMMA) polimerlerinden ve bunların %50-%50 karışımlarından teflon yüzeyler üzerinde belirli geometride, mikro ölçekte, düzgün gözeneklere sahip polimerik filmlerin sentezi için gerekli optimum koşulların belirlenmesi, nem değişimine bağlı gerçekleşen gözenek çapı değişimi ve elde edilen bu filmlerin ıslatılabilirlikleri incelenmiştir. Gözenekli polimerik yüzeylerin morfolojisi ve kimyasal heterojenliği optik mikroskop ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nefes Figürü Yöntemi, Gözenekli Polimerik Yüzeyler, Poli(laktik asit) (PLA), Poli(metil metakrilat) (PMMA).

### Synthesis and characterization of porous polymeric films from PLA-PMMA blends by breath figure method

#### Abstract

The Breath Figure Method, based on the principle of condensation of moisture in the environment during evaporation of the solvent contained in a polymer solution deposited onto a solid surface, is used to obtain polymeric films with smooth pores on a micro or nanoscale scale. It is an alternative to expensive lithographic techniques, which are known to avoid expensive equipment. According to the properties of the polymers used, such surfaces may be used in the synthesis of the surface of an implant material in which selective adsorption is preferred, or in the synthesis of surfaces intended for biomedical purposes with the functionality to which the total affinity or non-adhesion is desired. In this study, poly (lactic acid) (PLA), poly (methyl methacrylate) (PMMA) polymers and their %50-%50 blends prepared in different concentrations in chloroform solvent under certain static conditions with specific humidity and temperature values on a teflon surface. The determination of optimum conditions for the synthesis of polymeric films with regular pores, the change in the pore diameter due to moisture change and the wettability of these films were investigated. The morphology and chemical heterogeneity of the porous polymeric surfaces were characterized by optical microscope and contact angle measurements.

**Keywords:** Breath Figure Method, Porous Polymeric Surfaces, Poly(lactic acid) (PLA), Poly(methyl methacrylate) (PMMA).

### GİRİŞ

Nefes figürü denilen yapılanma, soğuk bir yüzeye soluklandığında oluşan sistir ve üretim şekline göre isimlendirilir. Nefes figürlerinin oluşum mekanizması ilk olarak 1893'te Aitken sonrasında 1911'de Lord Rayleigh tarafından keşfedildi (Aitken, 1893; Rayleigh, 1911). Yüzeyin ıslatılabilirlik özelliklerine bağlı olarak yüzeye kondense olan sıvı damlası ya uniform bir film oluşturur ya da yüzey üzerinde dizilmiş damlacıklar oluşturur (Baker, 1922). Bu yöntem çok uzun zaman cam yüzeylerin temizliğini tespit etme amaçlı kullanılmıştır. Gerçekte insan nefesi ile ilgisi olmayan bu yöntem aslında soğuk bir yüzey üzerine kondense



olan su damlalarının mekanizmasını içerir. Çiy oluşumu buna verilebilecek en güzel örnektir (Beysens, 1995). Şablonlama amaçlı kullanılan diğer litografik tekniklerle karşılaştırıldığında polimer filmler üzerinde vermiş olduğu düzenli desenler, ucuz maliyetli oluşu ve geniş alanlara uygulanabilirliği gibi sebeplerden dolayı avantajlı ve alternatif bir metottür. Geçmişten günümüze pek çok araştırmacı tarafından nanometre skaladan mikrometre ölçeğine kadar çeşitli polimer türleri kullanmak suretiyle çok sayıda nefes figürü sentezi yapılmıştır. Bu proses polimer yapısı, çözücü türü, substrat çeşidi, sıcaklık ve nem gibi çok sayıda parametreden etkilenir ve sıralı gözeneklere sahip filmlerin sentezi ancak bütün bunların optimizasyonu ile mümkün olur (Bunz, 2006; Hernandez Guerrero ve Stenzel, 2012; Bai ve ark., 2013). Çeşitli gözenek boyutlarındaki tek veya çok katmanlı polimerik membranları elde etmek için kullanılan ve hızla gelişen bu tekniğin kanıtlanmış sadeliği ve çok yönlülüğüne rağmen membran oluşumunun karmaşık mekanizması bu prosesin en büyük eksikliği olarak görülmektedir ve halen çok sayıda araştırma ile incelenmektedir (Hoa, 2006; Hernandez Guerrero ve Stenzel, 2012; Bormashenko, 2017).

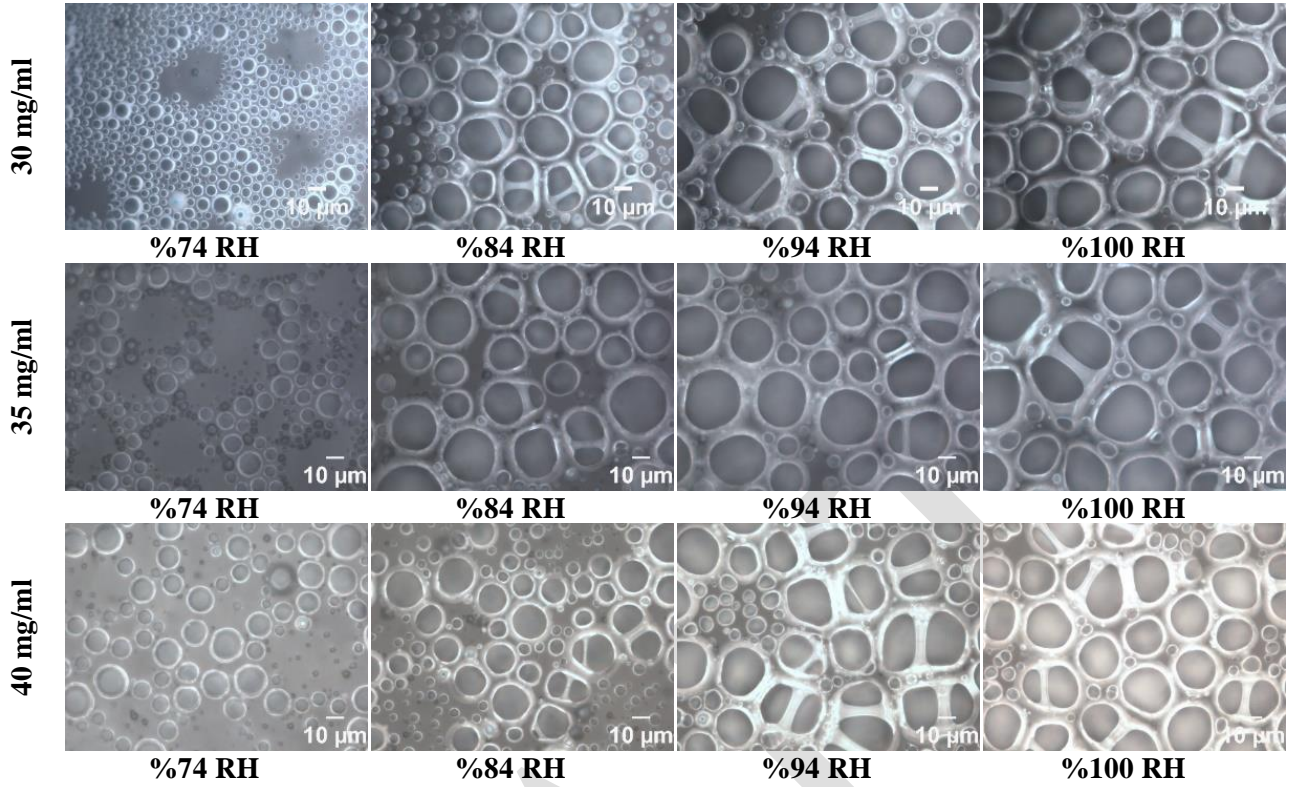
Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki saf Poli(laktik asit) (PLA) ve saf Poli(metil metakrilat) (PMMA) polimerlerinin ve bu polimerlerin %50-%50 oranındaki karışımının teflon yüzeyler üzerinde farklı bağıl nemlere sabitlenmiş statik koşullar altında nefes figürü yöntemi kullanılarak gözenekli polimerik film sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

## **MATERYAL VE METOD**

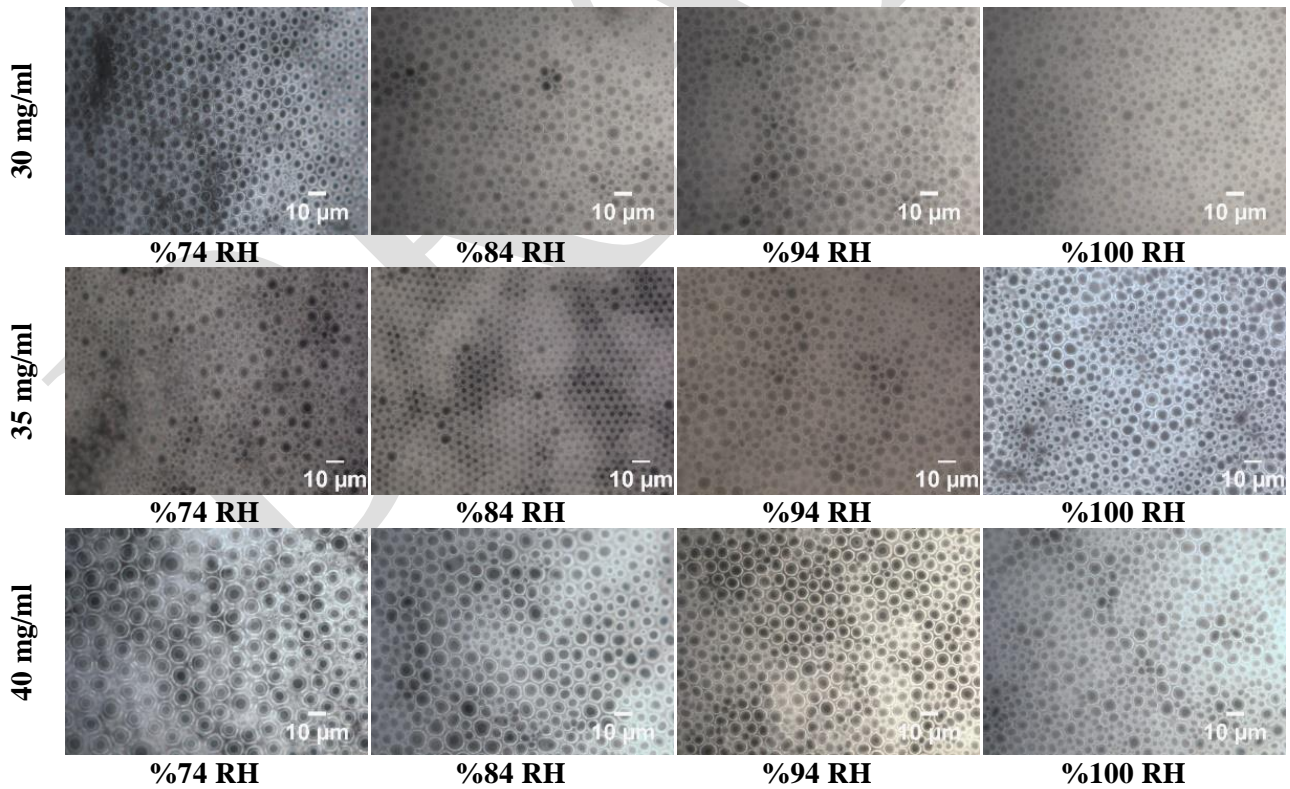
Gözenekli polimerik filmlerin sentezi için saf PLA, saf PMMA ve %50 PLA-%50 PMMA polimerleri kloroform çözücüsü içerisinde ayrı ayrı 30, 35 ve 40 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu çözeltiler nemi saf su, potasyum nitrat (KNO<sub>3</sub>), potasyum klorür (KCl) ve sodyum nitrat (NaNO<sub>3</sub>) ile sırasıyla %100, %94, %84 ve %74 bağıl nemlere sabitlenmiş ortamlarda, 20°C ortam sıcaklığında yüzeyi pürüzsüz teflon plakalar üzerine bir cam şırınga ile 500 µl hacimde damlatıldı. Polimer filmlerin içermiş olduğu kloroformun buharlaşması için 20 dk. beklendi ve polimer filmler teflon plakadan sıyrılarak ayrıldı. Yüzeylerin su denge temas açıları ve serbest yüzey enerjilerinin belirlenmesinde Attention Theta model temas açısı ölçüm cihazı kullanıldı. Yüzeylerin van Oss-Good metodu (Van Oss ve ark., 1988; van Oss ve Good, 1992) kullanılarak serbest yüzey enerjisi değerlerinin belirlenmesinde test sıvısı olarak saf su, etilen glikol, formamid ve metilen iyodür kullanıldı. Gözenekli polimerik yüzeylerin morfolojisi Nikon Eclipse LV100ND model optik mikroskop kullanılarak 500x büyültmede görüntülendi. Gözenek çapları Clemex Captiva görüntü analiz programı kullanılarak tespit edildi.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

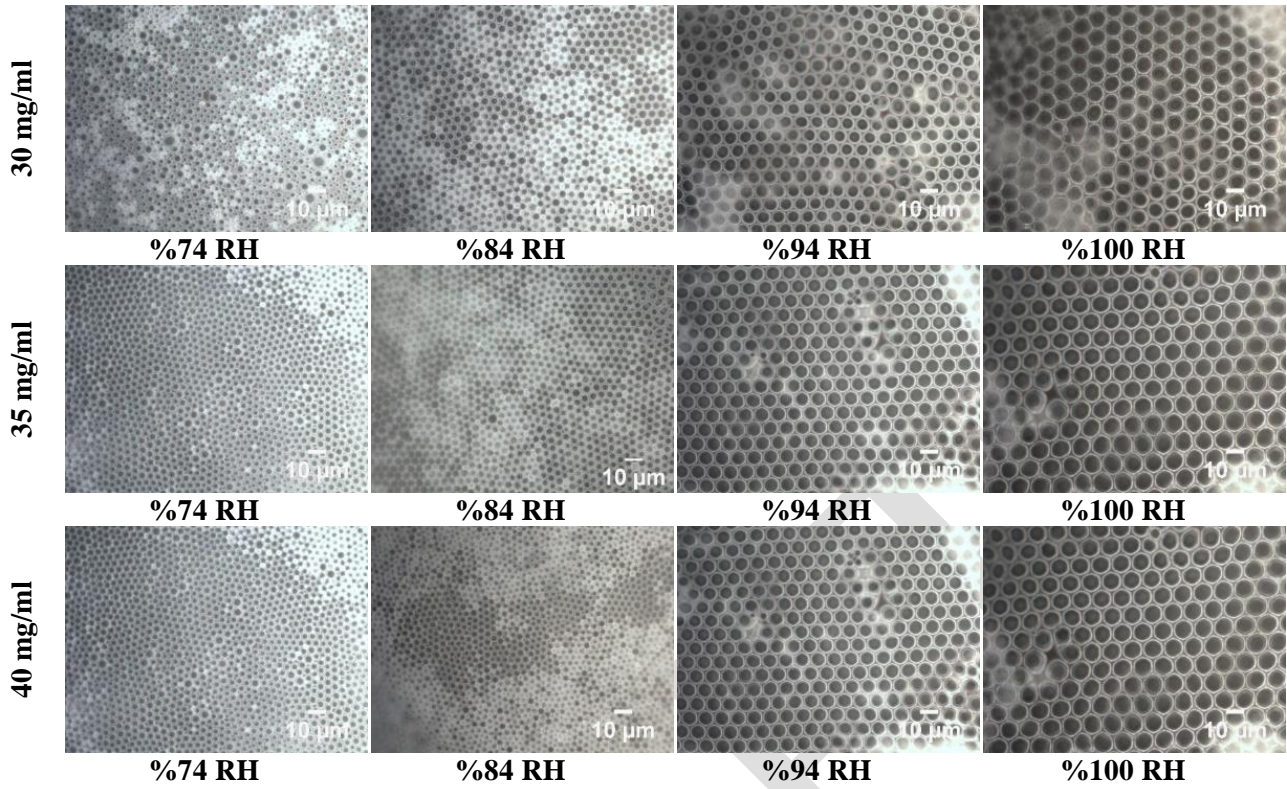
Saf PLA, saf PMMA ve %50 PLA-%50 PMMA polimerlerinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı bağıl nemlerde 500x büyültmede çekilen optik mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 1-3'te gösterilmektedir. Gerek Şekil 1 ve gerekse Şekil 2'den görüldüğü üzere saf PLA ve saf PMMA polimerleri farklı bağıl nemlerde düzensiz ve dağınık gözenekli yapılar göstermektedir. Bu şekillerden teflon yüzeyler üzerinde üretilen gözenekli saf PMMA polimerinin gözenek çapının saf PLA polimerine göre çok daha küçük ve nispeten daha düzenli olduğu söylenebilir. Şekil 3'e bakılırsa %50 PLA-%50 PMMA polimerlerinin teflon yüzeylerde özellikle %94 ve %100 gibi yüksek bağıl nemlerde oldukça düzenli gözenekli yapılar verdiği görülmektedir. Elde edilen gözenekli polimerik filmlerin değişen konsantrasyon ve bağıl nem koşullarında göstermiş oldukları ortalama por çapı değerleri Tablo 1'de nümerik olarak gösterilmektedir. Tüm konsantrasyonlar ve tüm polimerler için %74 bağıl nemden %100 bağıl neme doğru nem artışı ile birlikte ortalama por çapının arttığı görülmektedir. Nem artışıyla birlikte polimer yüzeyler üzerine kondense olan su damlacıklarının sayısı arttığından ortalama por çapı giderek artan Nefes Figür'ler elde edilmektedir. Tablo 1'den görüldüğü üzere saf PLA polimerinin ortalama por çapı değerleri konsantrasyonla değişmek üzere farklı bağıl nemlerde yaklaşık minimum 8 ila maksimum 22 µm arasında değişmektedir. Bu değerler saf PMMA polimeri için yaklaşık minimum 2 ila maksimum 6 µm, %50PLA-%50PMMA polimer karışımı içinse yaklaşık minimum 2 ila maksimum 7 µm arasındadır.



Şekil 1. Saf PLA polimerinin farklı konsantrasyonlarda ve bağıl nemlerde 20°C'de teflon yüzeylerde verdiği Nefes Figürlerinin 500x büyütmedeki optik mikroskop görüntüleri



Şekil 2. Saf PMMA polimerinin farklı konsantrasyonlarda ve bağıl nemlerde 20°C'de teflon yüzeylerde verdiği Nefes Figürlerinin 500x büyütmedeki optik mikroskop görüntüleri



**Şekil 3.** %50PLA-%50PMMA polimerinin farklı konsantrasyonlarda ve bağıl nemlerde 20°C'de teflon yüzeylerde verdiği Nefes Figürlerinin 500x büyütmedeki optik mikroskop görüntüleri

**Tablo 1.** Polimer çözeltilerinin 20°C'de teflon yüzeyler üzerinde farklı konsantrasyon ve farklı bağıl nemlerdeki ortalama por çapı değerleri

Konsantrasyon	Nem %	Ortalama Por Çapı (µm)		
		PLA	PMMA	%50PLA-%50PMMA
30 mg/ml	74	9.44	3.33	2.54
	84	15.96	5.07	3.41
	94	20.78	5.24	5.13
	100	21.40	5.75	7.29
35 mg/ml	74	8.29	2.10	2.20
	84	14.90	2.63	3.21
	94	18.30	4.53	6.26
	100	22.01	5.67	7.40
40 mg/ml	74	9.46	3.36	2.27
	84	15.16	4.77	4.18
	94	17.41	5.06	5.38
	100	20.13	5.74	7.18

Gözenekli polimerik filmlerin ıslatılabilirlikleri temas açısı ölçümleri kullanılarak tespit edildi. Bunun için gözenekli polimerik yüzeyler üzerine 5 µl hacminde saf su damlası damlatıldı. Saf PLA, saf PMMA ve %50 PLA-%50 PMMA polimer yüzeyler üzerinde ölçülen ortalama su denge temas açısı değerleri Tablo 2'de

gösterilmektedir. Tablo 2’den görüldüğü üzere saf PLA ve saf PMMA gözenekli polimerleri nem artışı ile birlikte düzenli bir temas açısı artışı veya azalması göstermezken, %50 PLA-%50PMMA karışımı gözenekli polimerleri nem artışı (dolayısıyla por çapı artışı) ile birlikte düzenli olarak artan bir temas açısı artışı göstermektedir. Bu durumun nem artışı ile birlikte yüzeylere kondense olan su damlacıklarının büyüklüğünün ve açmış oldukları porların büyüklüklerinin artması ve hidrofobik hava paketçikleri vazifesi gören bu porlar üzerinde su damlacığının daha yüksek temas açısı değerleri vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Tablo 2.** Polimer yüzeyler üzerinde ölçülen ortalama su denge temas açısı değerleri

Konsantrasyon	Nem %	Denge Temas Açısı, $\theta_e$ (°)		
		PLA	PMMA	%50PLA-%50PMMA
30 mg/ml	74	70	72	79
	84	85	87	86
	94	83	70	87
	100	85	79	93
35 mg/ml	74	79	84	62
	84	86	88	76
	94	89	84	83
	100	80	84	87
40 mg/ml	74	88	88	72
	84	66	86	74
	94	85	85	82
	100	88	80	86

Polimer yüzeylerin serbest yüzey enerjisi değerlerini tespit etmek için van Oss-Good eşitliği (Denklem 1) kullanılmış olup test sıvısı olarak saf su, etilen glikol, formamid ve metilen iyodür kullanılmıştır.

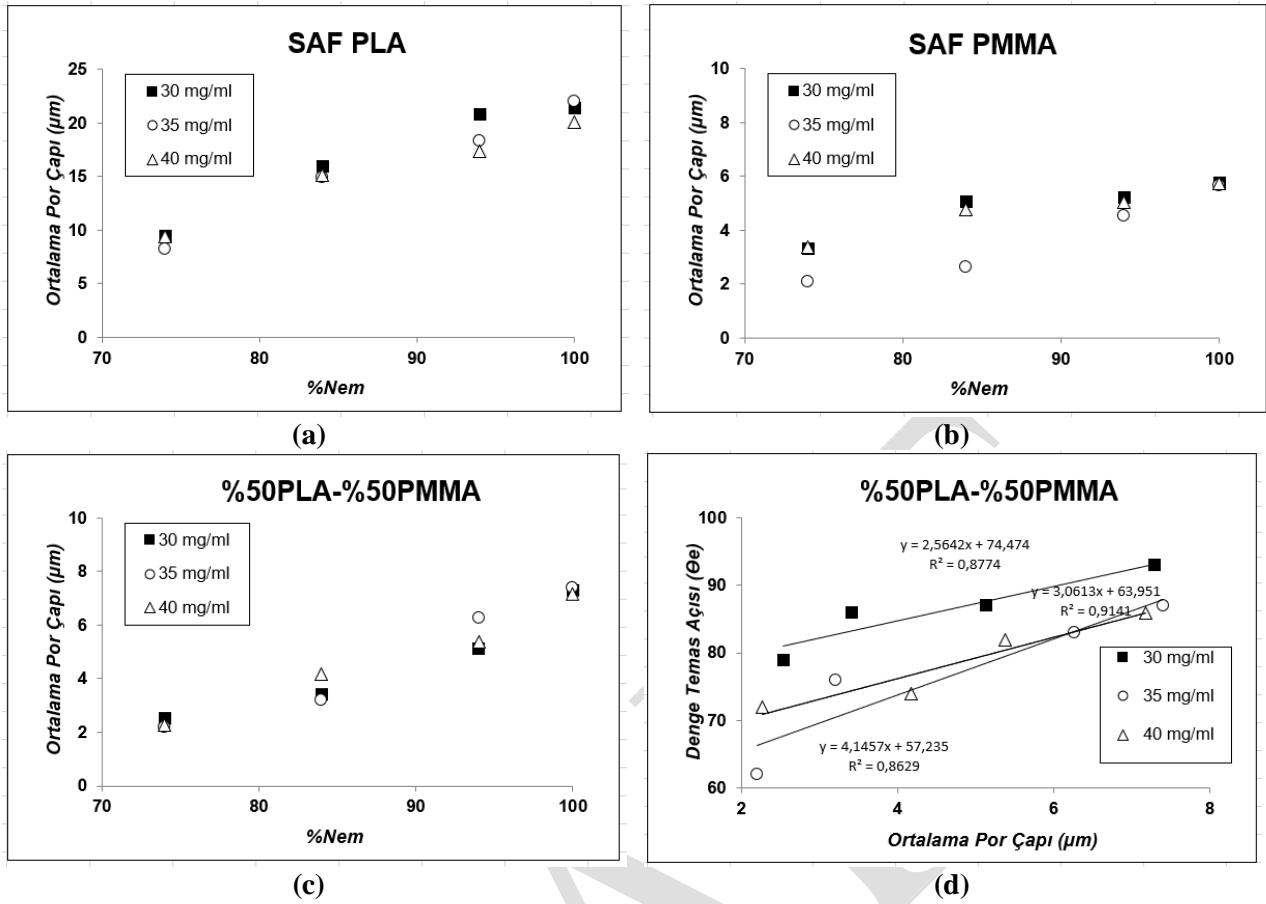
$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+} \right) \quad (1)$$

Daldırarak kaplama tekniği ile cam yüzeyler üzerine sentezlenen düz ve gözeneksiz polimer yüzeyler üzerinde elde edilen serbest yüzey enerjisi değerleri ve parametreleri Tablo 3’te gösterilmektedir.

**Tablo 3.** Düz ve gözeneksiz olarak üretilen polimer yüzeyler üzerinde van Oss-Good metoduna göre hesaplanan serbest yüzey enerjisi değerleri ve parametreleri (mJ/m<sup>2</sup>)

Polimer	$\gamma_s^{LW}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma^{AB}$	$\gamma_s^{tot}$
PLA	43.4	0.0	12.0	0.0	43.4
PMMA	45.4	0.0	13.5	0.0	45.4

Tablo 3’ten görüldüğü üzere PLA ve PMMA’nın serbest yüzey enerjisi değerleri birbirine çok yakındır. Şekil 4a, Şekil 4b ve Şekil 4c farklı konsantrasyonlardaki saf PLA, saf PMMA ve %50PLA-%50PMMA yüzeyler üzerinde elde edilen ortalama por çapı değerlerinin bağıl nem ile değişimini göstermektedir. Saf PLA ve saf PMMA için her ne kadar bağıl nem artışı ile birlikte por çapı artışı gözlemleniyor olsa da, çok düzenli gözenekler elde edilemediği için bu değişimin çok düzenli olduğu söylenemezken, %50PLA-%50PMMA polimeri için bu değişim oldukça lineerdir. Şekil 4d ise bu yüzeyler üzerinde ölçülen su denge temas açısı değerleri ile ortalama por çapı dağılımı arasındaki ilişkiyi vermektedir. Yine %50PLA-%50PMMA polimeri için denge temas açısı ile ortalama por çapı değişimi lineer grafikler vermektedir.



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlardaki a. Saf PLA, b. Saf PMMA, c. %50PLA-%50PMMA polimerlerinin nem değişimi ile ortalama por çaplarının değişimi, d. %50PLA-%50PMMA polimerinin yüzeyinde ölçülen su denge temas açısı değerlerinin ortalama por çapı ile değişimi

## SONUÇ

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki saf PLA, saf PMMA ve %50PLA-%50PMMA polimerlerinden farklı bağıl nemlerde statik koşullarda teflon yüzeyler üzerine nefes figürü yöntemi ile gözenekli polimerik filmler elde edilmiştir. Saf PMMA polimerinden elde edilen gözenek çapları saf PLA polimerinden elde edilen gözenek çaplarına göre daha küçük olarak elde edilse de her iki polimerinde saf hallerinden üretilen gözenekli filmlerin düzensiz ve dağınık gözenekler sergilediği tespit edilmiştir. PLA ve PMMA polimerlerinin %50-%50 oranda karışımından elde edilen polimer karışımının teflon yüzeyler üzerinde vermiş olduğu nefes figürler ise özellikle %94 ve %100 gibi yüksek bağıl nemlerde oldukça düzenli gözeneklere sahip yapılar göstermiştir. Genel olarak tüm polimer türlerinde artan bağıl nem ile birlikte gözenekli polimerik filmlerin ortalama por çaplarının arttığı tespit edilmiştir. Bu durum özellikle %50PLA-%50PMMA polimer karışımında çok daha lineerdir. Yine aynı karışım için ortalama por çapı ile su denge temas açısı arasında lineer bir ilişki tespit edilmiş olup, por çapı artışı ile birlikte porlar arasındaki hidrofobik hava paketçiklerinin artışından dolayı temas açılarında da düzenli bir artış gözlemlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aitken J 1893. Breath figures. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 20:94-97.  
Bai H, Du C, Zhang A, Li L 2013. Breath figure arrays: Unconventional fabrications, functionalizations, and applications. Angewandte Chemie International Edition, 52: 12240-12255.  
Baker TJ 1922. Breath figures. Philosophical Magazine, 44:752-765.  
Beysens D 1995. The formation of dew. Atmospheric Research, 39: 215-237.  
Bormashenko E 2017. Breath figure self-assembly, a versatile method of manufacturing membranes and porous structures: physical, chemical and technological aspects. Membranes, 7: 45.  
Bunz UHF 2006. Breath figures as a dynamic templating method for polymers and nanomaterials. Advanced Materials, 18: 973-989.

- Hernandez-Guerrero M, Stenzel MH 2012. Honeycomb structured polymer films via breath figures. *Polymer Chemistry*, 3: 563-577.
- Hoa MLK, Lu M, Zhang Y 2006. Preparation of porous materials with ordered hole structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 121: 9-23.
- Rayleigh L 1911. Breath figures. *Nature*, 86: 416-417.
- Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88: 927-941.
- Van Oss CJ, Good RJ 1992. Prediction of the solubility of polar polymers by means of interfacial tension combining rules. *Langmuir*, 8: 2877-2879.

DRAFT

## A serotipi şap virusu aşısı suşu adayları ile A<sub>22</sub> Irak ve A Tur 04-06 aşısı suşlarının plak morfolojisindeki farklılıkların genetik olarak incelenmesi

Müge FIRAT<sup>1\*</sup>, Aykut ÖZKUL<sup>2</sup>, Yılmaz AKÇA<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Çankırı Karatekin Üniversitesi, Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Veterinerlik Bölümü, Çankırı, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: mugefden@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada, şap aşısının hazırlanmasında aşısı suşu adayı olarak seçilen saha suşlarının ve bazı aşısı suşlarının BHK-21 hücre kültürlerine adaptasyonları sırasında ortaya çıkan farklı plak fenotiplerinin genetik düzeyde incelenmesi ve söz konusu fenotipik değişikliklerden sorumlu olabilecek mutasyonların sorgulanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2007 yılında Türkiye'nin çeşitli illerinde hastalığa sebep olmuş beş adet A/IRN/2005 alttipi aşısı suşu aday virusu ile A<sub>22</sub> Irak ve A Tur 04-06 olmak üzere iki adet aşısı suşu niteliğindeki kontrol virusunun BHK-21 hücre kültürlerine adaptasyon çalışmaları, ELISA ve plak testleri yapılarak, pasajlar arasında plak morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler genetik düzeyde incelenmiştir. Viruslara ait orijinal virus süspansiyonu, monolayer BHK-21 An<sub>31</sub> hücre kültüründe altıncı pasaj, monolayer BHK-21 An<sub>30</sub> hücre kültüründe beşinci pasaj ve süspansiyon BHK-21 An<sub>30</sub> hücre kültüründeki son pasajlardan elde edilen VP1, 3A ve *cre* genlerine ait nükleotid diziler ve orijinal virus süspansiyonu ile süspansiyon BHK-21 An<sub>30</sub> hücre kültüründeki son pasajlardan elde edilen VP4, VP2 ve VP3 genlerine ait nükleotid diziler her virus için kendi içinde karşılaştırılmıştır. Çalışılan virusların hücre kültürlerine adaptasyonları için yapılan pasajlar sonrasında plak ölçülerinde genel olarak küçülme ve heterojen plak morfolojisi olduğu tespit edilmiştir. Nükleotid diziler incelendiğinde; VP1 genindeki T48K, H57R, Q110K, Q110R, D199G, VP2 genindeki W129C, E131K, L134R ve VP3 genindeki D174G, T178G mutasyonlarının daha önceki çalışmacıların bildirdikleri doğrultusunda plak morfolojisi ile ilişkili olabilecekleri düşünülmüştür. VP1 genindeki H108R ve E174A, VP2 genindeki T201A ve 3A genindeki L129P mutasyonlarının plak morfolojisi ile ilişkisi ise mevcut bilgilerle ortaya konulamamıştır. Pasajlar arasında hiçbir mutasyonun görülmediği *cre* ve VP4 genlerinin bu çalışma için plak morfolojisi yönünden potansiyel gen bölgeleri olmadıkları düşünülmüştür. İlerleyen hücre pasajlarında plak fenotiplerinde görülen değişimlerin ve diziler arasındaki aminoasit farklılıklarının, şap virusunun tür benzeri doğasının sonucu olarak popülasyon içinde değişken ortam şartlarına uyum sağlayan baskın varyantların özelliklerini göstermeleri sonucu şekillendiği düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre kültürü, şap virusu, plak fenotipi, genetik analiz.

### Genetical investigation on the differences of plaque morphology of foot-and-mouth disease virus serotype A vaccine strain candidates and A<sub>22</sub> Iraq and A Tur 04-06 vaccine strains

#### Abstract

In this study, it was aimed to genetically investigate the different plaque phenotypes that occurred during the adaptation to BHK-21 cell cultures, of field strains which were selected as candidate vaccine strains to prepare vaccine for foot-and-mouth disease and some current vaccine strains and to examine the mutations that may be responsible for such phenotypical alterations. For this purpose; the studies for adaptation to BHK-21 cell lines, ELISA and plaque assays of five candidate vaccine strain viruses of A/IRN/2005 subtype which have caused the disease in several provinces of Turkey in 2007 and two vaccine strains A<sub>22</sub> Iraq and A Tur 04-06 which were used as control viruses were done and the plaque morphology alterations occurred between the passages were genetically investigated. The nucleotide sequences of VP1, 3A and *cre* genes obtained from the original virus suspensions of the viruses, the sixth passage in monolayer BHK-21 An<sub>31</sub> cell line, the fifth passage in monolayer BHK-21 An<sub>30</sub> cell line and the last passage in suspension BHK-21 An<sub>30</sub> cell line and the nucleotide sequences of VP4, VP2 and VP3 obtained from the original virus suspensions and the last passage in suspension BHK-21 An<sub>30</sub> cell line were compared in itself for each virus. After the passages of the studied viruses for their adaptation to cell lines, a general decrease in the plaque sizes and heterogeneous plaque morphology formation was determined. When the nucleotide sequences were investigated; T48K, H57R, Q110K, Q110R, D199G mutations in VP1, W129C, E131K, L134R mutations in VP2 and D174G, 178G mutations in VP3 were thought to may be related with plaque phenotype according to the declarations of

previous researchers. The relationship between H108R and E174A mutations in VP1, T201A mutation in VP2 and L129P mutation in 3A and plaque morphology were not able to revealed with existent information. It was thought that cre and VP4 genes in which no mutation was observed between the passages were not the potential genes for plaque morphology for this study. The alterations in plaque phenotypes which were observed in progressive cell culture passages and the aminoacid differences between the sequences were thought to show the properties of dominant variants in the population which were accommodated to changeable media conditions occur as a result of quasispecies nature of foot-and-mouth disease virus.

**Keywords:** Cell culture, foot-and-mouth disease virus, plaque phenotype, genetic analysis.

## 1. GİRİŞ

Şap hastalığı ülkeler arası canlı hayvan ve hayvansal ürün ticaretini olumsuz yönde etkileyen, büyük ekonomik kayıplara neden olan, çift tırnaklı hayvanların akut ve çok bulaşıcı viral bir hastalığıdır (Bachrach, 1968; Pereira, 1981; Gebauer ve ark., 1988). Hastalığın endemik olduğu ülkelerde uygun serotipte inaktif aşılarda yapılan koruyucu aşılama ile hastalığın insidensinin düşürülmesine yönelik önlemler alınmaktadır (Doel, 2003). Şap aşılarının sahada uygulandığı hayvanlarda yüksek bir bağışıklık meydana getirebilmesi için, iyi bir aşı suşunun; üretildiği sisteme kolay adapte olması, adaptasyonu takiben iyi bir antijenite ve enfektivite vererek üremesi, üreme sırasında orijin virusla serolojik, immunolojik ve plak morfolojisi yönünden homolog bir yapıda olması, immunojen partikülün inaktivan maddelere karşı dayanıklı ve aşı durumuna geldiğinde uzun süreli ve sahada mevcut aynı alt tipin çeşitli varyantlarına karşı dominant özellikleri olması, aşının saklanması esnasında 146S partiküllerinin stabil kalması gerekir. İleri pasajlarda virusların meydana getirdikleri plak morfolojilerindeki değişim virusun homolog olmaktan uzaklaştığını göstermektedir. Suşların plak varyantlarının ve antijenik farklılıklarının üretim metodlarından mı yoksa pasajlar sonucu mu meydana geldiğinin saptanması gerekir (Okay ve ark., 1979; Öztürkmen, 1982).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Hücre Kültürü

Çalışmada orijini İtalya-Brescia Enstitüsü olan BHK-21 Cl-13 BS31 hücre kültürü hattının, Şap Enstitüsü şartlarında endüstriyel üretime adapte edilmiş monolayer üreme özelliği gösteren BHK-21 An31 ve BHK-21 An30 ile süspanse üreme özelliği gösteren BHK-21 An30 hücre kültürü hatları kullanıldı.

#### 2.1.2. Araştırmada Kullanılan Aday Viruslar ve Kontrol Viruslar

Bu çalışmada; 2007 yılında Türkiye'nin çeşitli illerindeki şap hastalığı şüpheli sığırlardan alınarak tanı amacı ile Şap Enstitüsü'ne gönderilmiş olan 5 adet A serotipi dil epiteli, Tip Tayini Laboratuvarı'nda elde edilmiş olan ELISA sonuçları (pasaj 0-P0 olan orijinal virus süspanسیونun tipi ve optik dansitesi-O.D.) ve dil epitel arşivindeki stok durumları incelenerek aday virus olarak seçildi ve çalışmada kullanıldı (Çizelge 2.1.1.).

Çizelge 2.1.1. Çalışmada kullanılan aday viruslara ait bilgiler

Virus Kodu	Tipi ve O.D.'si (P0 için)	İli	İzolasyon yılı
1	A-1,3	Isparta	2007
2	A-1,1	Isparta	2007
3	A-2,0	Ankara	2007
4	A-1,4	Iğdır	2007
5	A-1,8	Bolu	2007

Çalışmada kullanılan aşı suşu niteliğindeki kontrol viruslara ait geçmiş tarihlerde yapılan sığır pasajlarından elde edilmiş dil epitelleri Şap Enstitüsü'nden temin edildi (Çizelge 2.1.2.).



**Çizelge 2.1.2.** Çalışmada kullanılan aşı suşu niteliğindeki kontrol virüslere ait bilgiler

Kontrol virus	Coğrafi orijin ve izolasyon tarihi	Çalışmada kullanılan sığır pasajı (sp) numarası ve tarihi
A <sub>22</sub> /IRAK/24/64	Irak-1964	SP2-22.12.2006
A/TUR/04/06	Türkiye-2006	SP2-26.01.2009

### 2.1.3. Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerden; NK61, NK72 (Knowles ve Samuel, 1998), 3135F, 535F, 1025R, 5265F ve 5450R (Christensen ve ark., 2006) Şap Enstitüsü Moleküler Epidemiyoloji Laboratuvarı'nda rutinde kullanılan primerlerden seçilerek kullanıldı. A-1296F, A-1575F, A-2041F, A-2289R, A-2492F, A-2683R, A-2993R ve A-3321R; "Batı Avrasya'da Şap Hastalığı Virüsü'nün Yüksek Çözünürlüklü Moleküler Epidemiyolojisi için Uygulama Teknikleri" isimli proje kapsamında WRL Pirbright-İngiltere'de tasarlanmış olan primerler arasında seçildi. AVP4/2F-Mg, AVP4/2R-Mg, AVP3F-Mg ve AVP3R-Mg bu çalışma için tasarlandı ve özel bir firmaya sentezletirilerek kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 2.1.3.'de verildi.

**Çizelge 2.1.3.** Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Nükleotid dizisi (5'-3')	Gen	Tip	Ürün büyüklüğü (bp)	Kullanım amacı
3135F NK61	ACAAACGTACAGGGGTGGGT GACATGTCCTCCTGCATCTG	VP1	A	896	PCR
NK72	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	VP1	A	823 825	Nükleotid dizi reaksiyonu
535F 1025R	GAGAAAYGGGACGTCTGCGC GTCRCCTATTCAGGCATAGAAG	<i>cre</i>	A	491	PCR  Nükleotid dizi reaksiyonu (R primerler ile)
5265F 5450R	TATGTTCAAGCCTCAACCACC CACTTTCAAACCGACAGGTT	3A	A	755	
A-1296F A-2289R	GAGCCTTCTTC GACTGGGTC WCACCTCCACGTCCCAGC	VP4 VP2 VP3	A	994	
A-1575F A-2683R	GGGTGGTARGCGATCGACG GCTGTTTTTRGGGTCTGTTGTAC C			1109	
A-2041F A-2993R	AYTCGAGTGTGGGAGTCACS GTAC GCCACCATGTASCGG			953	
A-2492F A-3321R	CTGGACYCTGGTRGTGATGG TGGTGGTGACAGGGTCTGC			830	
AVP4/2F-Mg AVP4/2R-Mg	TAYGCGATCGACGACGAGG AATGCTGCTGGTGGTCAGTGG	VP4 VP2	A	957	
AVP3F-Mg AVP3R-Mg	CATGACAGCCCACATCACGG CGYTGAGCCTGTGTCTCWCC	VP3	A	936	

Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) Kodları nükleotid simgeleri (**R:** A veya G; **S:** C veya G; **W:** A veya T; **Y:** C veya T)

## 2.2. METOT

### 2.2.1. Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan virusların izolasyonları, çoğaltılmaları ve plak testlerinde önceden duyarlılık ve sterilite kontrolleri yapılmış monolayer hücre kültürü hatları olan BHK-21 An31 ve BHK-21 An30 hücre yapısının çalışma boyunca aynı kalması amacı ile gerekli miktarlarda çoğaltılarak -196°C'de stoklandı ve kullanılacağı zaman çözdüldü. Süspansiyon hücre kültürü ise çalışma esnasında Şap Enstitüsü'nde hücre üretme tanklarında çoğaltılan ve aşı üretiminde kullanılan süspansiyon BHK-21 An30 süspansiyon hücre kültürü hattından alındı. Hücre süspansiyonu toplam hacmi 50 ml olacak şekilde 70 ml kapasiteli manyetik karıştırıcılı mini cam fermentörlere taksim edildi.

### 2.2.2. Epitelden Virus Süspansiyonunun Hazırlanması

Sahadan gelen dil epitelleri ve referans olarak seçilen viruslara ait dil epitellerinden virus süspansiyonlarının hazırlanması daha önceden bildirilen (Ferris ve Dawson, 1987) yöntemine göre yapıldı.

### 2.2.3. Virus İzolasyonu

Çalışmada kullanılan virusların hücre kültürlerine adapte olmaları amacı ile Şap Enstitüsü Protokolü'ne göre öncelikle BHK-21 An31 monolayer hücre kültürü hattında 6 pasaj (P1, P2, P3, P4, P6), BHK-21 An30 monolayer hücre kültürü hattında 6 pasaj (P7, P8, P9, P10, P11, P12) ve BHK-21 An30 süspansiyon hücre kültürü hattında 3 pasaj (P13, P14, P15) yapıldı. Virusların enfektif titrelerine göre 0,05 enfeksiyon dozunda (MOI) olacak şekilde (1 virus partikülü/20 hücre) 1 ml virus ekimi yapıldı. Virus kültüründe %75-80 CPE görüldüğü zaman -20°C'ye kaldırıldı.

### 2.2.4. İndirekt Sandviç ELISA

Çalışma için seçilen ve inokulum haline getirilen tanı materyallerinin hücre kültüründe yapılan her virus pasajı sonrasında indirekt sandviç ELISA ile virusların serotipik identifikasyonu yapıldı. Test, Roeder ve Le Blanc Smith (1987) tarafından bildirilen yöntemine göre yapıldı.

### 2.2.5. Plak Test

Virusların enfektivite titrelerini hesaplamak ve plak morfolojilerini incelemek amacı ile Şap Enstitüsü Protokolü'ne göre plak test yapıldı. Değerlendirmede sayılabilen plakların bulunduğu son göz okunarak plak sayısının ortalaması alındı. Daha sonra aşağıda yazılı olan formülde yerine konularak enfektivite titresi PFU/ml olarak bulundu. Ayrıca yapılan plak testlerden sonra plak morfolojileri incelendi ve plakların çapları ölçüldü.

### 2.2.6. RNA Ekstraksiyonu ve Viral RNA'nın Ters Transkripsiyonu

Viral RNA'nın ters transkripsiyonu için gerekli olan şap virusu genomik RNA'sının virus süspansiyonlarından elde edilmesi amacı ile spin kolon teknolojisi ile hazırlanmış ticari kit (MOBIO) göre RNA ekstraksiyonu yapıldı. Viral RNA'nın ters transkripsiyonu ve cDNA sentezi Knowles ve Samuel (Knowles ve Samuel, 1998) tarafından daha önce bildirilen yöntem temel alınarak yapıldı.

### 2.2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve PCR Ürününün Saflaştırılması

Çalışılan virusların orijinal virus süspansiyonları (P0), BHK-21 An31 monolayer hücre kültüründeki ileri pasaj olan 6. pasajları (P6), BHK-21 An30 monolayer hücre kültüründeki ileri pasaj olan 5. pasajları (P11) ve BHK-21 An30 süspansiyon hücre kültüründeki son pasajlarının (P15) pasaj sıvıları VP1, 3A ve cre gen bölgelerinin eldesi için PCR ile çalışıldı. Virusların P0 ve P15 pasaj sıvıları VP4, VP2 ve VP3 gen bölgelerinin eldesi için PCR ile çalışıldı. Çalışmada nükleotid dizileri elde edilmesi istenen gen bölgelerinin amplifikasyonu için

yapılan PCR, ticari kitin protokolüne (Invitrogen, Platinum Taq DNA Polymerase, Kat. No: 10966-030) göre yapıldı. PCR ürünlerinin agar jel elektroforezi yapılarak bant oluşumu incelendi. PCR ürününün agaroz jelden purifiye edilerek nükleotid dizileme reaksiyonuna hazırlanması, spin kolon teknolojisi ile hazırlanmış ticari kitin protokolüne (Invitrogen-Quick Gel Extraction Kit, Kat. No: K 2100-12) göre yapıldı.

### 2.2.10. Nükleotid Dizileme Reaksiyonu ve Elde Edilen Nükleotid Dizilerin Değerlendirilmesi

Nükleotid dizileme reaksiyonu özel bir firmaya (RefGen, ODTÜ Teknokent, Ankara) yaptırıldı. Nükleotid diziler, ClustalX (Thompson ve ark., 1997) ve GeneDoc (Nicholas ve ark., 1997) yazılımları kullanılarak AJ251476- EF117837 GenBank numaralı referans nükleotid diziler ile hizalandı. Hizalanan nükleotid diziler MEGA4 (Tamura ve ark., 2007) yazılım paketi kullanılarak FASTA formatına çevrildi. Verilerin dökümantasyonunda ise BioEdit Version 7.0.1 yazılım paketi (Hall, 1999) kullanıldı.

## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1. Virus 1'e Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

Virus 1' e ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 30, 20, 18, 17, 16,5, 16, 31, 24, 18, 17, 17, 15,5, 18, 17 ve 16 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 7.7-7.6-7.2-7.4, 7.7, 8.3, 7.3, 7.0, 7.2, 7.0, 7.0, 7.5, 7.6, 6.6 ve 6,7 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 19-5.8, 5-7.2, 20-5.6, 26-5.2, 46-3.6, 22-4.2, 25-3.6, 11-3.7, 21-3.1, 12-6.5, 38-3.6, 27-1.8, 96-0.8, 136-1.0 ve 50-1,2 mm'dir.

### 3.2. Virus 2' ye Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

Virus 2' ye ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 27, 20, 19, 18, 17, 16, 47, 17, 17, 17, 17, 16,5, 18, 17 ve 16 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 7.2, 7.3, 7.4, 7.4, 7.5, 8.2, 6.3, 8.0, 4.6, 5.2, 6.4, 7.1, 6.5, 6.0 ve 6.3 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 24-5.1, 16-4.2, 29-4.6, 32-4.3, 15-4.8, 19-3.7, 21-3.8, 30-3.1, 53-1.3, 44-2.5, 121-1.0, 74-1.3, 113-0.6, 129-0.9 ve 110-0,8 mm'dir.

### 3.3. Virus 3'e Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

Virus 3' e ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 25, 19, 20, 23, 22, 18.5, 24, 21, 20, 20, 19, 19, 24, 24 ve 24 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 7.,8, 7.,2, 7.4, 7.4, 6.,5, 6.,4, 5.,6, 5.,2, 5.,4, 5.,1, 5.,3, 4.,9, 3.,6, 3.,5 ve 5.4 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 65-1.8, 28-4.5, 28-3.7, 25-3.9, 29-3.4, 23-3.0, 34-2.9, 16-1.3, 33-1.8, 62-1.8, 31-1.1, 42-1.5, 44-2.0, 35-1.1 ve 85-0.7 mm'dir.

### 3.4. Virus 4'e Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

Virus 4' e ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 39, 19, 20, 19.5, 23, 19, 22, 21, 20, 21, 19, 19, 40, 40 ve 24 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 8.4, 7.4, 7.7, 7.5, 7.3, 7.8, 8.4, 7.5, 5.8, 5.0, 2.9, 4.1, 2.6, 0 ve 5.7 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 64-2.4, 80-2.0, 49-2.0, 33-1.4, 69-2.0, 54-2.1, 17-2.3, 28-3.4, 31-3.3, 10-4.2, 10-2.6, 23-1.8, 7-0.7, 0 ve 73-0.7 mm'dir.

### 3.5. Virus 5'e Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

Virus 5' e ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 27, 18, 17, 18, 21, 17, 23, 21, 20, 20, 19, 40, 40 ve 40 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 8.6, 7.2,

7.3, 7.5, 7.6, 7.2, 7.1, 6.3, 6.1, 6.4, 6.1, 5.6, 3.8, 0 ve 4.4 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 37-4,4, 17-3,9 18-4,7, 30-3,7, 28-4,1, 18-3,7, 15-4,0, 19-5,5, 11-4,6, 23-4,0, 55-1,8, 45-1,2, 47-1,9, 0 ve 38-0,5 mm'dir.

### 3.6. A22 Irak Kontrol Virusuna Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

A22 Irak kontrol virusuna ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 25, 20, 18, 21, 17, 17, 31, 16, 16,5, 17, 16, 15, 18, 17 ve 16 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 8.1, 7.2, 7.6, 8.0, 6.8, 7.5, 7.1, 6.5, 5.4, 6.5, 7.1, 6.2, 5.9, 5.8 ve 6.0 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 38-2.8, 17-4.7, 38-3.4, 43-3.4, 80-1.6, 100-1.6, 74-2.0, 41-2.0, 30-1.5, 95-1.4, 65-1.5, 105-0.8, 90-1.1, 51-1.4 ve 62-1.4 mm'dir.

### 3.7. A Tur 04-06 Kontrol Virusuna Ait Pasaj, ELISA ve Plak Test Sonuçları

A Tur 04-06 kontrol virusuna ait pasajlarda (P1-P15 arası) %75-80 CPE görülüp virusların toplandığı zamanlar sırasıyla; 37, 24, 24, 24, 22, 21, 32, 29, 24, 19, 19, 18.5, 40, 40 ve 40 saattir. P1-P15 arası toplanan bütün virusların ELISA sonucu A serotipidir. P1-P15 arası plak test sonuçları (enfektif titre-PFU, Log10/1,0 ml) sırasıyla; 6.9, 6.5, 7.3, 7.4, 7.2, 7.5, 7.1, 7.6, 6.7, 7.1, 6.2, 5.3, 3.5, 0 ve 3.6 PFU'dir. P1-P15 arası plak test sonucu sayılabilen plakların sayısı ve ortalama çapı (mm) sırasıyla; 36-3.8, 30-3.1, 20-5.7, 27-2.4, 77-1.6, 31-2.0, 66-1.8, 35-2.2, 45-2.7, 45-2.3, 14-3, 19-3.8, 27-2.9, 0 ve 52-1.3 mm'dir.

Çalışılan virusların plak çaplarında genel olarak küçülme tarzında meydana gelen değişimlerin görüldüğü, bazı viruslarda bu küçülmeye birlikte enfektif titrede de düşüşler tespit edilmiş olsa da genel olarak plak çapındaki değişimlerle enfektif titrelerin ilişkili olmadıkları tespit edilmiştir. Plak morfolojilerindeki değişimler incelendiğinde tür benzeri kavramını destekler nitelikte, çalışılan her virus için serotiplerin kendi içinde bile genel olarak birbirinden farklı ve değişken plak fenotipleri olduğu görülmüştür. Bunun Bolwell ve arkadaşları (1989) tarafından belirtildiği üzere, BHK hücre kültürü monolayer ve süspanse pasajlarında küçük plak çapı kazanılmasının konak hücrede gelişmek için bir adaptasyon olabileceği ve plak çapındaki küçülmenin hücre kültüründen seçilen varyantlar için normal olarak görülebileceği düşünülmüştür.

### 3.8. Çalışılan Virusların cre, VP4, VP2, VP3, VP1 ve 3A Gen Bölgelerinde Tespit Edilen Aminoasit Değişimleri

**Çizelge 3.1.** Çalışılan virusların cre, VP4, VP2, VP3, VP1 ve 3A gen bölgelerinde tespit edilen aminoasit değişimleri

Virus adı	VP2	VP3	VP1	3A geni
Virus 1	-	T178G (P15)*	T48K, Q110K (P11)*	-
Virus 2	E131K (P15)*	-	D199G (P11)*	-
Virus 3	W129C, E131K, L134R, T201A (P15)*	-	-	-
Virus 4	-	-	H57R, Q110R (P11)*	-
Virus 5	-	-	H57R (P11)*, R57H (P15)*, H108R (P15)*, Q110R (P11)*	-
A22 Irak	E131K (P15)*	-	-	L129P (P6)*
A Tur 04-06	-	D174G (P15)*	Q110K (P11)*, E174 A (P15)*	-

\* Parantezlerin içindeki rakamlar değişikliğin saptandığı pasajın sayısıdır

A tipi viruslar için plak çapının kazanılmış fenotipi ile ilişkili olabileceği bildirilmiş olan VP1 geni 110. pozisyonunda (Mbayed ve ark., 1997) mutasyonlara bağlı aminoasit değişimleri tespit edilmiştir (Q110K ve Q110R). VP1 geninde tespit edilen T48K, H57R ve D199G aminoasit değişimlerinin antijenik varyasyonun görüldüğü önemli bölgelerden olan 41.-60. ve 190.-213. rezidüler (Brown, 1988) arasında olmalarından dolayı antijenik olarak önemli ve plak morfolojisi ile ilişkili olabilecekleri düşünülmüştür.

VP3 geninde tespit edilen T178G ve D174G aminoasit değişimlerinin, daha önceden bildirildiği üzere (XingWen ve ark., 2010) VP3 için heparin bağlanma alanı olan 173. rezidüye yakın olmalarından dolayı plak morfolojisini etkiliyor olabilecekleri düşünülmüştür.

VP2 geninde tespit edilen E131K, W129C ve L134R aminoasit değişimlerinin daha önceki araştırmacıların (Sa-Carvalho ve ark., 1997; Morioka ve ark., 2008; XingWen ve ark., 2010) belirttiği üzere 129 ve 137. pozisyonların antijenik bölge 2'ye yakın olmaları, 131 ve 134. pozisyonların ise yine antijenik bölge 2'deki E-F kıvrımında (131.-134. rezidüler arası) yer alarak heparin bağlanma alanlarına yakınlık göstermeleri sebebiyle antijenik olarak önemli olabilecekleri ve virusun hücreye adaptasyonu sırasında hücresele reseptörlerle etkileşimini değiştirerek plak morfolojisini etkiliyor olabilecekleri düşünülmüştür.

VP1 geninde tespit edilen H108R ve E174A ile VP2 geninde tespit edilen T201A aminoasit değişimlerinin plak morfolojisi düzeyindeki olası etkileri mevcut bilgilerle ortaya konulamamıştır.

Pasajlar arasında hiçbir mutasyonun görülmediği cre ve VP4 genlerinin ise bu araştırma için plak morfolojisi yönünden potansiyel gen bölgeleri olmadıkları düşünülmüştür.

#### 4. SONUÇ

Çalışılan virusların da tür benzeri yapısında olan diğer şap virusu populasyonları gibi fenotipik ve genotipik olarak heterojen varyantların karışımından oluştukları ve hücre pasajları sırasında değişen ortam şartlarına uyum sağlamak için populasyon içindeki sağlam varyantların fenotipik ve genotipik özelliklerini gösterdikleri düşünülmüştür. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulguların, şap aşısı üretimi ve şap virusu ile ilgili yapılabilecek başka çalışmalara bilgi sağlayabileceği düşünülmektedir. İlerleyen hücre kültürü pasajlarında dış kapsit genlerinde tespit edilen mutasyonlardan heparin bağlanma alanlarına yakın olanların yapılacak hayvan denemeleri ile daha önceki araştırmacıların bildirdiği üzere hayvanlarda patojeniteyi etkileyip etkilemeyeceği, virusların süspanse hücrelere adaptasyonunun sağlanmasından sonra tekrar monolayer hücrelere inokule edilmesinin şekillenmiş mutasyonlarda ne gibi değişimlere neden olabileceği ve kültür ortamı değişikliğinin neden olduğu fenotipik değişikliklerin virusların immunojeniteleri üzerine etkisinin tespiti daha sonra çalışılması önerilebilecek konulardır.

#### TEŞEKKÜR

Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/HS/11/14/01/195 proje numarası ile desteklenen bu çalışmanın yürütülmesini destekleyen Şap Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

BACHRACH, H. L. (1968): Foot-and-mouth disease virus. Annual Review of Microbiology, 22: 201-244.

BOLWELL, C., BROWN, A. L., BARNETT, P. V., CAMPBELL, R. O., CLARKE, B. E., PARRY, N. R., OULDRIDGE, E. J., BROWN, F., ROWLANDS, D. J. (1989). Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70: 45-57.

BROWN, F. (1988). Use of peptides for immunization against foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 6: 180-182.

CHRISTENSEN, L. S., PARLAK, Ü., ÖZCAN, C., ÇOKÇALIŞKAN, C., SAREYYÜPOĞLU, B., GRAM-HANSEN, L., TEZEL, A., ÖZYÖRÜK, F. (2006). Characterization, including VP1 and full-length sequencing of type A and O strains collected from foot-and-mouth disease outbreaks since 1996 in Turkey. 2006 Report of Session of the Research Group of the Standing Technical Committee European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease, Paphos/Cyprus.

- DOEL, T. R. (2003). FMD vaccines. *Virus. Res.*, 91: 81-99.
- FERRIS, N. P, DAWSON, M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular diseases. *Veterinary Microbiology*, 16: 201-209.
- GEBAUER, F., TORRE, DE LA J. C., GOMES, I., MATEU, M. G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BREGMAN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *Journal of Virology*, 62(6): 2041-2049.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- KNOWLES, N. J., SAMUEL, A. R. (1998). RT-PCR and sequencing protocols for the molecular epidemiology of exotic virus diseases of animals. OIE/FAO World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease, Molecular Epidemiology Group.
- MBAYED, V., SCHIAPPASCASSI, M., COROMINAS, A., CAMPOAS, R. (1997). Characteristic in vitro evolution pattern of foot and mouth disease virus A81:Castellanos:Arg:87. *Virus Research*, 48: 157-163.
- MORIOKA, K., FUKAI, K., OHASHI, S., SAKAMOTO, K., TSUDA, T., YOSHIDA, K. (2008). Comparison of the characters of the plaque-purified viruses from foot-and-mouth disease virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 70(7): 653-8.
- NICHOLAS, K.B., NICHOLAS, H.B. JR.DEERFIELD, D.W. (1997). GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEWS*, 4: 14.
- OKAY, G., KIVILCIM, Y., CERİTOĞLU, T. (1979). O<sub>1</sub> tipi şap virusunun sahadaki hasta hayvanlardan elde edilecek suşunun BHK süspanse hücre kültürlerinde üretilmesi ve kültür karakterleri üzerinde çalışmalar. *Şap Enstitüsü Mecmuası*, I: 229-252.
- ÖZTÜRKMEN, H. (1982). İnvitro olarak üretilen O1 (Manisa) şap virusunun değişik plak karakterlerinin immuniteye etkileri üzerinde araştırmalar (Uzmanlık Tezi). *Şap Enstitüsü Mecmuası*, I: 123-140.
- PEREIRA, H. G. (1981): Foot-and-mouth disease virus. In: *Virus Diseases of Food Animals*, Vol. II, Ed.: P. G. Gibbs. New York: Academic Press, p. : 333-363.
- ROEDER, P. L., LE BLANC SMITH, P. M. (1987). Detection and typing of foot-and- mouth disease virus by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Research in Vet. Sci.*, 43: 225-232.
- SA-CARVALHO, D., RIEDER, E., BAXT, B., RENATO RODARTE, R., TANURI, A., MASON, P.W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of Virology*, 71(7): 5115-5123.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F.HIGGINS, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25: 4876-4882.
- XINGWEN, B., HUIFANG, B., PINGHUA, L., PU, S., WENDONG, K., YIMEI, C., ZENGJUN, L., ZAIXIN, L., XIANGTAO, L. (2010). Genetic characterization of the cell-adapted PanAsia strain of foot-and-mouth disease virus O/Fujian/CHA/5/99 isolated from swine. *Virol. J.*, 7: 208.

## İmazalil ile indüklenen hücresel toksisite üzerine iz element takviyesinin *in vitro* değerlendirilmesi

Özge Çağlar<sup>1\*</sup>, Kenan Çadircı<sup>2</sup>, Hasan Türkez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Bölümü, Erzurum, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ozge.caglar@erzurum.edu.tr

### Özet

Pestisitler, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını azaltmak için tarım alanında kullanılan madde ya da madde karışımlarıdır. İmazalil hasat öncesi ve sonrası özellikle narenciye gibi meyvelerin çürümesini engelleyerek raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan bir pestisittir. Bu çalışmada primer rat hepatositlerinde imazalile (100 µM) maruz bırakılarak oluşturulan *in vitro* toksisiteye karşı 19 farklı iz elementin (10 µM) koruyucu potansiyelleri MTT, LDH, TAK ve TOD analizleriyle belirlenmiştir. Sonuçlarımız bu elementlerden bor, selenyum ve çinkonun diğerlerine kıyasla yüksek koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre canlılığı, rat hepatosit kültürü, iz element takviyesi, imazalil

### *In vitro* assessment of trace element supplementation on imazalil-induced cellular toxicity

#### Abstract

Pesticides are substance or mixed substances used in the agricultural field to prevent harmful organisms, to take control, or to clean the harmful organisms. Imazalil (IMZ) is a pesticide used to extend the shelf life of pre-harvest and post-harvest especially by preventing the decay of citrus fruits. In this study, the protective potentials of 19 different trace elements (10 µM) were determined by MTT, LDH, TAK and TOD analysis against *in vitro* toxicity by imazalil (100 µM) on cultured primary rat hepatocytes. The results showed that boron, selenium and zinc had higher protective efficacy as compared to others.

**Keywords:** Cell viability, rat hepatocyte cultures, trace element supplementantation, imazalil

#### GİRİŞ

Modern tarım, tohum muamelesinden hasat sonrası nakliye kadar pestisite bağımlıdır. Bitki kökenli ürünlerdeki pestisit kalıntılarının AB izlenmesi sonucunda 769 farklı pestisit rezidüsü olduğu rapor edilmiştir (Faniband ve ark., 2015). Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yoğun tarımsal faaliyetlerden ötürü insanlar pestisitlere maruz kalmaktadır (Eddleston ve ark., 2002; Ntzani ve ark., 2013). Pestisitler ile yakın temas halinde çalışan popülasyonlar daha fazla risk altındadır. Özellikle endişe verici olan ise hasat sonrası pestisit muamelesi sırasında kadınların doğurgan yaşta maruz kalmasıdır. Ayrıca popülasyonların geneli kirli yiyecek alımı ve evcil hayvanların böcek ilacı kullanımı yoluyla ya da böcek ilacı ile muamele edilmiş tarımsal alanların veya ortak arazilerin yakınında yaşamaları nedeniyle de bu zararlı maddelere maruz kalabilmektedirler. Tarım işçilerinde dermal maruz kalma, pestisitlere ana maruz kalma yolu olarak önerilmiştir. Havalandırmının yetersiz olduğu kapalı tarım tesislerinde, soluma başka bir önemli maruz kalma yoludur. İşçiler, formülasyona ve uygulama yöntemine ve gastrointestinal yolla genel popülasyona bağlı olarak partiküllere (tozlara), spreylere, sis veya pestisit sisine maruz kalabilir. Bu nedenle, insanlarda pestisitlerin toksikokinetik çalışmalarında değerlendirilmesi önemlidir.

İmazalil (IMZ), 1- [2- (2,4-diklorofenil) -2- (2-propeniloksi) etil] -1 H imidazol, hasat öncesi ve sonrası çeşitli sebzelere uygulanan, özellikle narenciye gibi meyvelerin çürümesini önlemek ve pazar ömrünü uzatmak için kullanılan mantar öldürücü bir ilaçtır (Kaplan ve Dave, 1979). Yaygın kullanımı nedeniyle IMZ, sebze ve meyvelerin yanı sıra toprak, yüzey suları ve hatta sucul organizmalarında tespit edilebilir (Faniband ve ark., 2015). Önceki bulgular doğrultusunda farelerde ve diğer deneysel modellerde IMZ toksisitesi, embriyotoksisite, malformasyonların oluşumu, endokrin bozukluklar, nörotoksisite ve genotoksisite ile ilişkilendirilmiştir (Masiá ve ark., 2015; Ruiz- Rodríguez ve ark., 2015; Xu ve ark., 2015; Ccancapa ve ark.,

2016). Hayvanlarda, IMZ'nin ciddi göz tahrişine neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bileşik, sitokrom P450 izoformlarının aktivitesini etkileyerek (Muto ve ark., 1997) ve steroidogenesis ile etkileşime girerek endokrin sistemi etkileme potansiyeline sahiptir (Orton ve ark., 2001; Zam ve ark., 2003). Üstelik bu pestisidin kraniyofasiyal malformasyonlar ürettiğinden şüphelenilmektedir (Şisman ve Turkez, 2010). *In vivo* bulgulara ilaveten IMZ'nin sıçan hepatositlerinde hücre ölümüne neden olan hücre içi glutatyon, protein tioller ve hücre ATP tükenmesine yol açtığı gösterilmiştir (Nakagawa ve Moore., 1995).

İz elementler normal fizyolojik süreçlerin devamı için küçük miktarlarda gereken temel elementlerdir. İdeal büyüme, gelişme ve sağlık için zorunludur (Jin ve ark., 2017). Çeşitli enzimler, yapısal proteinler, transkripsiyon faktörleri ve ribozomal proteinler yapılarında iz elementler içerir. Zn, Cu ve Mn içeren süperoksit dismutaz gibi pek çok enzim fonksiyonel işlevleri için metallere gereksinim duymaktadır (Zhang ve Gladyshev, 2011). Bu nedenlerle iz elementler canlı organizmalar için oldukça önemli ve hayati öneme sahiptir. Mevcut çalışma kapsamında *in vitro* IMZ toksisitesine karşı farklı iz element desteklerinin sitoprotektif ve oksidatif etki potansiyelleri değerlendirilmiştir.

### MATERYAL VE METOT

İmazalil Sigma-Aldrich® (USA)'dan satın alındı. Ayrıca çalışmada kullanılan diğer kimyasallar da Sigma-Aldrich®, Merck ® ve Fluka ®'dan temin edildi. Deney hayvanları Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Araştırma Merkezi'nden satın alındı. Deneyde kullanılan hayvanlara standart laboratuvar diyeti, ışık, sıcaklık ve gerekli nem sağlandı. Ayrıca, araştırmamızın içeriğindeki tüm deneyler, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na uygun olarak gerçekleştirildi.

Primer rat hepatosit hücreleri 48'li plakaların her kuyusunda  $5 \times 10^3$  olacak şekilde ekildi. Tedavi grupları için her plakaya 100 10  $\mu$ M imazalil ve 10 10  $\mu$ M konsantrasyonunda 19 farklı iz element (CaF<sub>2</sub>; ICl<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>; FeCl<sub>3</sub>; SiCl<sub>4</sub>; SnCl<sub>2</sub>; ZnCl<sub>2</sub>; CuCl<sub>2</sub>; MnCl<sub>2</sub>; MoO<sub>2</sub>; CoCl<sub>2</sub>; V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; NiCl<sub>2</sub>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; TiO<sub>2</sub>; AsCl<sub>3</sub>; PbCl<sub>2</sub>; CdCl<sub>2</sub>; WCl<sub>2</sub>) eklendi. Plakalarda pozitif kontrol grubu olarak 100  $\mu$ M imazalil kullanıldı. Plakalar 24, 48, 72 saat süre ile 37 °C' de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde tutuldu.

MTT deneyi, toksik maddelere maruz kaldıktan sonra sitotoksitesiyi belirlemek için sıklıkla kullanılan bir hücre canlılığı testidir (Tully ve ark., 2000). MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür) suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur ve bu tuz mitokondri içindeki süksinat dehidrojenaz ile tetrazolyum halkasının bölünmesiyle çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülür. Formazan ürünleri hücre zarından geçemeyeceği için canlı hücrelerde birikir (Moosmann, 1983). Üretici firmanın kullanım talimatına göre (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, ABD) MTT çözeltisi her bir oyuğa uygulandı. Kısaca, plakalara MTT çözeltisi ilave edildi ve 4 saat boyunca 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra formazan kristallerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich®) plakalara eklendi. Plakalar 570 nm dalga boyunda analiz için bir mikropilaka okuyucuda okutuldu.

LDH analizi için, LDH Sitotoksitesite Analizi Kit prosedürüne uygun şekilde (Cayman Chemical Company®, Ann Arbor, MI, ABD) 24, 48 ve 72 saat boyunca imazalil ve iz elementlerle inkübe edilen kültür medyumları (100 $\mu$ L) yeni bir plakaya aktarıldı. Daha sonra 100  $\mu$ L reaksiyon karışımı her bir oyuğa eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Son olarak, kültürlerin absorbansı bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 490 nm'de analiz edildi. Hücre canlılığı uygulama yapılmayan (negatif kontrol) grupta gözlenen değerlere göre hesaplandı.

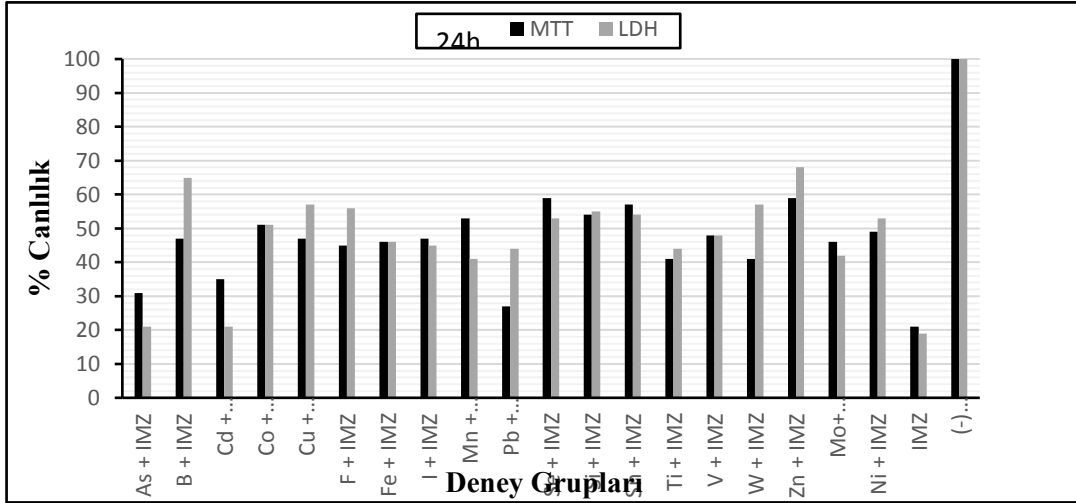
Total antioksidan kapasitesi (TAC) ve total oksidant durumu (TOS) ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey) kullanılarak belirlendi. İmazalil'e maruz bırakılan ve eser elementlerle tedavi edilen hücre plakalarının medyumlarının analiz edildiği bu testlerde pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (25  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) ve askorbik asit (10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) kullanıldı.

### BULGULAR

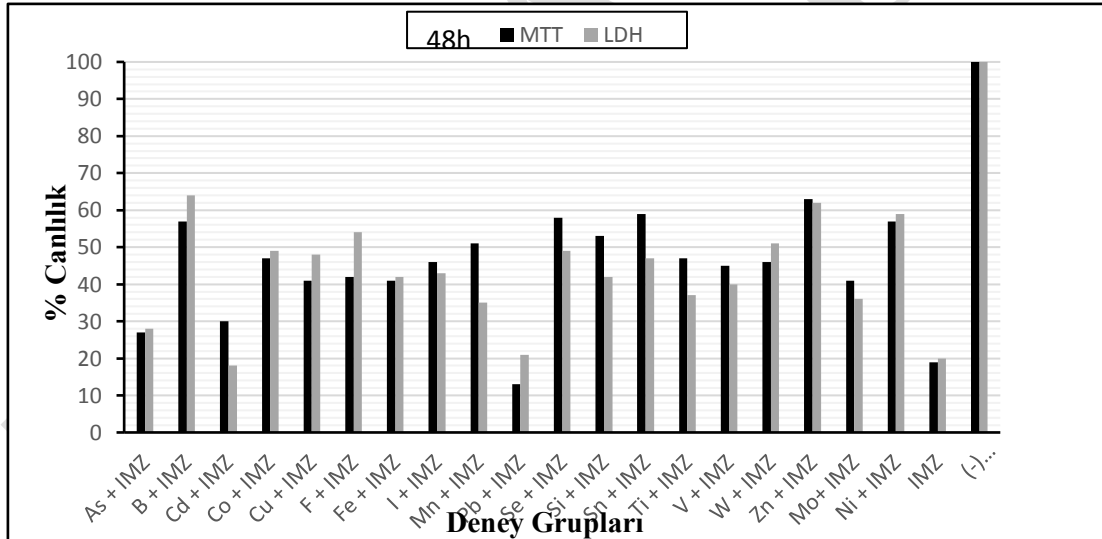
Primer rat hepatositleriyle zamana bağlı gerçekleştirilen MTT analizi ve LDH salınım testleriyle hücre canlılığı belirlenmiştir. Yalnız 100  $\mu$ M imezalil ile muamele edilen deney grubunun MTT analizi sonucunda hücre canlılığı %43,15; LDH salınım testinde ise 46,35 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca toksitesite analizlerinde As, Cd, Pb, Ti ve W ile zamana bağlı muamelenin ardından gözlenen canlılık oranları 100  $\mu$ M imazalile maruz



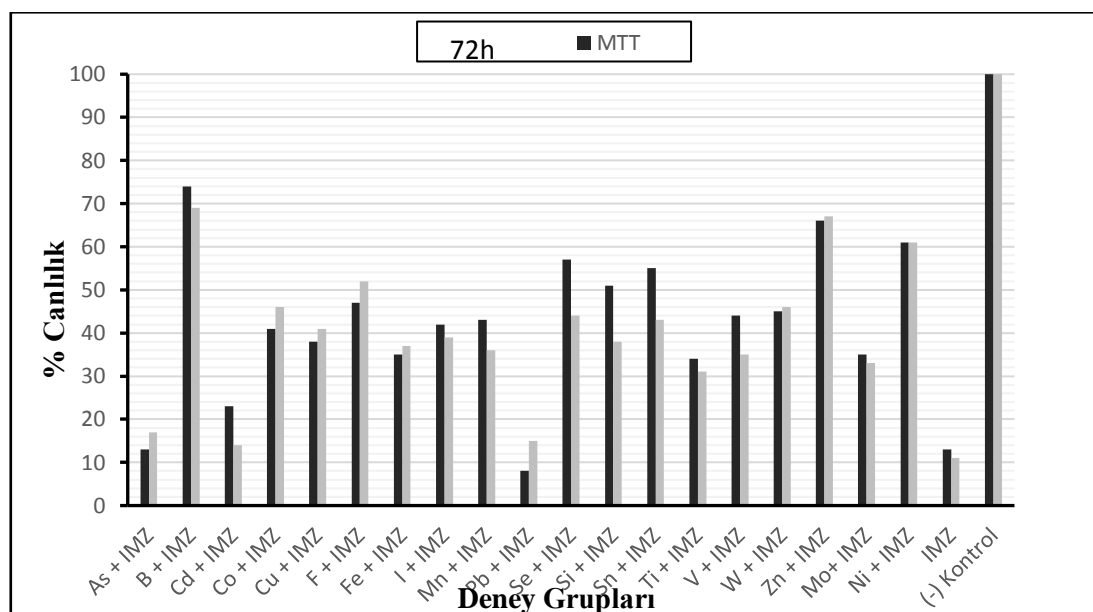
bırakılan grupların canlılık oranlarından daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Mo, Sn, Fe, Cu, F, Fe, Mn, Co, I, Ni ve Si ile tedavi edilen gruplarda ise kontrol gruplarıyla kıyaslandığında hücre canlılık oranlarında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Öte yandan toksisite sonuçları imazalil ile indüklenen *in vitro* toksisitede B, Se ve Zn'nin yüksek düzeylerde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'de imazalile maruz bırakılan iz elementlerle muamele edilen ve edilemeyen 24, 48 ve 72 saatlik hepatosit kültürlerinde gözlenen sitotoksosite düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 1. 24 saatlik primer rat hepatosit kültürlerinde imazalil ile indüklenen toksisiteye karşı iz element desteği sonrasında gözlenen MTT ve LDH analiz sonuçları



Şekil 2. 48 saatlik primer rat hepatosit kültürlerinde imazalil ile indüklenen toksisiteye karşı iz element desteği sonrasında gözlenen MTT ve LDH analiz sonuçları



Şekil 3. 72 saatlik primer rat hepatosit kültürlerinde imazalil ile indüklenen toksisiteye karşı iz element desteği sonrasında gözlenen MTT ve LDH analiz sonuçları

İmazalil toksisitesine karşı uygulanan iz elementlerin toplam antioksidan kapasiteleri ve toplam oksidan durumunu belirlemek için yapılan TAK ve TOD analizi sonuçları Tablo 1’de gösterilmiştir. 100 µM imazalil uygulanan grupta TAK değeri 3,77 ve TOD değeri ise 11,25 olarak hesaplanmıştır. Muamele yapılmayan ve yalnız imazalile maruz bırakılan kültür örnekleriyle kıyaslandığı zaman yüksek düzeylerde total antioksidan kapasitesinin gözlemlendiği elementler Mn, B, Se, Si ve Zn olarak sıralanırken; Mo, Sn, Fe ve Cu elementlerinin imazalil toksisitesi karşısında antioksidan kapasitesinin değişmediği görülmüştür. Ayrıca, As, Cd, Pb, Ti, V ve W destekleri sonrasında ise kontrol gruplarına kıyasla TAK değerlerinin düşük olduğu görülmüştür. TOD değerlerinde ise TAK analizine uygun şekilde Cd ve Pb en yüksek değere sahipken; B, F ve Zn en düşük değeri göstermiştir.

Tablo 1. İmazalil toksisitesine karşı uygulanan iz element destekleri sonrasında gözlenen TAK ve TOD değerleri

Elementler	TAK Değerleri	TOD Değerleri
As	5,32 ± 0,35	8,68 ± 0,44
B	13,44 ± 0,71	3,47± 0,22
Cd	3,92 ± 0,23	11,08 ± 0,56
Co	8,26 ± 0,45	5,80 ± 0,38
Cu	11,90± 0,68	4,13 ± 0,31
F	12,40± 0,71	3,97 ± 0,28
Fe	10,36 ± 0,45	6,03 ± 0,37
I	13,30 ± 0,70	3,81 ± 0,24
Mn	13,58 ± 0,71	3,13 ± 0,21
Pb	5,74± 0,36	9,41 ± 0,47
Se	13,44 ± 0,63	3,59 ± 0,20
Si	13,16 ± 0,81	4,09 ± 0,26
Sn	12,18 ± 0,54	4,27 ± 0,26

<b>Ti</b>	8,54 ± 0,40	6,12 ± 0,38
<b>V</b>	9,20 ± 0,55	5,77 ± 0,34
<b>W</b>	9,80 ± 0,51	5,21 ± 0,25
<b>Zn</b>	13,16 ± 0,69	3,69 ± 0,21
<b>Mo</b>	12,46 ± 0,70	4,38 ± 0,27
<b>Ni</b>	12,74 ± 0,58	4,35 ± 0,26
<b>İmazalil</b>	3,75 ± 0,19	11,25 ± 0,66

## TARTIŞMA

Literatür kayıtları, IMZ'ye maruz kalmanın, sıçanlarda dermatit ve egzama, farelerde endokrin fonksiyon bozukluğu ve zebrabalıklarında sinir sistemi işlev bozukluğu gibi çeşitli toksik etkilere yol açabileceğini ortaya koymaktadır (Tanaka, 1995; Nakagawa ve Tayama, 1997). Sisman ve Turkez (2010) çalışmalarında insan ve sucul ekosistemler üzerine imazalilin genotoksik ve teratojenik potansiyelinin varlığına işaret etmişlerdir. Jin ve ark., (2017) yaptıkları çalışmalarında imazalil maruziyetinin zebrabalıklarında bağırsak mikrobiyotası ve hepatik metabolizma bozukluğuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Yine, Jin ve ark. (2016) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarında oral imazalil maruziyetinin bağırsak mikrobiyotası çeşitliliği ve zenginliğinde azalmaya neden olduğunu ayrıca bu maruziyetin farelerde enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile karakterize kolonik enflamasyonu indükleyebildiği gözlenmiştir. Söz konusu bu sitotoksik etkilere ilaveten araştırmamız kapsamında gerçekleştirilen MTT ve LDH sitotoksikite analizleri, imazalil maruziyetinin rat hepatosit hücre ölümüne neden olduğunu açıkça göstermiştir. Diğer taraftan, imazalil ile indüklenen bu toksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdığımız 19 farklı iz element arasından Mn, B, Se, Si ve Zn'nin kontrollerle kıyaslandığında sitoprotektif etkiler gözlenirken; Cd ve Pb gibi diğer elementlerin koruyucu etkilerinin bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca sitoprotektif etkili elementler ile destekler sonrasında gözlenen TAK ve TOD değerleri ile ilişkili bulunmuştur. Bu sonuçların iz elementlerin sahip olduğu antioksidan kapasiteleri, anti-inflamatuvar etkileri, DNA koruyucu etkileri gibi avantajlı biyolojik özelliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, Zn, Se, Cu, B ve Si gibi elementlerin antioksidatif savunma mekanizmalarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bulgularımız özellikle bor, çinko, selenyum ve bakırın imazalil ile indüklenen *in vitro* toksisiteye karşı etkin sitoprotektif potansiyele sahip olduğu açıkça gösterilmiştir.

## SONUÇ

Sonuç olarak araştırma bulguları primer rat hepatositlerinde imazalil ile indüklenen hepatik sitotoksisiteye karşı iz element desteğinin belirgin sonuçlar ortaya koyduğunu göstermiştir. Pestisitler ve benzeri diğer kimyasalların oluşturduğu toksisitenin hafifletilmesinde iz elementlerin koruyucu ve tedavi edici potansiyelleri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda daha çok araştırılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Cancapa, A, Masiá, A, Navarroortega, A, Picó, Y, Barceló, D. 2016. Pesticides in the ebro river basin: occurrence and risk assessment. Environ. Pollut. 211, 414-424.
- Eddleston M, Karalliedde L, Buckley N, Fernando R, Hutchinson G, Isbister G.ve ark. 2002. Pesticide poisoning in the developing world-a minimum pesticides list. Lancet, 360, 1163-1167.
- Faniband MH., Littorin M., Ekman E, Jönsson AG, and Lindh CH. 2015 . LC-MS-MS Analysis of Urinary Biomarkers of Imazalil Following Experimental Exposures. *J Anal Toxicol*, 39(9): 691-697.
- Jin J, Mulesa, L, Carrilero RM. 2017. Trace elements in parenteral nutrition: Considerations for the prescribing clinician. *Nutrients*. 9, 440.
- Mossmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Meth*, 65, 55-63.
- Muto N, Hirai H, Tanaka T, Itoh N, Tanaka K. 1997. Induction and inhibition of cytochrome P450 isoforms by imazalil, a food contaminant, in mouse small intestine and liver. *Xenobiotica*, 27, 1215-1223.
- Nakagawa Y, Moore GA. 1995. Cytotoxic effects of postharvest fungicides, ortho-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes. *Life Sciences*, 57, 1433-1440.
- Ntzani EE, Chondrogiorgi M, Ntritsos G, Evangelou E, Tzoulaki I. 2013. Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA external scientific report*.

- Orton F, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*, 119, 794-800.
- Sisman T, Turkez H. 2010. Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicology and Industrial Health*, 26, 641-648.
- Tully BD, Collins JB, Overstreet JD, Smith SC, Dinse EG, Mumtaz MM, Chapin ER. 2000. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 168, 79-90.
- Zarn JA, Bruschiweiler BJ, Schlatter JR. 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 111, 255-261.

DRAFT

## EVA ve PP bazlı polimerik yüzeyler üzerine *Candida albicans* tutunmasının incelenmesi

Harun Rahmet Mut<sup>1</sup>, İkrime Orkan Uçar<sup>2\*</sup>, Özge Kılınçel<sup>3</sup>, Emel Çalışkan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

<sup>2\*</sup>Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Düzce, Türkiye

<sup>3</sup>Düzce Atatürk Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Düzce, Türkiye

<sup>4</sup>Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Düzce Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: [ikrimeucar@duzce.edu.tr](mailto:ikrimeucar@duzce.edu.tr)

### Özet

Biyomalzemelerin veya tıbbi ekipmanların yüzey özellikleri (ıslatılabilirlik, yüzey yükü, serbest yüzey enerjisi, yüzey pürüzlülüğü) bu yüzeyler üzerine olan mikroorganizma tutunmasını ve bu mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmin büyümesini önemli ölçüde etkiler. Biyomedikal uygulamalarda vücutla etkileşim halindeki tıbbi cihazların enfekte edici özellik kazanmaması için istenmeyen patojenik türlerin materyal yüzeylerine yapışmasının engellenmesi gerekir. Medikal işlemler sırasında kontaminasyonun önlenmesi için yapışma mekanizmasının anlaşılması, mikroorganizma ile yüzey arasındaki ilişkinin ortaya koyulması ve bu alana hizmet edecek antimikrobiyal / antibakteriyel yüzeylerin sentezlenmesi büyük önem taşır. Bu çalışmada etilen vinil asetat kopolimeri (EVA-12) ve polipropilen (PP) bazlı polimerik malzemelerin yüzey özellikleri ile medikal alanda fırsatçı patojenler olarak da bilinen ve sistemik mantar enfeksiyonlarının başlıca sebebi olan *Candida albicans* (*C. albicans*)'ın bu yüzeyler üzerine adezyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. *C. albicans*'ın polimerik yüzeylere yapışmasını değerlendirmek için farklı yüzey pürüzlülüğüne sahip polimerik yüzeyler daldırarak kaplama tekniği kullanılarak sentezlendi. Polimerik yüzeylerin yüzey karakterizasyonu optik mikroskop, temas açısı ölçümleri ve serbest yüzey enerjisi analizleri ile gerçekleştirildi. *C. albicans*'ın polimerik yüzeyleri kaplama oranı Image J görüntü analiz programı kullanılarak tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Candida albicans*, Adezyon, Biyofilm, Polimerik Yüzeyler, Daldırarak Kaplama

### Investigation of *Candida albicans* adherence to EVA and PP based polymeric surfaces

#### Abstract

The surface properties of biomaterials or medical equipments (wettability, surface charge, surface free energy, surface roughness) significantly affect the attachment of microorganisms on these surfaces and the growth of the biofilm formed by these microorganisms. In biomedical applications, it is necessary to prevent the unwanted pathogenic species from adhering to the material surfaces in order to avoid infecting the medical devices interacting with the body. Understanding of the adhesion mechanism for the prevention of contamination during medical procedures, demonstrating the relationship between the microorganism and the surface and synthesizing the antimicrobial / antibacterial surfaces that will serve this area are of great importance. In this study, the surface properties of ethylene vinyl acetate copolymer (EVA-12) and polypropylene (PP) based polymeric materials and the relationship between the adhesion of *Candida albicans* (*C. albicans*) on these surfaces, which are known as opportunistic pathogens in the medical field and the main cause of systemic fungal infections, were investigated. To evaluate the adhesion of *C. albicans* to polymeric surfaces, polymeric surfaces having different surface roughness were synthesized using the dip coating technique. Surface characterization of polymeric surfaces was performed by optical microscope, contact angle measurements and surface free energy analysis. The surface coverage ratio of the polymeric surfaces occupied by *C. albicans* was determined using the Image J image analysis program.

**Keywords:** *Candida albicans*, Adhesion, Biofilm, Polymeric Surfaces, Dip Coating

#### GİRİŞ

*Candida albicans* (*C. albicans*) türleri, klinik tıpta karşılaşılan en yaygın fungal fırsatçı patojenlerdir (Hart ve ark., 1969). *C. albicans*, *Candida* cinsinin en önemli ve en iyi bilinen maya türüdür. Genellikle kommensal bir organizmadır, ancak çeşitli koşullar altında immün sistemi baskılanmış bireylerde patojenik olabilir (Erdoğan ve Rao, 2015; Martins ve ark., 2014). *C. albicans* enfeksiyonları, kritik hastalıklar veya başka şekilde bağışıklığı zayıflamış hastalarda en fazla mantar enfeksiyonu kaynağıdır (Sydnor ve Perl, 2011). *Candida*'nın konak dokulara ve plastik yüzeylere tutunması, maya hücreleri tarafından kolonizasyonu ve daha sonra yayılmış mantar enfeksiyonu gelişimini başlatan ilk ve çok önemli bir adımdır. *C. albicans* mayalarının inert

polimerik yüzeylere yapışması, bu organizmaların insan konağına doğrudan girmesine izin verebilir. (Klotz ve ark., 1985). Mikroorganizmaların biyolojik ve inert yüzeylere yapışması, başarılı ve etkili mikrobiyal kolonizasyon ve enfeksiyon için hayati bir ön koşuldur. *C. albicans* yüzeyinde, konakçı hücre, doku ve plastikleri tanımasını ve güvenli bir şekilde bu yapılara bağlanmasını sağlayan çok sayıda reseptöre sahiptir (Sheppard ve ark., 2004). *C. albicans*'ın çeşitli biyomalzemelere ve konak dokulara bağlanması hem yüzeysel hem de derin yerleşimli kandidozun başlamasında önemli bir adım olarak kabul edilmiştir (Kennedy, 1988). Hidrofobik etkileşim, katı yüzeylere bakteri yapışmasında da önemli bir rol oynar. Bu etkileşimlerin *Candida* türlerinin plastik yüzeylere in vitro olarak bağlanmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Minagi ve ark., 1985; Klotz ve ark., 1985). Yapılan pek çok araştırma yüzey hidrofobikliğinin *Candida* virülansına birçok yoldan katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Biyofilmler; katı bir yüzeye yapışan bakteri ve diğer mikroorganizmalar topluluğunu içeren, ince fakat sağlam bir yapışkan sıvı tabakası formundaki mikroorganizma topluluklarıdır. Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların bir yüzeye eklenmesi ile başlar (O'Toole ve Kolter, 1998; Watnick ve Kolter, 2000). Bir biyofilmin ilk kolonist türleri, başlangıçta zayıf van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkiler ile yüzeye yapışabilir (Briand et al., 2001; Takahashi ve ark., 2010). Substratın hidrofobikliği, mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneğini de etkileyebilir. Biyofilmler protezler, lensler, kataterler, stentler, yapay kalp kapakçıkları, kalp pilleri, meme implantları, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı/cansız pek çok yüzeyde bulunabilirler. *C. albicans*, dişler gibi doğal yüzeylerde ve protezler gibi yabancı yüzeylerde biyofilm üretebilme kabiliyetine sahiptirler. Bu biyofilmler normal olarak yaygın antimikrobiyal tedaviye dirençli olup kliniklerde artan bir problemdir. Tüm bu nedenlerden ötürü yapışmanın olmadığı veya en aza indirildiği yüzeylerin sentezi büyük önem taşır.

Bu çalışmada *C. albicans*'ın PP, EVA ve EVA-PP karışımı yüzeylere olan adezyonu incelenmiş ve yüzey özellikleri ile ilişkilendirilmiştir.

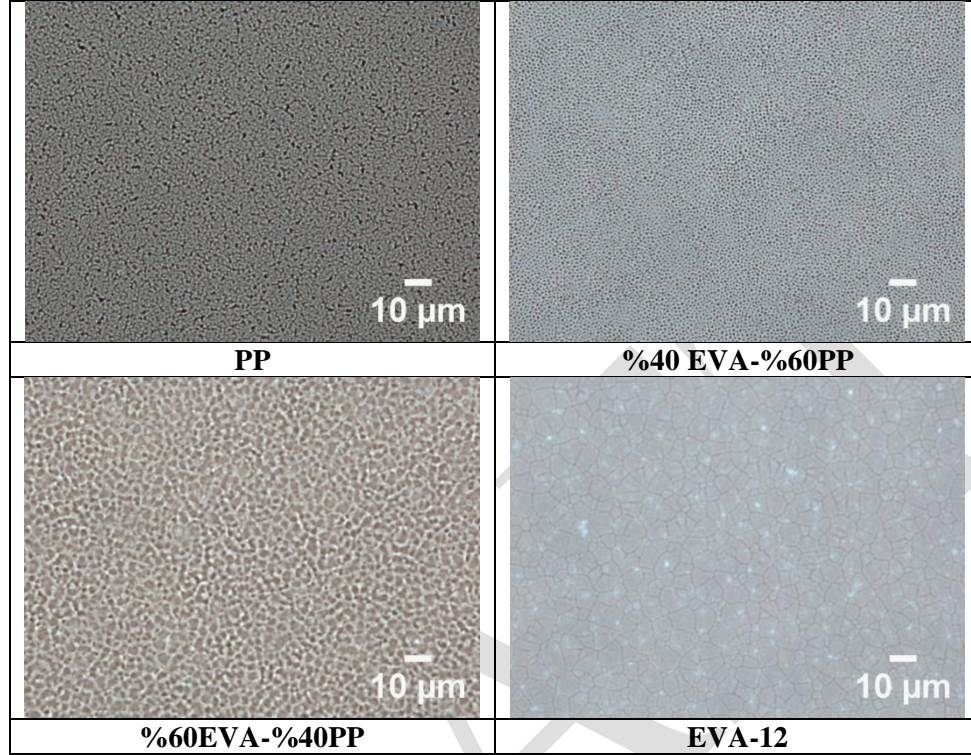
## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada polimer olarak polipropilen (PP), etilen vinil asetat kopolimer (%12 vinil asetat içerikli) (EVA-12) ticari polimerleri ve bu polimerlerin ağırlıkça %40EVA-%60PP ve %60EVA-%40PP karışımları kullanılmıştır. Polimerler ksilen içerisinde yüksek sıcaklıklarda çözülerek karıştırılmış ve 76 mm x 26 mm ebatlarındaki cam slaytlara daldırarak kaplama tekniği kullanılarak belirli sıcaklık ve kaplama hızında çift taraflı olarak kaplanmıştır. Kaplama öncesi cam slaytlar öncelikle polimerlerin cam yüzeye olan zayıf adezyonunun önüne geçmek için yine daldırarak kaplama tekniği kullanılarak bir epoksi tabaka ile kaplanmıştır. Yüzeylerin denge, ilerleme, gerileme temas açıları ve serbest yüzey enerjisi değerleri Attention Theta model temas açısı ölçüm cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Yüzeylerin serbest yüzey enerjisi değerlerinin tespitinde van Oss-Good metodu (Van Oss ve ark., 1988; van Oss ve Good, 1992) kullanılmış olup test sıvısı olarak saf su, etilen glikol, formamid ve metilen iyodür kullanılmıştır. Polimer yüzeylerin yüzey morfolojilerinin görüntülenmesinde ve yüzeylere yapışan mikroorganizmaların tespitinde Nikon Eclipse LV100ND model optik mikroskop ve Clemex Captiva görüntü analiz sisteminden faydalanılmıştır.

*Candida albicans* klinik izolatları Sabouraud dekstroz agar'da 24 saat boyunca 35°C'de inkübe edildi. Sabouraud dekstroz agar'da üreyen *C. albicans* kolonilerinden bir öze dolusu alınarak %8 glikoz ihtiva eden Sabouraud dextrose broth içine eklendi. 24 saat 35°C'de inkübe edilen suşlar %8 glikoz ihtiva eden Sabouraud dextrose broth içinde 1/100 oranında seyreltilerek maya süspansiyonu oluşturuldu. Polimer kaplı slaytlar polistiren petri kaplarının dibine yerleştirildi. Her yüzey üzerine yüzeyin üzerini tamamen kapatacak şekilde 20 ml maya süspansiyonu döküldü ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra maya süspansiyonu kaplı yüzeylerin üzerinden uzaklaştırıldı. Yüzeye yapışmayan *C. albicans* mayalarını uzaklaştırmak için yüzeylerin her iki tarafı fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 4'er kez yıkandı. Yapışan *C. albicans* mayalarını polimer kaplı yüzeyler üzerinde sabitlemek için metanol kullanıldı ve maya ihtiva eden polimer yüzeyler kristal viyole çözeltisi kullanılarak boyandı. Yüzeyler üzerine yapışan mayalar optik mikroskop ile 200x büyültmede fotoğraflandı. Elde edilen fotoğraflar Image J görüntü analiz programı kullanılarak siyah-beyaz görüntülere dönüştürüldü ve bu görüntülerden polimer yüzeylere yapışan *C. albicans* mayalarının yüzeyi kaplama oranı tespit edildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

PP, %40EVA-%60PP, %60EVA-%40PP ve EVA-12'ye ait 500x büyültmede çekilen optik mikroskop görüntüleri Şekil 1'de gösterilmektedir. Şekil 1'den görüldüğü üzere en fazla pürüzlü yüzey PP, en az pürüzlü yüzey ise EVA-12 yüzeyidir.



Şekil 1. Polimer yüzeylerin 500x büyültmede çekilen optik mikroskop görüntüleri

Polimerlerinin ıslatılabilirlikleri temas açısı ölçümleri ile belirlenmiş olup bu yüzeyler üzerinde ölçülen ilerleme ( $\theta_a$ ), denge ( $\theta_e$ ) ve gerileme ( $\theta_r$ ) temas açıları ölçüm sonuçları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Polimer yüzeyler üzerinde ölçülen temas açısı değerleri (°)

Polimer	$\theta_a$	$\theta_e$	$\theta_r$	CAH
PP	124	115	84	40
%40 EVA-%60PP	116	111	80	36
%60EVA-%40PP	108	107	91	17
EVA-12	93	90	80	13

Tablo 1'de verilen temas açısı sonuçlarına bakıldığında kullanılan polimerler arasında hidrofobisite sıralaması; PP>%40EVA-%60PP>%60EVA-%40PP>EVA-12 şeklinde olduğu görülmektedir. Bir yüzeyin heterojenliği ve pürüzlülüğü hakkında fikir veren temas açısı histeresisi (contact angle hysteresis) değeri (CAH), ilerleme ve gerileme açıları arasındaki fark olup, yüzeylerin PP'den EVA-12'ye doğru pürüzsüzleştiğini desteklemektedir.

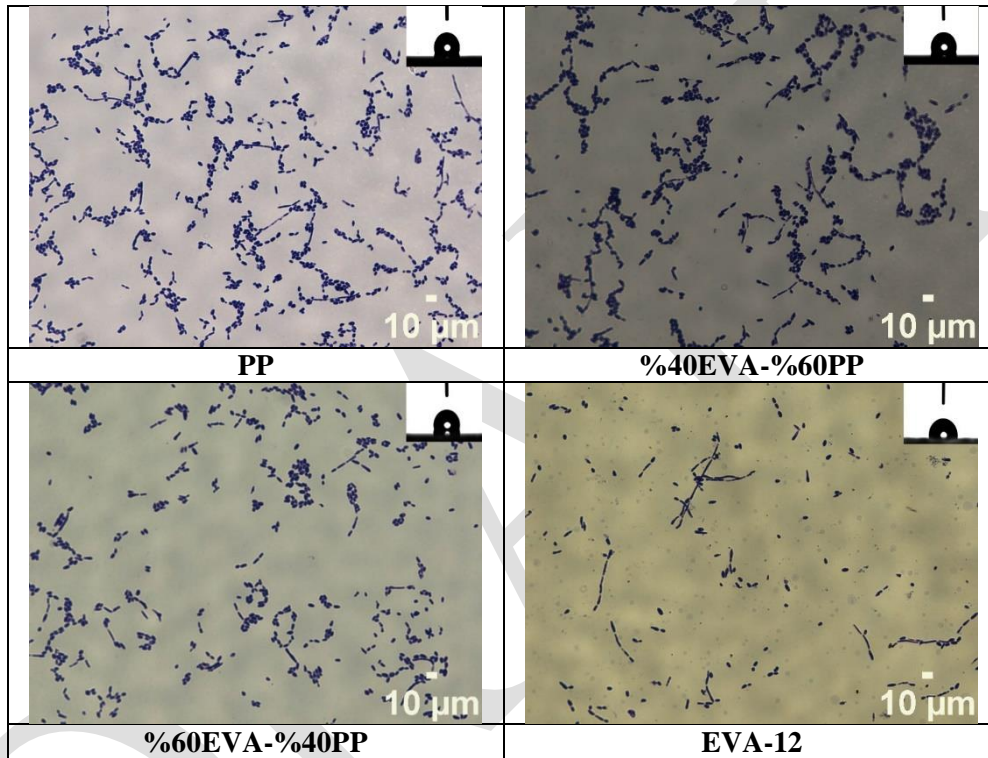
Bu sonuç Şekil 1'deki optik görüntülerle de desteklenmektedir. Yüzeylerin serbest yüzey enerjisi değerlerinin tespitinde van Oss-Good eşitliği (Denklem 1) kullanılmış olup, test sıvısı olarak saf su, etilen glikol, formamid ve metilen iyodür kullanılmıştır. Elde edilen serbest yüzey enerjisi değerleri ve parametreleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2 \left( \sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+} \right) \quad (1)$$

**Tablo 2.** Polimer yüzeylerin van Oss-Good metoduna göre hesaplanan serbest yüzey enerjisi değerleri ve parametreleri (mJ/m<sup>2</sup>)

Polimer	$\gamma_s^{LW}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma^{AB}$	$\gamma_s^{tot}$
PP	29.2	0.0	0.0	0.0	29.2
%40EVA-%60PP	29.7	0.0	0.0	0.0	29.7
%60EVA-%40PP	34.3	0.0	0.0	0.0	34.3
EVA-12	37.0	0.0	2.5	0.0	37.0

Şekil 2, *C. albicans*'in polimer yüzeylerde tutunmasını gösteren ve 200x büyültmede çekilmiş optik mikroskop görüntülerini göstermektedir. Tablo 3'te ise *C. albicans*'in polimer yüzeylerini kaplama oranı yüzdesi nümerik olarak verilmiştir.



**Şekil 2.** Polimer yüzeylere tutunan *C. albicans*'in 200x büyültmede çekilmiş optik mikroskop görüntüleri

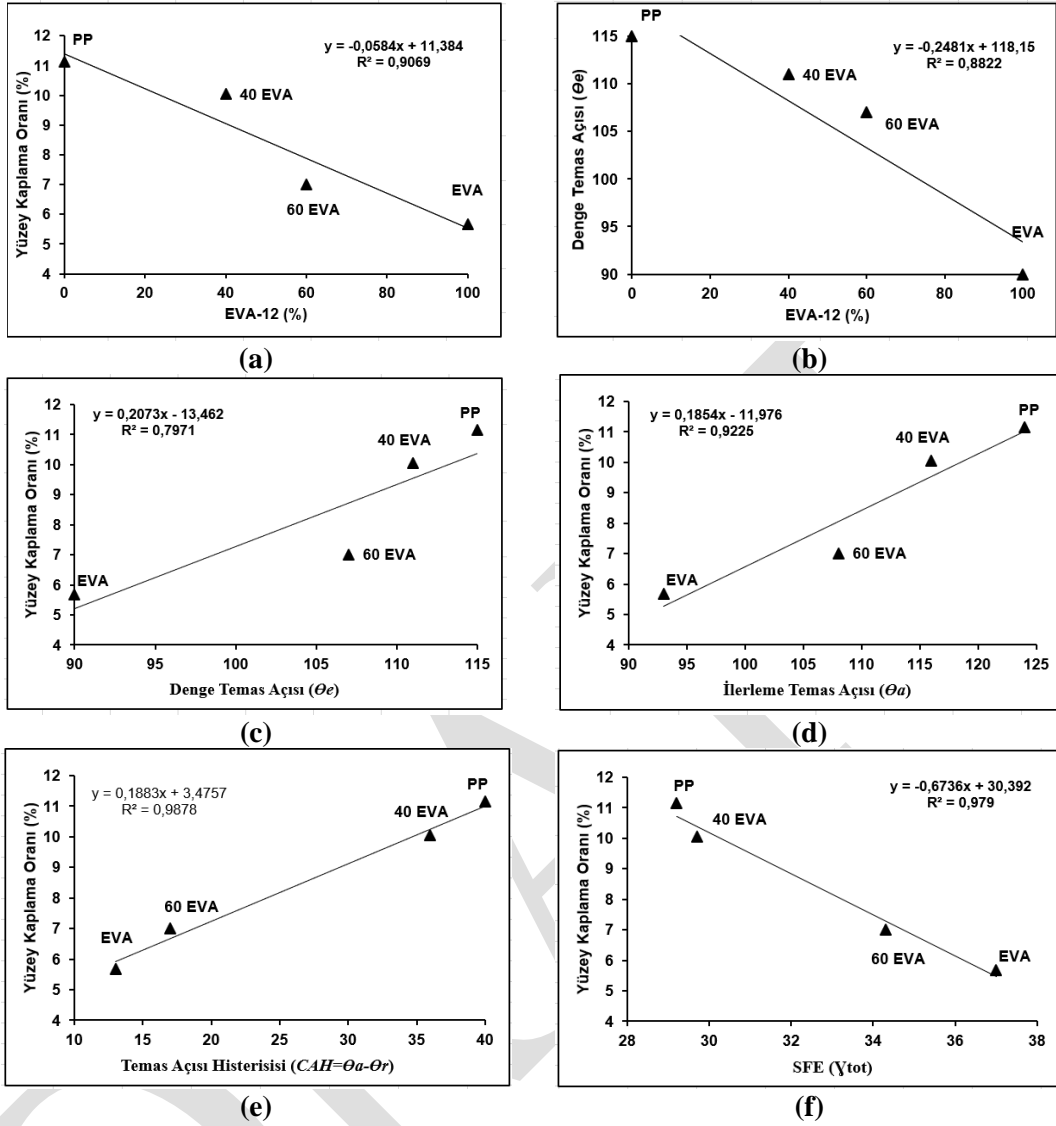
**Tablo 3.** Polimer yüzeylere tutunan *C. albicans*'in yüzey kaplama oranı değerleri

Polimer	Yüzey Kaplama Oranı, (%)
PP	11.14
%40EVA-%60PP	10.04
%60EVA-%40PP	7.01
EVA-12	5.67

Hem Şekil 2 ve hem de Tablo 3'ten görüldüğü üzere maksimum *C. albicans* adezyonu en pürüzlü yüzey olan PP yüzey üzerinde, minimum adezyon ise en pürüzsüz yüzey olan EVA-12 yüzey üzerinde gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan yüzey pürüzlülüğünün *C. albicans*'in yüzeylere tutunmasında çok önemli bir faktör olduğu görülmektedir. Çünkü mikroorganizmalar kendilerine bir koruma alanı oluşturmak için genellikle yüzeylerdeki girintiler, çukurlar, kusurlar içinde birikmeyi tercih ederler. Bu durum pürüzlü yüzeylerde tutunmanın daha fazla olmasına sebep olurken, düz yüzeylerde tutunmanın az olmasının bir gerekçesidir. Şekil 3a ve 3b yüzey kaplama oranı ve su denge temas açısı değerleri ile polimerlerin ihtiva ettiği ağırlıkça EVA-12



içeriği, Şekil 3c, 3d, 3e ve 3f ise yüzey kaplama oranı ile denge temas açısı, ilerleme temas açısı, temas açısı histeresisi ve serbest yüzey enerjisi arasındaki ilişkiyi göstermektedir.



**Şekil 3.** a ve b yüzey kaplama oranı ve denge temas açısı ile polimerlerdeki ağırlıkça % EVA-12 içeriği arasındaki ilişki, c, d, e ve f yüzey kaplama oranı ile denge temas açısı, ilerleme temas açısı, temas açısı histeresisi ve serbest yüzey enerjisi arasındaki ilişki

Şekil 3a'dan görüldüğü üzere *C. albicans*'ın yüzeyi kaplama oranı polimer yüzeylerin içermiş olduğu ağırlıkça EVA-12 yüzdesi ile ters orantılı olarak değişmektedir. EVA-12 içeriğinin artışı ile birlikte yüzey daha düz bir morfoloji aldığından yüzeye tutunan *C. albicans* yüzdesi düşmektedir. Şekil 3b'den anlaşıldığı üzere polimer yüzeylerin ihtiva ettiği EVA-12 içeriğindeki artış denge temas açısı değerlerinin düşmesine neden olmaktadır, bu durum hidrofobisitenin düşmesi ve dolayısıyla ıslatılabilirliğin artışından dolayı beklenen bir sonuçtur. Yüzey kaplama oranı ile denge temas açısı ve ilerleme temas açısı arasındaki ilişkiyi gösteren Şekil 3c ve Şekil 3d, yüzeyin hidrofobisitesindeki artışla yüzey kaplama oranının arttığını göstermektedir. Diğer bir ifade ile polimerik yüzeylerin denge ve ilerleme temas açılarındaki artışla birim alan başına yapışan mikroorganizma yüzdesinin arasında doğrusal bir ilişki vardır. Yüzey kaplama oranı ile bir yüzeyin heterojenliği ve pürüzlülüğünün bir ölçütü olan temas açısı histeresisi arasındaki ilişkiyi gösteren Şekil 3e ise histeresisteki artışla yüzey kaplama oranının oldukça lineer bir ilişkide arttığını göstermektedir. Bu sonuç yüzey pürüzlülüğünün çok önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Yüzey kaplama oranı ile yüzeylerin serbest yüzey enerjisi arasındaki ilişkiyi gösteren Şekil 3f ise serbest yüzey enerjisindeki artışla yüzey kaplama oranının düştüğünü ve bu düşüşün de oldukça lineer olduğunu göstermektedir.

Tüm bu sonuçlardan yüzey özelliklerinin, *C. albicans*'ın polimer yüzeylerine yapışmasında çok önemli bir rol oynadığı açıkça görülmektedir.

## SONUÇ

Bir polimerik yüzeyin yüzey pürüzlülüğündeki artış, *C. albicans*'ın polimer yüzeylerinde birim alan başına tutunma yüzdesini arttırmaktadır. Bunun sebebi bu tip mikroorganizmaların pürüzlü yüzeylerde kendilerini koruyabilecekleri bir alan arama gereksinimidir ve pürüzlü yüzeylerin ihtiva ettiği çukur, girinti ve kusurlar onlar için bulunmaz birer fırsattır. Bu çalışmada en pürüzlü yüzey olduğu için PP'de maksimum, en düz yüzey olduğu için EVA-12'de minimum yüzey kaplama oranı elde edilmiştir. Artan EVA-12 miktarı ile birlikte polimer yüzeyler daha düz bir morfoloji aldığı için *C. albicans*'ın yüzeyi kaplama oranlarının doğrusal bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Yüzey kaplama oranı ile denge temas açısı, ilerleme temas açısı ve temas açısı histeresisi arasında doğru, serbest yüzey enerjisi arasında ise ters orantılı bir ilişki söz konusudur. Bunlar içinde yüzey heterojenliğinin ve pürüzlülüğünün bir ölçütü olan temas açısı histeresisi bu ilişkinin ne denli kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Polimerik malzemelerin mikro ölçekteki etki alanlarının yüzey özelliklerinin araştırılması ve mikroorganizmalarla etkileşiminin incelenmesi, bu patojenlerin intravasküler kanallara, vasküler protezlere ve diğer medikal cihaz kaplamalarına yapışmasını engellemek veya asgariye indirmek için kullanılabilecek faydalı bilgiler sağlayabilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında desteklenmiştir. Proje Numarası: 2016.06.07.488.

## KAYNAKLAR

- Briandet R, Herry J, Bellon-Fontaine M 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 21: 299-310.
- Erdogan A, Rao SS 2015. Small intestinal fungal overgrowth. *Current Gastroenterology Reports*, 17:1-7.
- Hart PD, Russell E Jr, Remington JS 1969. The compromised host and infection. II. Deep fungal infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 120:169-191.
- Kennedy MJ 1988. Adhesion and association mechanisms of *Candida albicans*. *Current Topics in Medical Mycology*, 2:73-169.
- Klotz SA, Drutz DJ, Zajic JE 1985. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infection and Immunity*, 50: 97-101.
- Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M 2014. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, 177: 223-240.
- Minagi S, Miyake Y, Inagaki K, Tsuru H, Suginaka H 1985. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infection and Immunity*, 47: 11-14.
- O'Toole GA, Kolter R 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28: 449-461.
- Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Phan QT, Fu Y, Ibrahim AS, Filler SG, Zhang M, Waring AJ, Edwards JE Jr 2004. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 30480-30489.
- Sydnor ER, Perl TM 2011. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 24: 141-173.

- Takahashi H, Suda T, Tanaka Y, Kimura B 2010. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 618-625.
- Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88: 927-941.
- Van Oss CJ, Good RJ 1992. Prediction of the solubility of polar polymers by means of interfacial tension combining rules. *Langmuir*, 8: 2877-2879.
- Watnick P, Kolter R 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182: 2675-2679.

DRAFT

## Metoksi nitrokinolinlerin sentezi ve HeLa ve MCF7 kanser hücrelerine karşı antikanser potansiyellerinin belirlenmesi

Salih ÖKTEN<sup>1\*</sup>, Ali Aydın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Tübitak MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: salihokten@kku.edu.tr

### Özet

6,8-Dimetoksi ve 8-metoksi kinolin tek basamaklı reaksiyon ile yeni nitrolanmış metoksikinolin türevlerine dönüştürüldü. Sentezlenen yeni türevlerin yapıları <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR yöntemleri ile karakterize edildi. Mono ve dinitro metoksi kinolin türevlerinin HeLa (rahim ağzı kanser hücresi) ve MCF7 (meme kanseri hücresi) kanser hücrelerine karşı antikanser özellikleri, MTT hücre proliferasyonu ve LDH hücre sitotoksitesi yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre, çalışılan her iki hücre hattında da dimetoksi nitrokinolin türevinin kontrol bileşiği 5-Florouasil bileşiğinden daha düşük IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında etkili olduğu belirlenmiştir. Dinitro 8-metoksi kinolin türevi sadece MCF7 kanser hücre hattına karşı (IC<sub>50</sub> = 27,8 µg/mL) antiproliferatif etki gösterirken, mono nitro türev her iki kanser hücre hattına karşı da inhibisyon etkisi göstermemiştir. Sonuç olarak, dimetoksi nitrokinolin türevinin, HeLa ve MCF7 inhibitörü olma potansiyeli varken dinitro 8-metoksi kinolin türevinin ise hücre spesifik olarak sadece MCF7 karşı inhibisyon potansiyelinin olduğu ifade edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Metoksi kinolin, nitrolama, antikanser, HeLa, MCF7

### Synthesis of Methoxy nitroquinolines and determination of their anticancer potentials against HeLa and MCF7

### Abstract

6,8-Dimethoxy and 8-methoxy quinoline were converted to the novel nitrated methoxyquinoline derivatives by one pot reaction. The structures of the newly synthesized derivatives were characterized by <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR methods. The anticancer properties of mono and dinitrated methoxy quinoline derivatives against HeLa (cervical cancer cell) and MCF7 (breast cancer cell) cancer cells were determined by MTT cell proliferation and LDH cell cytotoxicity methods. According to the results, it was determined that the dimethoxy nitroquinoline derivative was effective at the lower IC<sub>50</sub> concentrations compared with 5-fluorouracil, control compound, against both worked cell lines. Dinitro 8-methoxy quinoline derivative showed antiproliferative effect only against MCF7 cancer cell line (IC<sub>50</sub> = 28 µg / mL), while mono nitro derivative did not show any inhibitory effect against both cancer cell lines. As a result, it can concluded that the dimethoxy nitroquinoline derivative has the potential to be HeLa and MCF7 inhibitor, while the dinitro 8-methoxy quinoline derivative has the cell-specific inhibition potential against MCF7 only.

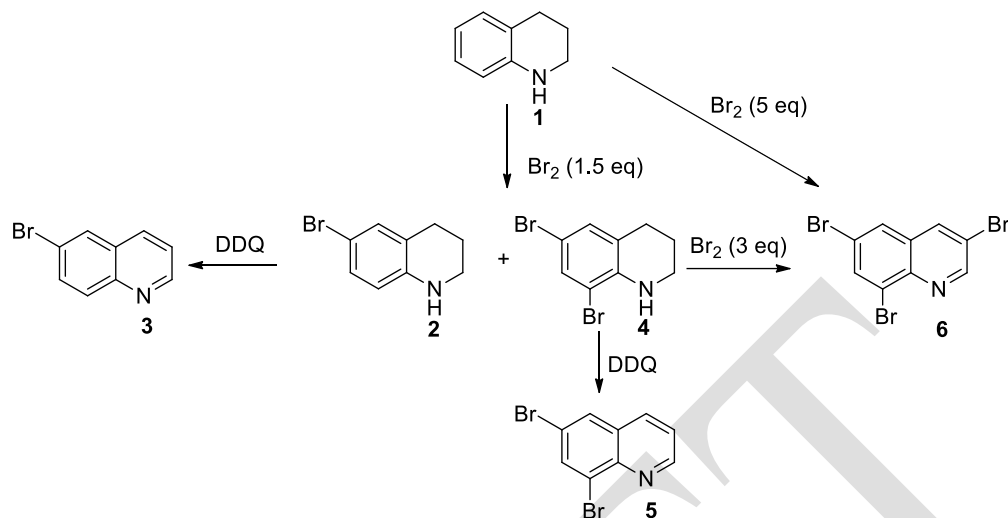
**Keywords:** Methoxy quinoline, nitration, anticancer, HeLa, MCF7.

### GİRİŞ

Kanser, dünyadaki insan sağlığı için kontrolsüz bir büyümeye ve hücrelerin kan yoluyla vücuda yayılarak diğer doku ve organları istila etmelerine neden olan bölünmelerine yol açması nedeniyle büyük tehdit edici bir problemdir (Tuğrak ve ark., 2018).

Kinolin türevleri birçok doğal üründe (Srivastava ve ark., 2000) ve sentetik ilaçlarda (Zhang ve ark., 2000) bulunur. Kinolin iskeleti, antiastmatik, anti-enflamatuvar, antimalaral (Marella ve ark., 2013), antikanser (Solomon ve ark., 2009) ve antibiyotik aktivitesi (Berger ve ark., 2003) gibi geniş yelpazede tıbbi faydalar (Muscia ve ark., 2006; Marella ve ark., 2013) sergileyen bileşikler geliştirmek için kullanılmaktadır.

Yakın zamanda, süstitüe edilmiş veya süstitüe edilmemiş 1,2,3,4-tetrahidrokinolinlerin (**1**), brominasyon reaksiyonuna temelli, 6-bromo **3**, 6,8-dibromo **5** ve 3,6,8-tribromokinolinlerin (**6**) sentezi için yeni bir sentetik stratejiler keşfettik (Şema 1) (Çelik ve ark., 2010; Ökten ve ark., 2015; Ökten ve Çakmak, 2015).



Şema 1. 1,2,3,4-Tetrahidrokinolinin Brominasyon Ürünleri

Kinolinlerin işlevselleştirilmesi için bromo ve metoksi kinolinlerin nitrolanması yoluyla yeni bir strateji keşfettik. Çünkü, kinoline bağlı nitro grupları brom atomlarını nükleofilik yer değiştirme reaksiyonları için genel olarak aktifleştirmektedir. Ayrıca, nitro grupları, amin oluşumu için iyi başlangıç maddeleridir.

## MATERYAL VE METOT

### Bileşiklerin sentezlenmesi için genel metot

8-Metoksikinolin, sülfürik asit içerisinde çözündürüldü ve tuz-buz banyosu ile soğutuldu. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve HNO<sub>3</sub> karışımı hazırlandı ve soğutuldu. 8-Metoksikinolin çözeltisi manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / HNO<sub>3</sub> karışımı bir pastör pipeti yardımıyla damla damla ilave edildi. Bir saat sonra reaksiyon tamamlandı, reaksiyon karışımı ezilmiş buz üzerine döküldü. Buz eridikten sonra, karışım organik çözücülerle ekstre edildi. Organik faz, NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi ile nötrale edildi ve Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kuruldu. Çözücü vakumda uzaklaştırıldı.

### MTT Hücre Proliferasyon Protokolü

HeLa (İnsan serviks adenokarsinomu) ve MCF7 (İnsan göğüs adenokarsinomu) kanser hücre hatları fetal bovin serumu ve antibiyotik çözeltisi içeren uygun bir ortamda muhafaza edildi. Hücre süspansiyonu, 10 mL'de 1 x 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ayarlandı ve kültür plakalarının her bir oyuğuna 100 µL aktarıldı. Bileşikler, 10-200 µg / mL'lik nihai konsantrasyonlarda steril DMSO içerisinde çözündürüldü ve hücreleri gece boyunca % 5 CO<sub>2</sub> ile 37° C'de bekletildi. Bileşiklerin antitümör aktiviteleri, MTT hücre çoğalması deneyi kullanılarak belirlendi. MTT testinde, test ve kontrol moleküllerinin yüzde inhibisyonu belirlendi.

### LDH Sitotoksosite Protokolü

Bileşiklerin sitotoksik potansiyelleri, üreticinin prosedürlerine göre saytosolik LDH ölçüm kiti ile belirlenmiştir. Kısaca, her bir oyuğa 5 x 10<sup>3</sup> hücre aktarıldı ve üç kez 37 ° C'de bileşiklerin IC50 konsantrasyonları ile %5 CO<sub>2</sub> ile gece boyunca maruz bırakıldı. Aşağıdaki denklem kullanılarak sitotoksosite yüzdesi elde edildi,

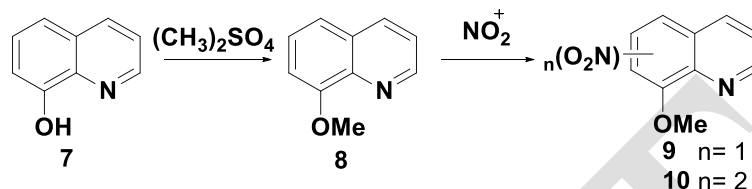
$$\frac{[(\text{deneysel değer} - \text{düşük kontrol}) / (\text{yüksek kontrol} - \text{düşük kontrol})] \times 100}{\text{deneysel değer}}$$

deneysel değer test bileşiği ile muamele edilmiş hücreler olduğunda, yüksek kontrol (maksimum LDH salımı) Triton X-100 muamele edilmiş hücreler, düşük kontrol (spontan LDH salımı) işlenmemiş hücrelerdir.

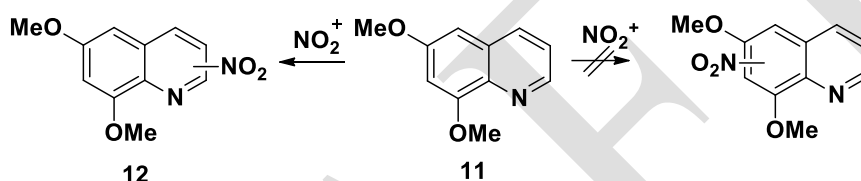
## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Nitrolanmış Metoksikinolinlerin Sentezi

8-Metoksikinolin (**8**) daha önce rapor edilen prosedürlere (Çakmak ve ark., 2018) 8-hidroksikinolinden (**7**) başlayarak sentezlendi (Şema 2). Daha sonra, 8-metoksikinolin (**8**) nitrat karışımı ( $H_2SO_4/HNO_3$ ) ile karıştırıldı ve mono nitro ve dinitro 8-metoksikinolinler elde edildi (Şema 2). Oluşan ürün karışımı kolon kromatografisi ile izole edildi. Aynı işlem 6,8-dimetoksikinoline uygulandı. Bu işlem de ise beklenen ürünler yerine heterosiklik halkada nitrolama işlemi netice verdi (Şema 3). Oluşan ürünlerin yapıları  $^1H$  NMR ve  $^{13}C$  NMR teknikleri ile aydınlatıldı.



Şema 2. 8-Metoksikinolinin nitrolanması



Şema 3. 6,8-Dimetoksikinolinin nitrolanması

### Antiproliferatif Aktivite Testleri

Yeni sentezlenen moleküllerin hücre proliferasyonuna olan etkileri (NCI-60 tarama metodolojisi) ve  $IC_{50}$  değerlerini ölçmek amacıyla MTT testi yapıldı. Moleküllerin sahip olduğu  $IC_{50}$  değerleri incelendiğinde, **10** ve **12** nolu moleküller MCF7 hücre hattında güçlü antikanser özellik göstermişlerdir (sırasıyla  $IC_{50}$  27,8 ve 22,5  $\mu g/mL$ ) (Tablo 1). HeLa hücre hattında ise sadece **12** nolu bileşik ( $IC_{50}$  değerleri 61,2  $\mu g/mL$ ) yüksek oranda antikanser özellik göstermiştir. Bu moleküllerin kontrol bileşiklerine (Cisplatin ve 5-Florourasil) göre daha iyi etki göstermişlerdir (Tablo 1). Bu sonuçlar moleküllerin seçici şekilde kanser hücreleri üzerinde daha çok etkili olduğunu göstermektedir.

**Tablo 1.** Nitrolanmış Metoksi kinolinlerin MCF7 ve HeLa kanser hücre hatlarına karşı  $IC_{50}$  değerleri

Bileşikler	MCF7	HeLa
	$IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ )	$IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ )
<b>12</b>	22,5	61,2
<b>10</b>	27,8	>1000
<b>9</b>	>1000	>1000
<b>Cisplatin</b>	63,79	50,29
<b>5-FU</b>	74,19	61,59

## SONUÇ

Önceki çalışmalarımızda brominasyon ile fonksiyonize edilen ve yeni türevlere dönüştürülen kinolin çekirdeğini nitrolanması ile yeni bir yaklaşımla işlevsellik kazandırılmıştır. Çünkü nitro grupları, kinolin halkasına bağlı brom atomlarının yer değiştirme reaksiyonlarında aktif hale getirmektedir. Ayrıca nitro gruplarının indirgenerek yeni amin bileşiklerine dönüştürülme potansiyelleri mevcuttur. Yeni sentezlenen bileşiklerin seçici olarak kanser hücrelerine karşı anti proliferatif aktivite göstermeleri yeni antikanser ajan adayları olduklarına delildir.

## KAYNAKLAR

- Berger D, Dutia M, Powell D, Wu B, Wissner A, Boschelli DH, Floyd MB, Zhang N, Torres N, Levin J, Du X, Wojciehowicz D, Discifani C, Kohler C, Kim SC, Feldberg LR, Collins K, Mallon R 2003.

Synthesis and evaluation of 4-Anilino-6,7-dialkoxy-3-quinolinecarbonitriles as inhibitors of kinases of the Ras-MAPK signaling cascade. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13: 3031-3034.

2. Çelik İ, Akkurt M, Ökten S, Çakmak O, Garcia-Granda S 2010. 6,8-dibromoquinoline. *Act Cryst. Sec. E*, E66:03133.
3. Marella A, Tanwar OP, Saha R, Ali MR, Srivastava S, Akhter M, Shaquiquzzaman M, Alam MM, 2013. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharm. J.*, 21:1-12.
4. Muscia GC, Bollini M, Carnevale JP, Bruno AM, Asis SE 2006. Microwave-assisted Friedländer synthesis of quinolines derivatives as potential antiparasitic agents. *Tetrahedron Lett.*, 47:8811-8815.
5. Ökten S, Eyigün D, Çakmak O, 2015. Synthesis of Brominated Quinolines. *Sigma J. Eng. Nat. Sci.*, 33: 8-15.
6. Ökten S, Çakmak O 2015. Synthesis of Novel Cyano Quinoline Derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 56: 5337-5340.
7. Srivastava SK, Chauhan PMS, Bhaduri AP, Fatima N, Chatterjee R 2000. Quinolones: Novel Probes in Antifilarial Chemotherapy. *J. Med. Chem.*, 43:2275-2279.
8. Solomon VR, Lee H 2009. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.*, 625:220-233.
9. Tugrak M, Gul HI, Sakagami H, Gulcin I, Supuran CT 2018. New azafluorenones with cytotoxic and carbonic anhydrase inhibitory properties: 2-Aryl-4-(4-hydroxyphenyl)-5H-indeno[1,2-b]pyridin-5-ones *Bioorg. Chem.*, 81: 433-439.
10. Zhang N, Wu B, Powell D, Wissner A, Floyd MB, Kovacs ED, Toral-Barza L, Kohler C 2000. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 3-Cyano-4-(phenoxyanilino)quinolines as MEK (MAPKK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10:2825-2828.

## Bazı siyano kinolin türevlerinin antikanser ve antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi

Salih Ökten<sup>1\*</sup>, Ali Aydın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kırıkkale, Türkiye

<sup>2</sup>Tübitak MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Kocaeli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: salihokten@kku.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, grubumuz tarafından sentezlenen bir seri mono ve disiyano kinolin ve tetrahidrokinolin türevleri A549 (akciğer kanser hücre hattı) hücre hattına karşı antikanser aktivitesi ve Gram (+) ve Gram (-) patojen bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Siyano kinolinlerin antibakteriyel aktivite belirlenmesi için patojen üç Gram (+) (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC46300, *Enterococcus faecalis* ATCC29212) ve iki Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) kullanılmıştır ve MIC metodu ile yapılmıştır. Anti kanser aktivite çalışmalarında ise MTT hücre proliferasyonu ve LDH hücre sitotoksitesi yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, A549 hücre hattına karşı 6-bromo-8-siyanokinolin ve 8-bromo-6-siyanokinolin bileşiklerinin önemli ölçüde antiproliferasyon ( $IC_{50} = 10.4$  ve  $28.3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sırasıyla) göstermelerine karşın disiyano ve tetrahidrokinolin türevlerinin etkisiz olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin Gram (+) bakteriler üzerinde sergiledikleri MIC değerleri incelendiğinde, *S. aureus* ATCC29213 suşuna karşı 6-bromo-8-siyanokinolin ve 6,8-disiyanokinolin bileşiklerinin (MIC değerleri sırasıyla; 250, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), *S. aureus* ATCC46300 suşuna karşı 6-bromo-8-siyanokinolin molekülünün (MIC değeri 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pozitif kontrol olarak kullanılan SCF (sulbactam (30  $\mu\text{g}$ ) + cefoperazone (75  $\mu\text{g}$ )) antibiyotikinden daha fazla ya da benzer duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir. Fakat siyanokinolin bileşikleri çalışılan Gram (-) bakterilere karşı yeterince antimikrobiyal aktivite gösterememiştir. Sonuç olarak, 6-bromo-8-siyanokinolin türevinin, A549 inhibitörü olma potansiyeli ve bazı Gram (+) bakteriler karşı da antibakteriyel özelliklere olduğu ifade edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Siyano kinolin, antibakteriyel, antikanser, A549

### Determination of anticancer and antibacterial properties of some cyanoquinoline derivatives

#### Abstract

In this study, against Gram and (-) and Gram (-) pathogenic bacteria antimicrobial activities and against A549 (lung cancer cell line) anticancer activities of a series of mono and dicyano quinoline and tetrahydroquinoline derivatives synthesized by our group were investigated. Pathogenic three Gram (+) (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* ATCC46300, *Enterococcus faecalis* ATCC29212) and two Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) bacteria species and MIC method was used. MTT cell proliferation and LDH cell cytotoxicity methods were used in anti-cancer activity studies. According to the results, 6-bromo-8-cyanoquinoline and 8-bromo-6-cyanoquinoline compounds against the A549 cell line showed significant antiproliferation ( $IC_{50} = 10.4$  and  $28.3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively), but dicyano and tetrahydroquinoline derivatives were ineffective. When the MIC values of these compounds on Gram (+) bacteria were examined, the 6-bromo-8-cyanoquinoline and 6,8-dicyanoquinoline compounds against the *S. aureus* ATCC29213 and *S. aureus* ATCC46300 (MIC values of 250, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively). 6-Bromo-8-cyanoquinoline molecule (MIC value 125  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) was found to be more or more similar to the SCF (sulbactam (30  $\mu\text{g}$ ) + cefoperazone (75  $\mu\text{g}$ ) antibiotic used as a positive control. However, cyanoquinoline compounds did not show sufficient antimicrobial activity against the studied Gram (-) bacteria. As a result, it can be said that the 6-bromo-8-cyanoquinoline derivative has the potential to be A549 inhibitor and to some Gram (+) bacteria against antibacterial properties.

**Keywords:** Cyano quinoline, antibacterial, anticancer, A549.



## GİRİŞ

Kinolin çekirdeği, geniş bir biyolojik aktivite spektrumu sergileyen birçok doğal ve farmakolojik açıdan aktif bileşiklerin ana iskeletini oluşturur (Srivastava ve ark., 2000, Zhang ve ark., 2000, Muscia ve ark., 2006, Solomon ve ark., 2009). Özellikle, C-3 pozisyonunda süstitüe edilmiş siyano kinolin bileşikler, büyüme faktörü reseptör proteinini tirozin kinaz aktivitesini etkisiz hale getirebilirler (Berger ve ark., 2003). Siyano gruplarına sahip ajanlar, aynı zamanda biyolojik sistemlerle bağlanan küçük molekül inhibitörleri olarak da işlev görürler (Fleming ve ark., 2000). Kinolin halkasının sentezi ve türevlendirilmesi üzerine önemli çalışmalar rapor edilmiştir. En yaygın stratejiler, N-fonksiyonelleştirilmiş benzen veya sikloheksanın halkalaşma reaksiyonlarıdır (Gurnos, 1977). 2-Siyano süstitüe dihidro ve tetrahidrokinolinlerin asimetrik sentezleri, Reissert reaksiyonu kullanılarak rapor edildi (Pauvert ve ark., 2005). 8-Siyano süstitüe kinolin polar çözücüler içinde alkinlerle işlevselleştirilmiş keton ile siyano anilinin muamelesi ile sentezlenir (Martin ve ark., 2006). Bununla birlikte, siyano ile süstitüe edilmiş N-fonksiyonelleştirilmiş aromatikler kullanılarak yapılan halkalaşma reaksiyonları, yalnızca mono siyano süstitüe kinolinlerin sentezine izin verir (Charpentier ve ark., 1998). Bu nedenle, polisiyano ile ikame edilmiş kinolinlerin sentezi kısıtlanmıştır.

Son yıllarda, süstitüe veya unsüstitüe 1,2,3,4-tetrahidrokinolinlerin, brominasyon reaksiyonuna temelli, 6-bromo, 6,8-dibromo ve 3,6,8-tribromokinolinlerin sentezi için yeni bir sentetik stratejiler keşfettik (Çelik ve ark., 2010; Ökten ve ark., 2015; Ökten ve Çakmak, 2015).

## MATERYAL VE METOT

### Bileşiklerin sentezlenmesi için genel metot

Bu çalışma, önceki çalışmamızda sentezlenen siyanokinolin türevleri ile yapıldı.

### MTT Hücre Proliferasyon Protokolü

HeLa (İnsan serviks adenokarsinomu) ve MCF7 (İnsan göğüs adenokarsinomu) kanser hücre hatları fetal bovin serumu ve antibiyotik çözeltisi içeren uygun bir ortamda muhafaza edildi. Hücre süspansiyonu, 10 mL'de  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ayarlandı ve kültür plakalarının her bir oyuğuna 100 µL aktarıldı. Bileşikler, 10-200 µg / mL'lik nihai konsantrasyonlarda steril DMSO içerisinde çözüldürüldü ve hücreleri gece boyunca % 5 CO<sub>2</sub> ile 37° C'de bekletildi. Bileşiklerin antitümör aktiviteleri, MTT hücre çoğalması deneyi kullanılarak belirlendi. MTT testinde, test ve kontrol moleküllerinin yüzde inhibisyonu belirlendi.

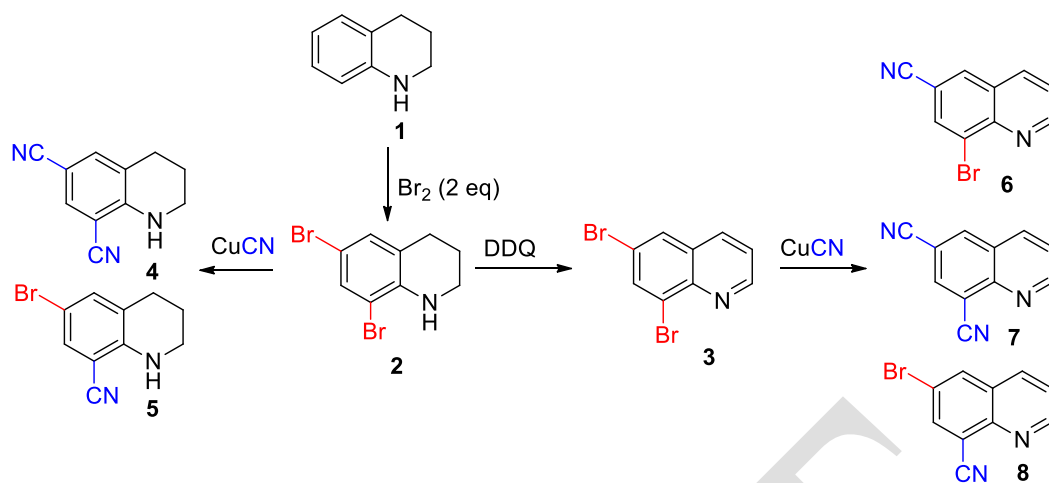
### Antibakteriyel Mikrodilüsyon (MIC) Protokolü

Bazı insan bakteri suşlarına karşı siyanokinolin türevlerinin minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) değerleri, bir mikro-çukurlu seyreltme yöntemi yardımı ile incelenmiştir. Bu yöntemle göre, 12 saatlik LB et suyu kültürleri kullanılarak bakteri aşuları elde edildi. 600 nm'de (OD600) optik yoğunluk 0.08-0.1'e ayarlandı ve 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu elde edildi. Bütün siyano kinolin türevleri, dimetil sülfoksit (20 mg / mL) içinde çözüldü. Besin suyu içeren kaplanmamış mikroparka oyuklarında 7.81-1000 µg / mL arasında bir konsantrasyon gradyanı aralığı, bu bileşiklerin seri iki kat dilüsyonları kullanılarak yapılmıştır. Bu plaka bakteriler ile aşılandı ve 35 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, mikroorganizmaların büyümesi görsel olarak belirlendi ve görünür bir büyümenin MIC olarak kabul edilmediği nokta belirlendi.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Siyanokinolinlerin Sentezi

Daha önceki yayınlarımızda (Ökten ve ark., 2013; Ökten ve ark., 2015), 6,8-dibromokinolin (3) ve 6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahidrokinolin'in (2) bakır destekli nitrilleme reaksiyonları incelendi (Şema 1). 6,8-dibromokinolin ile yapılan reaksiyon 6,8-disiyanokinolin (7) ve iki adet mono siyano izomerleri (6, 8) netice verirken, 6,8-dibromo-1,2,3,4-tetrahidrokinolin (2) ise daha seçici olarak 6,8-disiyano-1,2,3,4-tetrahidrokinolin (4) ve 6-bromo-8-siyano-1,2,3,4-tetrahidrokinolin (5) yüksek verimlerde verdi.



Şema 2. Siyano kinolinlerin Sentezi

### Antiproliferatif Aktivite Testleri

Siyanokinolin türevlerinin hücre proliferasyonuna olan etkileri (NCI-60 tarama metodolojisi) ve IC<sub>50</sub> değerlerini ölçmek amacıyla MTT testi yapıldı. Moleküllerin sahip olduğu IC<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde, **6** ve **8** nolu moleküller A549 hücre hattında güçlü antikanser özellik göstermişlerdir (sırasıyla IC<sub>50</sub> 28,3 ve 10,4 µg/mL) (Tablo 1). Bu moleküllerin kontrol bileşiklerine (Cisplatin ve 5-Florourasil) göre daha iyi etki göstermişlerdir (Tablo 1). Bu sonuçlar moleküllerin seçici şekilde kanser hücreleri üzerinde daha çok etkili olduğunu göstermektedir.

**Tablo 1.** Siyano kinolinlerin A549 kanser hücre hatlarına karşı IC<sub>50</sub> değerleri

Bileşikler	A549
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<b>2</b>	206,3
<b>3</b>	>1000
<b>4</b>	>1000
<b>5</b>	>1000
<b>6</b>	<b>28,3</b>
<b>7</b>	>1000
<b>8</b>	<b>10,4</b>
<b>Cisplatin</b>	60,49
<b>5-FU</b>	69,79

### Antibakteriyel Aktivite Testleri

Yeni sentezlenen moleküllerin antimikrobiyal etkileri MIC yöntemiyle çalışıldı. Test moleküllerimizden en çok 250 µg/mL ve bunun altında MIC değerlerine sahip olanlar antibakteriyel etkili olarak değerlendirilmiştir. Siyanokinolinlerin Gram(+) bakteriler üzerinde sergiledikleri MIC değerlerine bakıldığında, **8** nolu bileşiğinin *S. aureus* ATCC46300 suşuna (MIC değeri 125µg/mL) karşı pozitif kontrol olarak kullanılan SCF antibiyotikinden daha fazla ya da benzer duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Test moleküllerimiz çalışılan Gram(-) bakterilere karşı yeterince antimikrobiyal aktivite gösterememiştir.

**Tablo 2.** Siyano kinolinlerin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı Minimum-inhibitör konsantrasyonları (MIC, µg/mL) değerleri

Bileşikler	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> ATCC46300	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
4	1000	>1000	500	1000	>1000
5	1000	500	1000	1000	1000
6	1000	500	500	500	500
7	1000	>1000	500	1000	>1000
8	1000	>1000	125	1000	>1000
SCF	62.5	250	250	15.62	250

SCF. sulbactam (30 µg) + cefoperazone (75 µg), (pozitif kontrol)

## SONUÇ

Önceki çalışmalarımızda (Ökten ve Çakmak, 2015) brominasyon ile fonksiyonize edilip CuCN muamelesi sonucu beş farklı nitrillenmiş kinolin türevi elde edilmiştir. Nitrilli kinolin bileşiklerinden A549 kanser hücre hattına karşı yüksek antiproliferatif aktivite ve *S. Aureus* (ATCC46300) suşuna karşı anti bakteriyel özellik gösteren 8 nolu bileşiktir. Bu sonuç, 8 nolu yeni A549 antikanser ajanı ve antibakteriyel ajan adayını olduğuna delildir.

## KAYNAKLAR

- Berger D, Dutia M, Powell D, Wu B, Wissner A, Boschelli DH, Floyd MB, Zhang N, Torres N, Levin J, Du X, Wojciehowicz D, Discafani C, Kohler C, Kim SC, Feldberg LR, Collins K, Mallon R 2003. Synthesis and evaluation of 4-Anilino-6,7-dialkoxy-3-quinolinecarbonitriles as inhibitors of kinases of the Ras-MAPK signaling cascade. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13: 3031-3034.
- Charpentier, P.; Lobregat, V.; Levacher, V.; Dupas, G.; Queguiner, G.; Bourguignon, J. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 4013-4016.
- Çelik İ, Akkurt M, Ökten S, Çakmak O, Garcia-Granda S 2010. 6,8-dibromoquinoline. *Act Crys. Sec. E*, E66:03133.
- Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. *J. Med Chem.* 2010, 53, 7902.
- Jones, G.; *Chem. Heterocycl. Compd.*, Taylor, E. C., Ed.; John Willey and Sons: London, 1977; Vol. 32, pp 93-380.
- Martine, S.; Evelyne, K.; Macher, J.-P.; Jean-Jacques, B.; Abarghaz, M.; Wagner, P.; Ronsin, G. US Patent 183909, A1, 2006.
- Muscia GC, Bollini M, Carnevale JP, Bruno AM, Asis SE 2006. Microwave-assisted Friedländer synthesis of quinolines derivatives as potential antiparasitic agents. *Tetrahedron Lett.*, 47:8811-8815.
- Ökten S, Çakmak O, Erenler R, Tekin Ş, Yüce Ö 2013. Simple and Convenient Preparation of Novel 6,8-disubstituted Quinoline Derivatives and Their Promising Anticancer Activities. *Turkish Journal of Chemistry*, 37: 896-908.
- Ökten S, Eyigün D, Çakmak O, 2015. Synthesis of Brominated Quinolines. *Sigma J. Eng. Nat. Sci.*, 33: 8-15.
- Ökten S, Çakmak O 2015. Synthesis of Novel Cyano Quinoline Derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 56: 5337-5340.
- Pauvert, M.; Collet, S. C.; Bertrand, A. M. J.; Guingant, A. Y.; Evain, M. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 2983.
- Srivastava SK, Chauhan PMS, Bhaduri AP, Fatima N, Chatterjee R 2000. Quinolones: Novel Probes in Antifilarial Chemotherapy. *J. Med. Chem.*, 43:2275-2279.
- Solomon VR, Lee H 2009. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.*, 625:220-233.

24. Zhang N, Wu B, Powell D, Wissner A, Floyd MB, Kovacs ED, Toral-Barza L, Kohler C 2000. Synthesis and Structure–Activity Relationships of 3-Cyano-4-(phenoxyanilino)quinolines as MEK (MAPKK) Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10:2825-2828.

DRAFT

## Determination of antioxidant enzyme activity changes in soybean plant under drought stress

Ebru Derelli Tüfekçi

Cankiri Karatekin University, Yapraklı Vocational School, Department of Field Crops, Cankiri, Turkey

Corresponding author e-mail: [ebru.derelli@gmail.com](mailto:ebru.derelli@gmail.com)

### Abstract

Soybean is one of the 5-6 important plants that feed the world in terms of fat and protein content. Drought negatively affects vegetative and reproductive plant development causing severe reductions in plant productivity. Additionally, it can cause a series of physiological and biochemical changes in plants. To cope with the challenging aspects of drought, plants use several mechanisms and produce response at physiological and molecular levels. Plants to reduce or prevent damage caused by reactive oxygen species; non-enzymatic such as flavonoid, carenoid, tocopherol, glutathione and ascorbate and enzymatic compounds such as superoxide dismutase, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase and polyphenol oxidase consisting of antioxidant defense system. In this study, to determine the amount of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation and the changes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) from antioxidant enzymes caused by drought stress in different soybean varieties in control and stress groups. Antioxidant enzyme activities (excluding catalase) and antioxidant concentrations increased in plants under drought stress.

**Keywords:** Soybean, drought, antioxidant system

### 1. INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* L.) belongs to a Leguminosae family that grown for obtaining edible oil and forage. Seeds of soybean have a high content of proteins (40%), lipids (20%) and carbohydrates (Popović et al., 2015). It has been a good source of protein for human and animals feeding (Liu, 1997). Soybean different industries in addition to providing raw materials for human and animal nutrition in different ways plays an important role. Soybean and soybean oil is recommended for people with diseases such as sugar, coronary heart and arteriosclerosis they contain fatty acids that are beneficial to humans. It also helps reduce the amount of cholesterol in the blood (Hill et al., 2006). Soybean oil contains Ca, Fe and Zn elements and vitamins B and E. Because soybean protein contains valuable amino acids, nutritional value is also high. The remaining pulp after removal of the oil from the seeds is very valuable in terms of animal feed and feed rations (Yılmaz et al., 2005).

Drought is a meteorological phenomenon in general terms. It is a rainy period which lasts long enough to cause a significant decrease in its development. Drought negatively affects vegetative and reproductive plant development causing severe reductions in plant productivity. Additionally, it can cause a series of physiological and biochemical changes in plants (Wu et al., 2014; Li et al., 2015; Zhang, 2015). To cope with the challenging aspects of drought, plants use several mechanisms and produce response at physiological and molecular levels (Shiriga et al., 2014).

In the organism, free radicals occur as a by-product of normal metabolic activities, as well as by the effects of biotic and abiotic stress factors. Oxygen-derived free radicals as metabolic by-products; superoxide anion ( $O_2^-$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radicals ( $OH^-$ ) (Gong et al., 2005; Wei and Pang, 2005). Free oxygen radicals, superoxide anions, singlet oxygen, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, are formed during many stress factors in biological systems and damage the membrane structure, as well as many macromolecules such as photosynthetic pigment, protein, lipid, carbohydrate and DNA (Sairam and Srivastava, 2002). Plants to reduce or prevent damage caused by reactive oxygen species; non-enzymatic such as flavonoid, carenoid, tocopherol, glutathione and ascorbate and enzymatic compounds such as superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT), peroxidase (PO), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and polyphenol oxidase (PPO) consisting of antioxidant defense system. This system is present in all plant cells (Dolatabadian et al., 2008).

The aim of this study, to determine the amount of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation and the changes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) from antioxidant enzymes caused by drought stress in different soybean varieties in control and stress groups.

## 2. MATERIALS and METHODS

### 2.1 Plant materials, growth, and stress conditions

For cultivation of seeds of five different types of soybean (Arisoy, Atakişi, Türksoy, Atem-7 and Atlas-3616), 14x13 cm sized pots were washed and sterilized. The seeds of the genotypes were treated with 5% sodium hypochlorite for 10 minutes and then sterilized with deionized water (dI-H<sub>2</sub>O) 3 times. The seeds of the varieties were planted in 3-wheeled plastic pots of 30x50 diameter containing 1 kg of soil. After all, germinating seeds were irrigated at the field capacity of the field until the period of 6-7 leaves. For the group to be subjected to drought stress treatment, irrigation was discontinued. The irrigation group continued to be irrigated for 2 weeks at the field capacity until the control group showed the symptoms of stress. In order to determine the antioxidant activity, leaf samples were taken and stored in appropriate conditions.

### 2.2 Determination of antioxidant activity

Lipid peroxidation in plants is expressed as malondialdehyde (MDA) content. After homogenization of 0.5 g leaf sample with 10 ml 0.1% trichloroacetic acid (TCA), the homogenate was centrifuged at 15000 rpm for 5 minutes. 1 ml of the cleared sample (supernatant) was collected and 0.5% thiobarbituric acid (TBA) dissolved in 4 ml of 20% TCA was added. After the mixture is cooled in ice bath for 10 minutes at 95°C and then centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes, absorbance at 532 and 600 nm wavelength was determined in clear section (supernatant) and malondialdehyde (MDA) content calculated (Jebara et al., 2005).

For the determination of superoxide dismutase (SOD) activity, 1 g leaf tissue was homogenized with 5 mL phosphate buffer. Buffer contains 0.1 mM EDTA and 100 mg PVP. The pure extract was centrifuged at +4°C, 5 min, 16000 g and the supernatant was used for measurements. The reaction was started by adding 2.4 mL of phosphate buffer, 1 mL of sodium carbonate, 200 µL of L-Methionine, 200 TL of nitro blue tetrazolium (NBT), 150 µL of enzyme and 150 µL of riboflavin. Samples were kept at 25°C for 10 min. Specific enzyme activity was determined as U/mg protein. One unit SOD activity was measured at 560 nm in spectrophotometer determined.

For catalase (CAT) activity, 1 g of leaf tissue was homogenized by adding 5 mg potassium phosphate buffer (pH: 7 and 0.1 mM EDTA) to 100 mg PVP. The reaction was started by mixing 2.8 mL of potassium phosphate buffer (not containing pH:7 EDTA), 80 µL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5M) and 120 µL of enzyme extract. Catalase activity was determined by decreasing the absorbance in 30 sn at 240 nm and the results were calculated as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein.

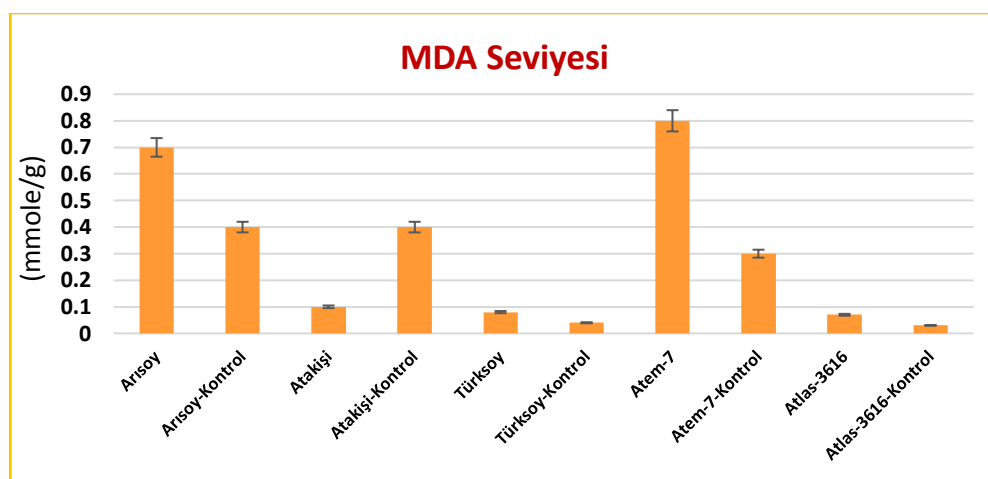
For ascorbate peroxidase activity, 150 mg of leaf tissue was homogenized in 1.5 mL of extraction medium containing 200 mM (pH:7.8) HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 4 mM sodium ascorbate. The pure extract was centrifuged at 4°C, 5 min, 16000 g and the supernatant was used for measurements. Reaction mixture 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH:7), 500 mM ascorbate, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and extract. Reduction in absorbance at 290 nm; oxidized ascorbate was measured.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

The plants have developed various adaptation mechanisms to negatively affect growth and development, tolerate many abiotic stress factors and reduce adverse effects on plant quality and quantity. It is known that oxidative stress increases with drought stress in plants. At the cellular level, it was determined that a decrease in hydration and the increase in reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical could damage the membranes and proteins. Plants have antioxidant systems that protect their cells from oxidative damage (Bano et al., 2012; Simaei et al., 2012).

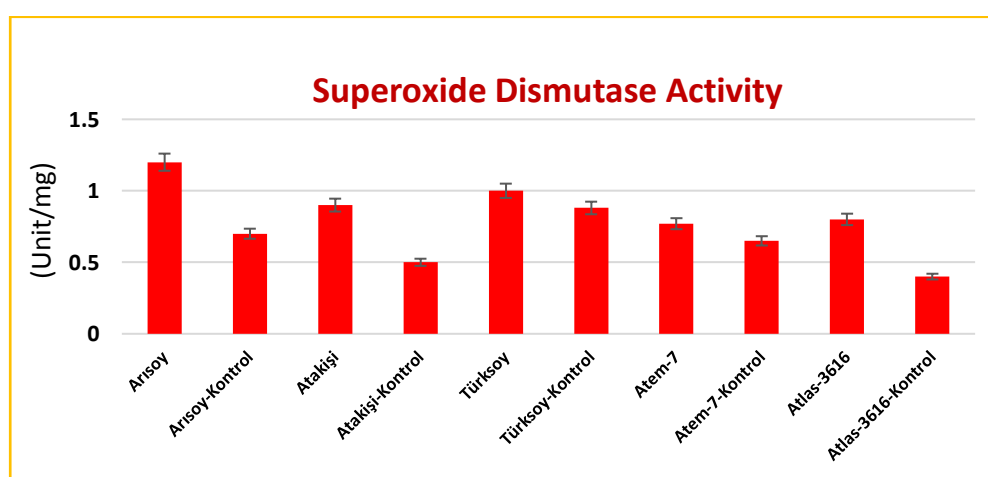
The control group and the soybean genotypes in which drought stresses are applied have been found to be quite different. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (KAT), axorbate peroxidase (APX) enzyme activities, such as soybean varieties (Arisoy, Atakişi, Türksoy, Atem-7, Atlas-3616) in the study examined the effects of different drought stress. In all soybean varieties, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation due to drought stress and an increase in lipid peroxidation were observed (Figure 1). MDA level was determined as an indirect indicator of lipid peroxidation in control and stress applications. Many studies have shown lipid peroxidation in stress conditions. It has been shown that the level of MDA due to salt

concentration increases with sugar beet (Bor et al., 2003). In the study with bean plant, drought stress increased in MDA level compared to control (Türkan et al., 2004). In the study conducted under salt stress in susceptible and resistant rice varieties, it was determined that MDA level was increased in sensitive culture compared to control and not in resistant culture (Demiral and Türkan, 2004).



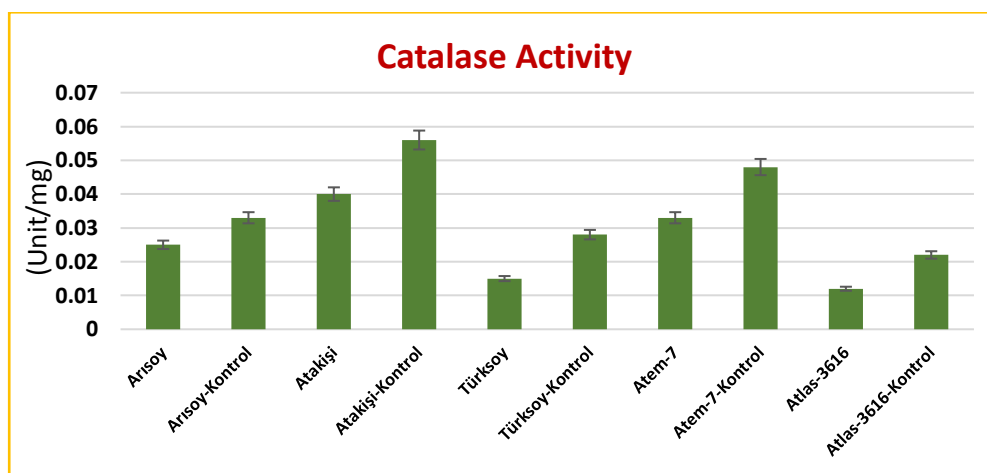
**Figure 1.** Changes in MDA content (micromole/gram) of soybean genotypes

Superoxide dismutase (SOD) which is an antioxidant system element constitutes the first step of defense against ROS in the cell. Drought of the amount of reactive oxygen species conditions are known to increase (Reddy et al., 2004). In this present study, while the SOD activity remained the same in Türksöy and Atem-7 varieties exposed to drought stress, there was a significant increase in Arsoy, Atakişi and Atlas-3616 varieties compared to the control group (Figure 2). Ghorbanli et al. (2004), examined the response of two chickpea cultures to drought stress, which had different tolerances to drought, and found that the culture, which was more resistant to drought, had higher SOD activity. Fazeli et al. (2007), found that in two sesame plants with different drought sensitivity, drought increased SOD activity in both cultures and SOD activity was higher in the culture which was more resistant to drought.



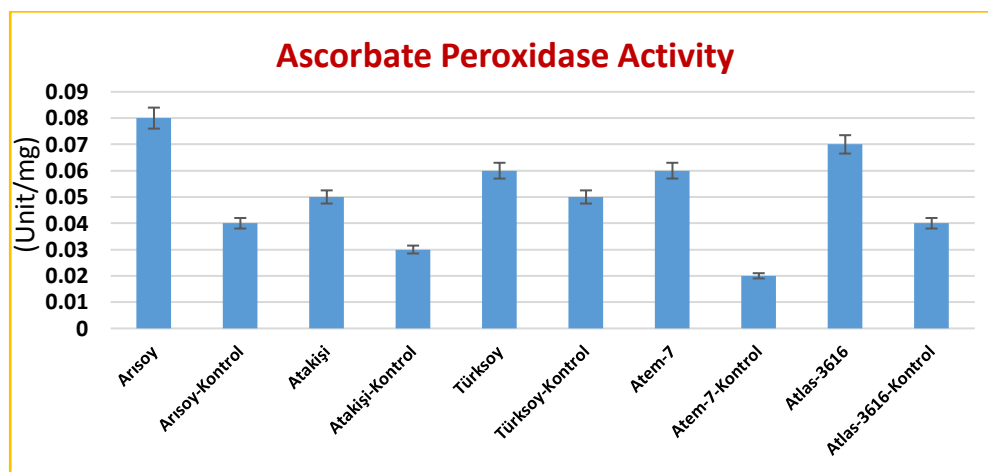
**Figure 2.** Changes in SOD (Unit/mg) activity level of soybean genotypes

Catalase catalyzes the conversion of hydrogen peroxide to water and oxygen. In our study, drought stress decreased the activity of KAT in five different soybean varieties (Figure 3). Eyidogan and Öz (2007), chickpea plants respond to salt stress found that drought stress lowered KAT activity. These results are similar to our findings. This decrease in catalase activity may indicate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed during oxidative stress cannot be completely eliminated by this enzyme or that the catalase is less effective in the antioxidant defense system.



**Figure 3.** Changes in KAT (Unit/mg) activity level of soybean genotypes

Ascorbate peroxidase is the main scavenger of hydrogen peroxide in plant cells and converts  $H_2O_2$  into water, using as its substrate. Increased activity of APX in various environmental stresses has been reported (Zhang et al., 1995). Our study, five soybean varieties exposed to drought significantly increased APX activity compared to control groups (Figure 4). Sairam et al.(1998), found that drought stress increased APX activity in wheat varieties. In plants resistant to drought APX activity was found to be higher than those sensitive. Zhang and Kirkham (1995), resistant to water stress resistant rice genotype, compared with sensitive ones found that ascorbate peroxidase activity was higher in the resistants. Zabalza et al. (2008), found that drought stress in pea plants increased APX activity.



As a result, it was found that drought stress increases antioxidant levels and antioxidant enzyme activities in soybean varieties. Plant with degradation of ecological balance and environmental problems arise. This situation; it requires that the molecular basis, resistance mechanisms and changes in metabolism of stress factors should be examined. Water resources in the world are decreasing day by day. In the future water may not be used for irrigation of agricultural land. Therefore, it is of great importance to select the plants that use the least amount of water in the cultivated plants and which are resistant to environmental conditions.

## REFERENCES

- Bano A, Ullah F, Nosheen A 2012. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. *Plant Soil Environ*, 58(4): 181-185.
- Bor M, Özdemir F, Türkan I 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris L.* And wild beet *Beta maritima L.* *Plant Sci*, 164: 77-84.



- Demiral T, Türkan İ 2004. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Env and Exp. Botany*, 53(3): 247-257.
- Dolatabadian A, Sanavy ASMM, Chasmi NA 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (Vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 206-213.
- Eyidogan F, Öz MT 2007. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiol Plant*, 29: 85-493.
- Fazeli F, Ghorbanlı M, Niknam V 2007. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum*, 51:98-103.
- Ghorbanli M, Ebrahimzadeh H, Sharifi M 2004. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. *Biol. Plant*, 48: 575-581.
- Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S, Zhang C 2005. Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in pots under drought. *Plant Science*, 169: 313-321.
- Hill J, Nelson E, Tilman D, Polasky S, Tiffany D 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 11206-11210.
- Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani ME 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(8): 929-936.
- Li C, Ng CKY, Fan L-M 2015. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ Exp Bot*, 114:80-91.
- Liu, KS 1997 Soybean chemistry technology and utilization. Chapman and Hall, New York. ISBN. 0-412-08121-0.
- Popović V, Miladinović J, Vidić M, Vučković S, Dolijanović Ž, Ikanović J, Živanovic L, Kolarić L 2015. Drought Limiting factors in soybean production. The effect of irrigation on yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Journal of Institute of PKB Agroekonomik*, 21: 11-21.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161:1189-1202.
- Sairam RK, Deshmukh PS, Saxena DC 1998. Role of antioxidant system in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biologia Plantarum*, 41:387-394.
- Sairam RK, Srivastava GC 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162: 897-904.
- Shiriga K, Sharma R, Kumar K, Yadav SK, Hossain F, Thirunavukkarasu N 2014. Genome-wide identification and expression pattern of drought-responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene*, 2:407-417.
- Simaei MR, Khavari-Nejad A, Bernard F 2013. Exogenous Application of Salicylic Acid and Nitric Oxide on the Ionic Contents and Enzymatic Activities in NaCl-Stressed Soybean Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 3:1495-1503.
- Türkan İ, Bor M, Özdemir F, Koca H 2004. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* gray and drought sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1): 223-231.
- Wei YH, Pang CY 2005. The Role of Mitochondria in human aging process. *Biotech International*, 17: 8-13.
- Wu S, Hu C, Tan Q, Nie Z, Sun X 2014. Effects of molybdenum on water utilization, antioxidative defense system and osmotic adjustment ability in winter wheat (*Triticum aestivum*) under drought stress. *Plant Physiol Biochem: Soc Fr Physiol Veg*, 83: 365-374.
- Yılmaz A, Beyyavaş V, Cevheri İ, Haliloğlu H 2005. Harran ovası ekolojisinde ikinci ürün olarak yetiştirilebilecek bazı soya (*Glycine max* L. Merrill.) çeşit ve genotiplerinin belirlenmesi. *Harran Üniv. ZF Dergisi*, 9(2): 55-61.
- Zabalza A, Galvez L, Marino D, Royuela M, Arrese-Igor C, Gonzalez EM 2008. The application of ascorbate or its immediate precursor, galactono-1,4-lactone, does not affect the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress. *Journal of Plant Physiology*, 165:805-812.
- Zhang JX, Kirkham MB 1995. Water relations of water-stressed, split-root C4 (*Sorghum bicolor*; Poaceae) and C3 (*Helianthus annuus*; Asteraceae) plants. *American Journal of Botany*, 82:1220-1229.
- Zhang B 2015. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot*, 66:1749-1761.

## Sazan balığı yavrularında (*Cyprinus carpio*) farklı yemleme sıklığının büyüme performansı ve bazı biyometrik ölçümlere etkisi

Ebru Yılmaz<sup>1</sup>, Deniz Çoban<sup>1</sup>, Murat Er<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ebruyilmaz@adu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada sazan balığı yavrularının (*Cyprinus carpio*) büyüme performansı, yem değerlendirme ve bazı biyometrik ölçümleri üzerinde yemleme sıklığının (günde 2, 3 ve 4 öğün) etkisi araştırılmıştır. Çalışma, her grup için 3 tekrarlı olacak şekilde 9,39±0,53 g yavru sazan balıkları ile 1000 L polyester tanklarda tank başı 40 birey olacak şekilde 60 gün boyunca sürdürülmüştür. Çalışmada, % 53 ham protein ve %15 ham yağ içeren ticari bir yem kullanılmıştır. Deneme sonunda, son ağırlık, canlı ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı (SBO), yem dönüşüm oranı (YDO) ve biyometrik indeksler bakımından gruplar arasında önemli fark bulunmuştur (P<0.05). Deneme sonunda, yemleme sıklığının kondisyon faktörüne etki etmediği gözlenmiştir (P>0.05). Sonuç olarak, büyüme oranı üzerinde yemleme sıklığının yavru balıklarda önemli bir etkisinin olduğu söylenebilir. Bu çalışmanın Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar Numarası 2018/134) tarafından onaylanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sazan balığı, yemleme sıklığı, büyüme performansı, biyometrik indeks

### The effect of different feeding frequency on growth performance and some biometric indexes in fry carp (*Cyprinus carpio*)

#### Abstract

In this study, the effect of feeding frequency (2, 3 and 4 times per day) on growth performance and some biometric measurements was investigated. The study was conducted with fry carp with an average weight of 9.39±0.53 g during 60 days in 1000 L polyester tanks; three repeats were formed for each group with 40 individuals per tank. In the study, a commercial feed containing 53% crude protein and 15% crude oil was used. At the end of the experiment, significant differences were found between groups in terms of the final body weight, live weight gain, specific growth rate (SGR), feed conversion rate (FCR) and biometric indexes (P<0.05). At the end of the experiment, it was observed that the feeding frequency did not affect the condition factor (P>0.05). As a result, the feeding frequency can be said to have a significant impact on growth rate of fry carp. Fish experiments were performed in accordance to the guidelines for fish research from the animal ethic committees at Aydın Adnan Menderes University (Protocol Number:2018/134).

**Keywords:** Fry carp, Feeding frequency, Growth performance, Biometric indexes

### GİRİŞ

Besleme sıklığı ile ilgili yapılan çoğu araştırma, balık yetiştiriciliğinde uygun (optimal) bir besleme sıklığı olması gerektiğini doğrular niteliktedir. En uygun yemleme sıklığı; balığın büyüklüklerine, türlerine ve yetiştiricilik sistemlerine göre değişir (Cho ve ark., 2003). Genç bireylerde, artan yemleme sıklığının yüksek bir büyüme ve yaşama oranı sağladığı tespit edilmiştir (Murai ve Andrews, 1976; Hancz, 1982; Folkvord ve Ottera, 1993). Bununla birlikte, aşırı yemleme sadece yem dönüşüm oranını (FCR) düşürmekle kalmaz, aynı zamanda maliyetleri de artırır, ayrıca su kalitesini olumsuz yönde etkileyen atıklarında birikmesine neden olur (Biswas ve ark., 2006).

Yemleme sıklığı çalışmalarının çoğu, büyüme oranları ve yem dönüşüm etkinliği (FCR) üzerinde durur (Sultana ve ark., 2001; Ding ve ark., 2017; Due ve ark., 2006)

Ekonomik öneme sahip aynalı sazan veya kültür sazanı (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758); soğuğa dayanıklı, kültür koşullarına adapte yeteneği yüksek, doğal sazana göre daha hızlı gelişen bir tür olması nedeni ile entansif yetiştiricilik için uygun bir türdür (Çağiltay, 2011).

Bu çalışmanın hedefi, farklı yemleme sıklığının sazan balığı yavrularında (*Cyprinus carpio*) büyüme performansı ve bazı biyometrik ölçümlere etkisini belirlemektir.

## MATERYAL VE METOT

### Denemenin Yapıldığı Yer

Deneme, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği Araştırma ve Uygulama ünitesinde yürütülmüştür. Deneme öncesi sazan balıkları 15 günlük adaptasyon sonrasında gruplara ayrılmışlardır. Denemede 1000 litre (140\*140\*65 cm; ayak:35 cm, toplam yükseklik: 100 cm) su kapasiteli 9 adet polyester tank kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Deneme sistemi

### Deneme Balıkları

Çalışmada, İzmir’de bulunan özel bir işletmeden sağlanan daha önce hastalık geçirmemiş, aşılanmamış ve herhangi bir hastalığa maruz kalmamış olan 360 adet yavru (ort. ağırlıkları  $9,39 \pm 0,53$  g) sazan balığı (*Cyprinus carpio*) kullanılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Denemede kullanılan sazan balığı (Orjinal).

### Deneme Yemleri

Denemede, % 53 ham protein ve %15 ham yağ içeren 1mm’lik ticari alabalık yemi kullanılmıştır. Kullanılan ticari yemin besin madde içeriği Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo1. Deneme yeminin besin madde içeriği (1mm ticari pelet yem)**

Yemin Kimyasal Kompozisyonu	%
Ham Protein (%)	53
Ham Yağ (%)	15
Ham Selüloz (%)	0.9
Ham Kül (%)	11
Kalsiyum	2.6
Fosfor	1.7
Sodyum	0.4

Balık yeminde kullanılan hammaddeler; balık unu, soya unu, balık yağı, buğday ve yan ürünler, mineraller ve vitaminlerdir.

## Yöntem

### Denemenin Yürütülmesi

Bu çalışmada kullanılan balıklar deneme ortamına adapte olması amacıyla 15 gün süreyle ticari yemle beslenmiştir. Her deneme grubu 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. 60 gün süren denemede, balıklar vücut ağırlığının %2'si oranında günde 2, 3 ve 4 kez elle yemlenmiştir. Deneme başında ve sonunda balıkların ağırlıkları ve boyları ölçülmüş ve balıkların biyometrik ölçümleri yapılmıştır. Denemede, balıkların ağırlık ölçümlerinde, 0,001 g hassasiyetli dijital terazi, toplam boy ölçümlerinde ise 1 mm bölmeli ölçüm cetveli kullanılmıştır.

### Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Analizleri

Denemede pH ve oksijen analizleri için WTW multi 34 marka prop kullanılmıştır. Suyun sıcaklığı ise termometre ile ölçülmüştür.

### Büyüme Performansı ve Biyometrik Analizler

Canlı Ağırlık Artışı (g)

CAA= Son balık ağırlığı (g) - Başlangıç balık ağırlığı (g)

Yem Dönüşüm Oranı

YDO= Yem Tüketimi (g)/Ağırlık artışı (g)

Spesifik Büyüme Oranı (%)

SBO= [Ln (Son ortalama balık ağırlık (g)) - Ln (Başlangıç ortalama balık ağırlığı (g))] / Deneme gün sayısı x 100

Kondisyon Faktörü

$K = W/L^3 \cdot 100$

K: Kondüsyon Faktörü

W: vücut ağırlığı (g)

L: Total boy (cm)

Visserosomatik İndeks (%)

$VSI = \frac{\text{İç organ ağırlığı (g)}}{\text{Balık ağırlığı (g)}} \times 100$

Hepatosomatik İndeks (%)

$HSI = \frac{\text{Karaciğer ağırlığı (g)}}{\text{Balık ağırlığı (g)}} \times 100$

### İstatistiksel Değerlendirme

Denemede elde edilen verilerin analizleri SPSS 17 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve Tukey çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuşlardır. Gruplar arası farklılıklar  $p < 0,05$  olarak değerlendirilmiştir (Logan, 2010).

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları

Deneme süresince suyun sıcaklığı ortalama  $19,6 \pm 0,82$  °C, oksijeni  $8,44 \pm 0,18$  mg/l ve pH  $7,046 \pm 0,04$  olarak tespit edilmiştir.

### Büyüme Performansı ve Biyometrik Analizler

Deneme sonunda balıkların ortalama başlangıç ağırlığı (OBA), ortalama son ağırlığı (OSA), canlı ağırlık artışı (CAA), kondüsyon faktör bulguları (KF), yem dönüşüm oranı (YDO), spesifik büyüme oranı (SBO) sonuçları Tablo 2’de verilmiştir. Grup I, günde 2 kere yemlenen grup, Grup II günde 3 kere yemlenen grup, Grup III günde 4 kere yemlenen grubu belirtmektedir.

Tablo 2. Denemede elde edilen büyüme ve biyometrik analiz sonuçları

	Grup I	Grup II	Grup III
OBA (g)	$9.47 \pm 0.05^a$	$9.32 \pm 0.14^a$	$9.37 \pm 0.08^a$
OSA (g)	$14.11 \pm 0.07^c$	$15.20 \pm 0.20^b$	$16.19 \pm 0.13^a$
CAA (g)	$4.63 \pm 0.05^c$	$5.88 \pm 0.14^b$	$6.81 \pm 0.20^a$
KF	$1.97 \pm 0.05^a$	$1.94 \pm 0.03^a$	$1.90 \pm 0.02^a$
YDO	$1.28 \pm 0.00^a$	$1.21 \pm 0.01^b$	$1.12 \pm 0.00^c$
SBO	$0.23 \pm 0.00^c$	$0.29 \pm 0.00^b$	$0.32 \pm 0.00^a$
HSI	$0.94 \pm 0.03^b$	$1.10 \pm 0.13^b$	$1.74 \pm 0.35^a$
VSI	$9.70 \pm 1.32^b$	$10.81 \pm 0.29^{ab}$	$12.33 \pm 1.16^a$

$n=3$ , ortalama $\pm$ s. hata. Aynı sütunda farklı üstel harflerle ifade edilen miktarlar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir ( $P < 0,05$ ).

Deneme başında gruplarda balıkların ortalama başlangıç ağırlıkları benzer olup bir farklılık yoktur ( $p > 0,05$ ). Deneme sonunda III grubunun diğer gruplardan daha fazla ağırlık artışı sağladığı görülmüştür. Ayrıca balıkların deneme başı ve sonundaki kondüsyon faktörleri arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ). Deneme sonunda grup III’ün YDO miktarı diğer gruplardan istatistiksel olarak düşük, SBO miktarı diğer

gruplardan istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu çalışmada elde edilen bulgulara yakın olarak 1,2,3 ve 6 öğün beslenen yavru Nil tilapularında, öğün artışı ile beraber SBO 'nın arttığı bildirilmiştir (Kaya ve Güven, 2015). Farklı bir çalışmada, vücut ağırlığının %5'si oranında günde 1, 2, 3 ve 4 kez yemlenen sazan balığı yavrularında, en düşük YDO oranının günde 2 kere beslenen, en yüksek YDO oranının da günde 4 kere beslenen yavrularda gözlemlendiği tespit edilmiştir (Kiaalvandi ve ark, 2011). Başka bir çalışmada Sultana ve ark. (2001),  $6,87 \pm 0,31$ g'lık *Cyprinus carpio* yavrularını günde 2, 3, 4, 5 ve 6 defa canlı ağırlığın %5'i oranında, %33,34 ham protein ve %11,53 yağ içerikli yemle, 45 gün süre ile beslediklerinde, SBO oranının günde 4 defa beslenen grupta en yüksek, YDO oranının da günde 4 defa beslenen grupta en düşük olarak bulunduğunu bildirmektedirler. Araştırmalar arasındaki bu farklılıkların, balık türü, stoklama yoğunluğu, balık büyüklüğü, su parametreleri gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca biyometrik indekslere de bakılmıştır. Denemede, grup III 'de HSI ve VSI miktarlarının diğer gruplardan yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo, 2).

## SONUÇ

Sonuç olarak, günde 2, 3 ve 4 defa yemleme yapılan deneme grupları arasında kondüsyon faktörü bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılıklar bulunmadığından dolayı ( $p > 0,05$ ), bu çalışmaya benzer çalışmalar, ayrıca yem fiyatı ve işçilik maliyetinde göz önüne alındığında yemleme sıklığının günde 2 defa olarak uygulanmasının yeterli olacağı söylenebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar Numarası 2018/134) tarafından onaylanmıştır. Ayrıca araştırmaya katkılarından dolayı KILIÇ Holding ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi – TARBIYOMER'e teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

Biswas G, Jena JK, Singh SK, Patmajhi P, Muduli HK 2006. Effect of feeding frequency on growth, survival and feed utilization in mrigal, *Cirrhinus mrigala*, and rohu, *Labeo rohita*, during nursery rearing. *Aquaculture*, 254: 211–218.

Çağıltay F 2011. İç su Balıkları Yetiştiriciliği. İstanbul: Nobel Akademik Yayıncılık, 290 pp.

Cho SH, Lim YS, Lee JH, Park S 2003. Effect of feeding rate and feeding frequency on survival, growth and body composition of ayu post-larvae *Plecoglossus altivelis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 85-91.

Ding ZL, Kong YQ, Zhang YX, Li JF, Cao F, Zhou JB, Ye JY 2017. Effect of feeding frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *Fish and Shellfish Immunology*, 68: 428-434.

Du ZY, Liu YJ, Tian LX, He JG, Cao JM, Liang GY 2006. The influence of feeding rate on growth, feed efficiency and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture*, 14: 247-257.

Folkvord A, Ottera H 1993. Effects of initial size distribution, day length, and feeding frequency on growth, survival and cannibalism in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 114: 243-260.

Hancz C 1982. Preliminary investigations on the feeding frequency and growth of juvenile carp in aquaria. *Aquacultura Hung.* (Szarvas) 3: 33-35.

Kaya GK, Bilgüven M 2015. The Effects of Feeding Frequency on Growth Performance and Proximate Composition of Young Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 29(1):11-18.

Kiaalvandi S, Faramarzi M, Iranshahi F, Zabihi A, Roozbehfar R 2011. Influence of feeding frequency on growth factors and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*) fish, Global Veterinaria, 6(6): 514-518.

Logan M 2010. Biostatistical design and analysis using r: a practical guide. Wiley- Blackwell, London. 546 p.

Murai T, Andrews JW 1976. Effect of frequency of feeding on growth and food conversion of channel catfish fry. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 42: 159–161.

Sultana SM, Das M, Chakraborty SC 2001. Effect of feeding frequency on the growth of common carp (*Cyprinus carpio L.*) fry. Bangladesh Journal of Fisheries Research, 5(2) : 149-154.

DRAFT

## Stimuli-Responsive Polymer Particles for Drug Delivery

Zehra Özbaş<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çankiri Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Çankiri, Turkey.

\*e-mail: zehraozbas@karatekin.edu.tr

### Abstract

Stimuli-responsive microgel particles have gained potential use as drug delivery vehicles for biological applications. In this work, stimuli-responsive microgel particles, in the process of surfactant-free emulsion copolymerization of temperature-responsive N,N-diethylacrylamide and pH- and temperature-responsive 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate, have been prepared and characterized. The structural characterization of the obtained particles was evaluated by FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), particle size and zeta potential measurements were performed using dynamic light scattering, and the cytotoxicity was determined using a standard MTT (Methylthiazole diphenyl tetrazolium) assay. According to the assay results, the particles did not showed cytotoxic effect against L929 cell line. The microgel was loaded with 5-Fluorouracil, and pH-dependent release behavior of the drug from the microgels was investigated. The results indicated that the microgel particles have promising potential as an injectable drug carrier for pharmaceutical applications.

**Keywords:** N,N-diethylacrylamide, microgel, drug release, MTT assay.

### INTRODUCTION

Microgels are crosslinked polymer microparticles that range in size up to 1000 nm. Due to their size, microgels get attention as potential delivery systems for biological applications. Stimuli-responsive microgels are the most interesting class because of reversibility with external stimulus such as temperature, pH etc. Microgels can be prepared by four methods: emulsion polymerization, crosslinking of neighbouring polymer chains, anionic copolymerization, and inverse micro-emulsion polymerization. Emulsion polymerization can be done with or without a surfactant, and surfactant free emulsion polymerization can be called precipitation polymerization (Panayiotou et al., 2007). For this polymerization, the reaction temperature is adjusted above the lower critical solution temperature (LCST) of the thermosensitive monomer/monomers to form micro/nano particles (Özbaş et al., 2018).

In this study, thermoresponsive N,N-diethylacrylamide, DEAA and dual pH- and termoresponsive (2-Dimethylaminoethyl) methacrylate, DMAEMA were chosen for microgel synthesis by aqueous precipitation polymerization. The characterization of P(DEAA-co-DMAEMA) microgels was done by FTIR. The particle size, PDI in particle size, and zeta potential were determined. In addition, MTT assay was used to analyze the microgel's cytotoxicity. 5-Fluorouracil (5-Fu) was chosen as a model drug for drug loading and release studies.

### MATERIALS AND METHODS

The reaction was carried out in a three-necked glass reactor equipped with a reflux condenser, a mechanical stirrer, and nitrogen gas inlet system. The monomers (0.5 g of DEAA and 0.5 g of DMAEMA) and 0.05 g of the crosslinker, N,N-methylenebisacrylamide were dissolved in 50 mL of distilled water in the reactor. Nitrogen gas was purged into the monomer mixture for 30 min to remove oxygen. Then, the temperature was adjusted to 70°C, and 10 mg of the initiator, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride was added to initiate the reaction. The polymerization reaction was kept at a constant stirring rate of 500 rpm for 6 h. The microgel dispersion was dialyzed against distilled water at room temperature for 1 week to remove impurities, then subsequently lyophilized (Özbaş et al., 2018). The yield of the obtained white-colored powder was around 40 %.

### Characterization of the microgel

The synthesized P(DEAA-co-DMAEMA) microgel was characterized by attenuated total reflectance (ATR) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Bruker). The zeta-potential and size measurement of the microgel were performed using dynamic light scattering on a Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) at the end of the reaction. In vitro cell viability was tested by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric method (Özbaş et al., 2018).



### Drug loading by soaking procedure

Incorporation of 5-Fu into microparticles was performed as follows: 0.25 g of the microgel was immersed in 2.5 mL of 5-Fu solution (500 mg in 1000 mL in phosphate buffer) at 25°C for 48 h. Then, it was migrated into the dialysis tubing (MWCO 3500 Da) and dialyzed against deionized water to remove the free drug. Lastly, it was lyophilized. The loading capacity was the difference between the initial drug concentration and the drug concentration in the supernatant.

### Drug release and kinetic modelling

In vitro drug release experiments were realized by the dialysis method. In detail, the lyophilized 5-Fu loaded microgel was suspended in buffer solution (pH 7.4 and pH 6.5) at 37°C and transferred into the dialysis bags which were immersed in the drug release medium. At appropriate times, 3 mL of the release was collected and equal volume of fresh buffer solution was added to keep volume constant. The amount of the released 5-Fu was detected at 270 nm using UV-Vis spectrophotometry (Shimadzu UV-1800 model).

To understand the type of 5-Fu release kinetic from the microgel, various popular mathematical models were applied on the drug release data at pH 7.4. The zero- and first-order models used are shown in Eqs. 1 and 2, respectively.

$$q_t = q_0 + k_0 t \quad (1)$$

$$\ln q_t = \ln q_0 - k_1 t \quad (2)$$

where  $q_t$ : the quantity of the released drug in time  $t$ ,  $q_0$ : the initial quantity of the drug,  $k_0$ : the zero order constant,  $t$ : the release time,  $k_1$ : the first order constant. The rate constants and the correlation coefficients were obtained from the plots of  $q_t$  against  $t$ , and  $\ln(q_t)$  against  $t$  for zero- and first-order models, respectively.

Additionally, the drug release profiles were fitted to Higuchi and Korsmeyer–Peppas equations (3 and 4).

$$q_t = k_H \sqrt{t} \quad (3)$$

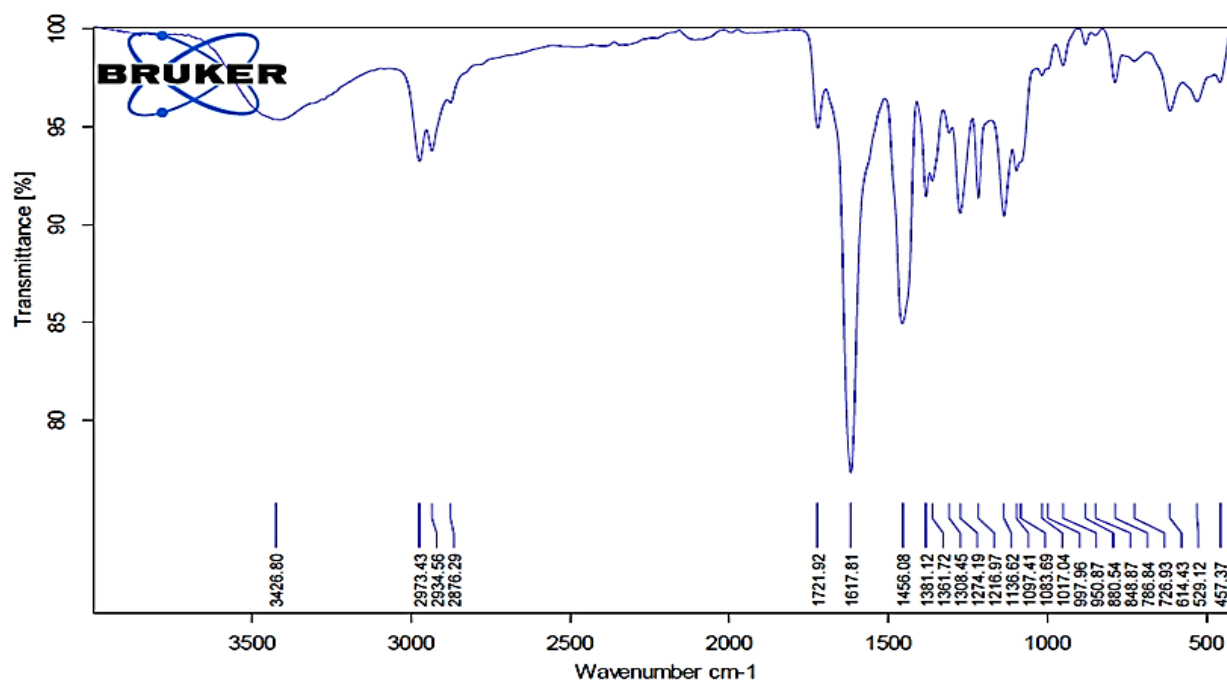
$$\frac{q_t}{q_\infty} = k_{KP} t^n \quad (4)$$

where  $k_H$ : Higuchi dissolution constant,  $q_t/q_\infty$ : the fractional drug release,  $k_{KP}$ : Korsmeyer–Peppas rate constant,  $n$ : release exponent which characterizes different release mechanisms. The rate constants and the correlation coefficients were obtained from the plots of  $q_t$  versus square root of time, and the  $\ln$  of the fractional drug release (<60%) versus  $\ln t$ , for Higuchi and Korsmeyer–Peppas models, respectively.

## RESULTS and DISCUSSION

### Characterization studies

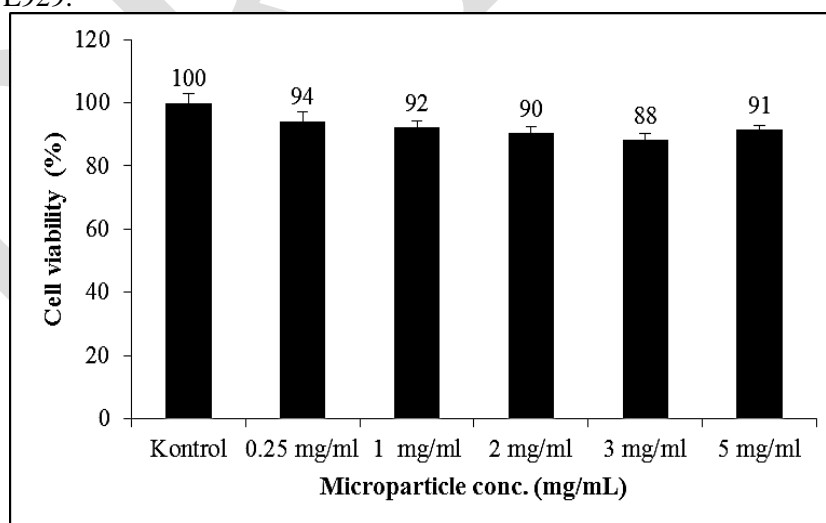
FTIR spectrum of the P(DEAA-co-DMAEMA) microgel was given in Figure 1. The characteristic peaks of DEAA can be seen at; 2973, 2935, 1456, 1381  $\text{cm}^{-1}$  (C–H stretching vibrations of  $-\text{CH}_3$  and  $-\text{CH}_2-$  groups), and 1618  $\text{cm}^{-1}$  (C=O stretching vibration). Additionally, the sharp peak at 1722  $\text{cm}^{-1}$  was assigned to the stretching of the  $-\text{COO}-$  bond of DMAEMA structure, and the presence of DMAEMA content in the microgel can be seen by the peak of 2875  $\text{cm}^{-1}$  which is the  $\text{CH}_3$  stretch vibration of  $\text{N}(\text{CH}_3)$  (Chen et al., 2011, Gao et al., 2012).



**Figure1.** FTIR spectrum of the microgel

The zeta potential and particle size of colloidal systems has a notable effect on the properties of drug delivery systems. The zeta potential is the potential difference between the dispersion medium and the stationary layer of fluid attached to the dispersed particle (Honary and Zahir, 2013). Colloidal systems are stable at zeta potential values less than -30 mV and higher than +30mV (Özkahraman et al., 2014). The zeta potential value of the obtained microgels was  $-34.76 \pm 1.27$  mV which is acceptable for a stable colloidal system. The average particle size and PDI (polydispersity index) in particle size were  $218 \pm 4.9$  nm and  $0.235 \pm 0.0069$ , respectively. The PDI value indicated a narrow particle size distribution.

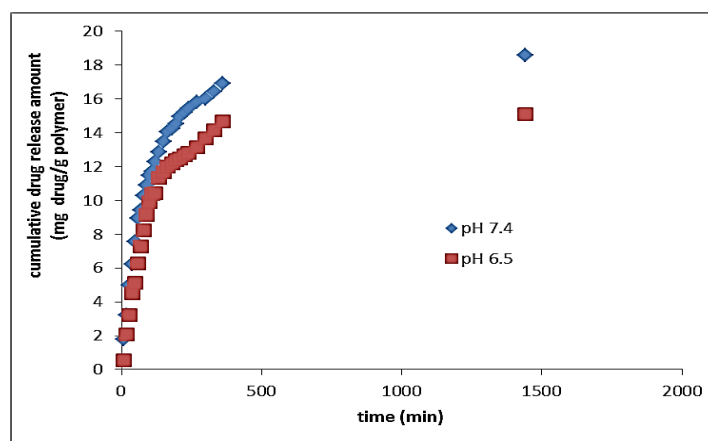
In vitro cytotoxicity testing of the microgel was done by MTT test at different concentration of the microgel. As seen in Figure 2, the increased microgel concentration up to 5 mg/mL did not reduce significantly the percentage of cell viability, in other words, the microgel did not exhibit apparent cytotoxicity to the mouse fibroblast cell line L929.



**Figure 2.** Cytotoxicity of the microgel formulation on L929 cell lines.

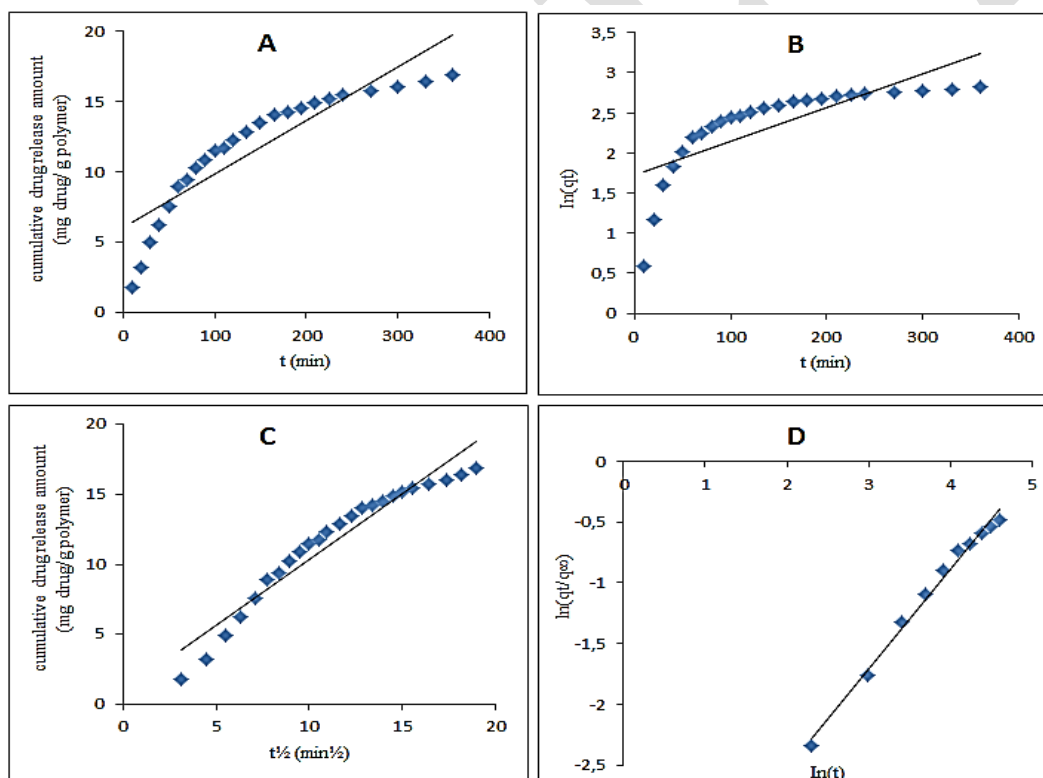
### Drug release studies

The drug loading capacity of the microgel was determined as described in the section “Drug loading by soaking procedure” and it was found to be 30.60 mg/g polymer. The effect of pH on drug release was studied at pH 7.4 and 6.5. The cumulative release amount of the drug was 18.60 and 15.10 mg/g polymer at pH 7.4 and 6.5, respectively (Figure 3). 5-Fu is an acidic drug and negatively charged under the alkaline medium, so the solubility of the drug is higher and releases faster (Özbaş et al., 2018).



**Figure 3.** Cumulative drug release amount at pH 7.4 and 6.5.

Four mathematical models were applied on the drug release data at pH 7.4 to understand the release mechanism as described in the section “Drug release and kinetic modelling”. The drug release profiles of the microgel were given in Figure 4. The kinetic parameters and the correlation coefficients were given in Table 1. The release data showed a good fit into Korsmeyer–Peppas model, and the release exponent ( $n = 0.82$ ) indicated the non-Fickian release which demonstrated that the drug release occurred both diffusion and swelling mechanisms.



**Figure 4.** The drug release profiles of the microgel

**Table 1.** The rate constants and the correlation coefficients of kinetic models

	Zero-order	First-order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
Rate constant	$k_0$ : 0.0382	$k_1$ : 0.0042	$k_H$ : 0.9424	$k_{KP}$ : 0.0154
Correlation coefficient ( $R^2$ )	0.8081	0.5876	0.9343	0.9900
Release exponent (n)	-	-	-	0.82

## CONCLUSION

The average particle size, PDI in particle size, and zeta-potential were  $218\pm 4.9$  nm,  $0.235\pm 0.0069$ , and  $-34.76\pm 1.27$  mV, respectively, for the synthesized microgel. The cytotoxicity study indicated that the synthesized microgel did not exhibit apparent cytotoxicity. The drug release kinetic studies showed that the microgel exhibited a non-Fickian transport. To conclude, the synthesized microgel can be considered as potential carriers for the drug delivery applications and may be used as an injectable delivery of therapeutic agents for the localized treatment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Çankiri Karatekin University Scientific Research Project Department with project number: MF200217B03.

## REFERENCES

- Chen J, Liu M, Chen W, Zhang N, Zhu S, Zhang S, Xiong Y 2011. Synthesis, swelling and drug-release behaviour of a poly(N,N-diethylacrylamide-co-(2-dimethylamino) ethyl methacrylate) hydrogel. *Journal of Biomaterials Science*, 22: 1049–1068.
- Gao C, Liu M, Chen J, Chen C 2012. pH- and temperature-responsive P(DMAEMA-GMA)-alginate semi-IPN hydrogels formed by radical and ring-opening polymerization for aminophylline release. *Journal of Biomaterials Science*, 23: 1039–1054.
- Honary S, Zahir F 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems- A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12: 255-264.
- Özbaş Z, Özkahraman B, Bal Öztürk A 2018. Controlled release profile of 5-fluorouracil loaded P(AAM-co-NVP-co-DEAEMA) microgel prepared via free radical precipitation polymerization. *Polymer Bulletin*, 75: 3053–3067.
- Özkahraman B, Acar I, Gök MK, Güçlü G 2014. Optimization of synthesis conditions of poly(N-vinylcaprolactam) microgels. *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 14: 13-21.
- Panayiotou M, Pohner C, Vandevyver C, Wandrey C, Hilbrig F, Freitag R 2007. Synthesis and characterisation of thermo-responsive poly(N,N'-diethylacrylamide) microgels. *Reactive and Functional Polymers*, 67: 807–819.

## Effect of Sodium Dodecyl Sulphate on Cu (II) Biosorption

Hüseyin Kaan Kabadayı<sup>1</sup>, Sevgi Ertuğrul Karatay<sup>1\*</sup>, Gönül Dönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sertugrul@ankara.edu.tr

### Abstract

Cu (II) is a toxic heavy metal for organisms. It has been observed that the incidence of disease tumours, thyroid tumours, neurological disorders, dermatitis, allergic rinse, gastrointestinal, pulmonary and hepatic disorder has increased in the presence of high Cu (II) concentrations. There are several treatment including chemical, physical and biological approaches for Cu (II) bioremoval. Chemical and physical methods can not be used on a large scale because of their complicated operation, difficult subsequent disposal and high cost. Biosorption is the main eco-friendly and greener biological process. Different biosorbent can be used for biosorption. Among them microbial biomass (yeast, fungi, microalgae, bacteria) is promising. In the present study, *Kluyveromyces marxianus*, which obtained from Ankara University Biotechnology Research Laboratory Culture Collection, cultivated in molasses medium and used as a biosorbent for Cu (II) removal. Different parameters affecting the process such as pH (3, 6, 9), initial Cu (II) concentration (25, 50, 75, 100 mg/L), biosorption time (from 0 to 120 minutes) were optimized. Furthermore the effect of an anionic surfactant (SDS, Sodium Dodecyl Sulphate) on biosorption was investigated in the study. The highest Cu (II) bioremoval was obtained as 70.7% in the presence of 0.1 mM SDS and 25 mg/L heavy metal at pH 9. The present study shows that *K. marxianus* biomass is a promising agent for Cu (II) removal from aquatic environment.

**Keywords:** Cu (II), Surfactant, *Kluyveromyces marxianus*, biosorption.

### INTRODUCTION

One of the biggest global problem, for sustainable development is pollution. This situation also destroys the balance of the ecosystem, causes great economic losses and damages to human health. Microorganisms in the ecosystem have been known for many years by humans to treat waste in the environment during their natural life cycle. Humans have used these properties of microorganisms in agricultural, domestic and industrial activities. (Litchfield and Carol 2005) However, when the world shifted to a more industrial system with urbanization, people showed more active interest in bioremediation. Bioremediation is defined as the process by which organic wastes are biologically reduced under controlled conditions to a harmless state or to levels below the concentration limits set by the regulatory authorities. (Boopathy 2000). This process is also one effective way of the heavy metal pollution removal in aquatic and soil environments. The dominant soil pollutants are heavy metals, toxic organic substances and radionuclides. (Tabak and Lens 2015). Increasing amounts of heavy metals in soil have been reported in many industrialized countries and regions. Metals and metalloids such as chromium, cadmium, mercury and lead can threaten the ecosystem and human health through direct exposure to the food chain, contaminated soil or water (Wuana and Okieimen 2011). Heavy metals are challenging pollutants for bioremoval. Thus, bioremoval needs some improvements via chemical agents. In this study surfactants are chosen as chemical agents.

Surfactant as the word means "surface covering". Surfactants reduce the surface tension of water. They are, therefore, referred to as "surfactants" (Homberg and Jönsson 2003). Surfactants exhibit properties that combine different surface pairs such as water-oil surface, air-water surface, liquid-solid surface. Surfactants include organic compounds such as alkyl sulphate, alkyl sulfonate, ethoxylated fatty acids, sodium salts. Surfactants are generally characterized by another group having a high affinity at the end of a structurally long molecule. Surfactants are sorted as ionic and non-ionic in terms of chemical status of this group. (Hamme et al. 2006). In light of all this information, it is clear that heavy metals will always threaten the environment and public health if they are not handled well enough. There is no doubt that the bioremoval is one of the most feasible and efficient ways of eliminating this threat.

## MATERIALS AND METHODS

*K. marxianus* used in this study was obtained from Ankara University Culture Collection. Until the experiments yeast cells were kept in slant potato dextrose agar (PDA) at +4 °C. Sugar beet molasses was used for yeast growth. By this purpose 300 gr/L stock molasses solution was hydrolysed with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, was inoculated to the fresh molasses medium and these experiments were carried out at 250 mL Erlen-Mayer flasks working volume with 100 mL.

### Cu (II) solution

For Stock Cu (II) solution 20.000 mg/L Cu (II).SO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O (Merck) used and was solved with distilled H<sub>2</sub>O. For bioremoval experiments four different (25mg/L, 50 mg/l, 75 mg/l, 100mg/l) Cu (II) concentrations were tested.

### SDS solution

Stock surfactants solution were prepared from Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>Na, MW: 288.4 g mol<sup>-1</sup>) is supplied by Fluka, at 0.5 M concentration by dissolving Distilled H<sub>2</sub>O. The assay was performed with 0.1 mM SDS. Experiment media was containing 0.1mM SDS and Cu (II) ions (25mg/L, 50 mg/l, 75 mg/l, 100mg/l).

### Biosorption Studies

The pH of the medium was adjusted to 3, 6, and 9, respectively, to determine the pH effect. Determine to initial Cu(II) concentration , 25, 50, 75 and 100 ppm Cu (II) were added to the medium. Medium containing 0.1mM SDS to each Cu (II) concentration medium for each pH value. Biosorption experiments were held in 250 ml flasks.

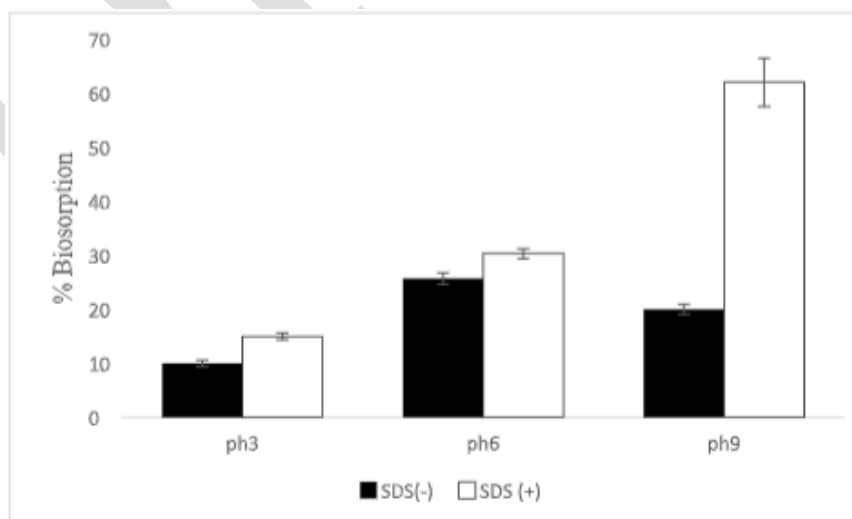
During the incubation period, samples were taken at 15, 30, 60 and 120mins.

## RESULTS

### pH Effect On Biosorption

Figures 1 and 2 show the biosorption efficiencies obtained for 120 minutes in media with different pH values of about 25 mg / L Cu (II), without addition of 0.1 mM SDS. In Figure 1, it was observed that the highest biosorption yield was obtained in the 15th minute for all three pH values tested in SDS-free media. These values were obtained as 10%, 25.7% and 20% for pH 3, 6, and 9, respectively. As a result, only the yeast cells were used in the biosorption experiments were found to have the highest bioremoval at pH 6.

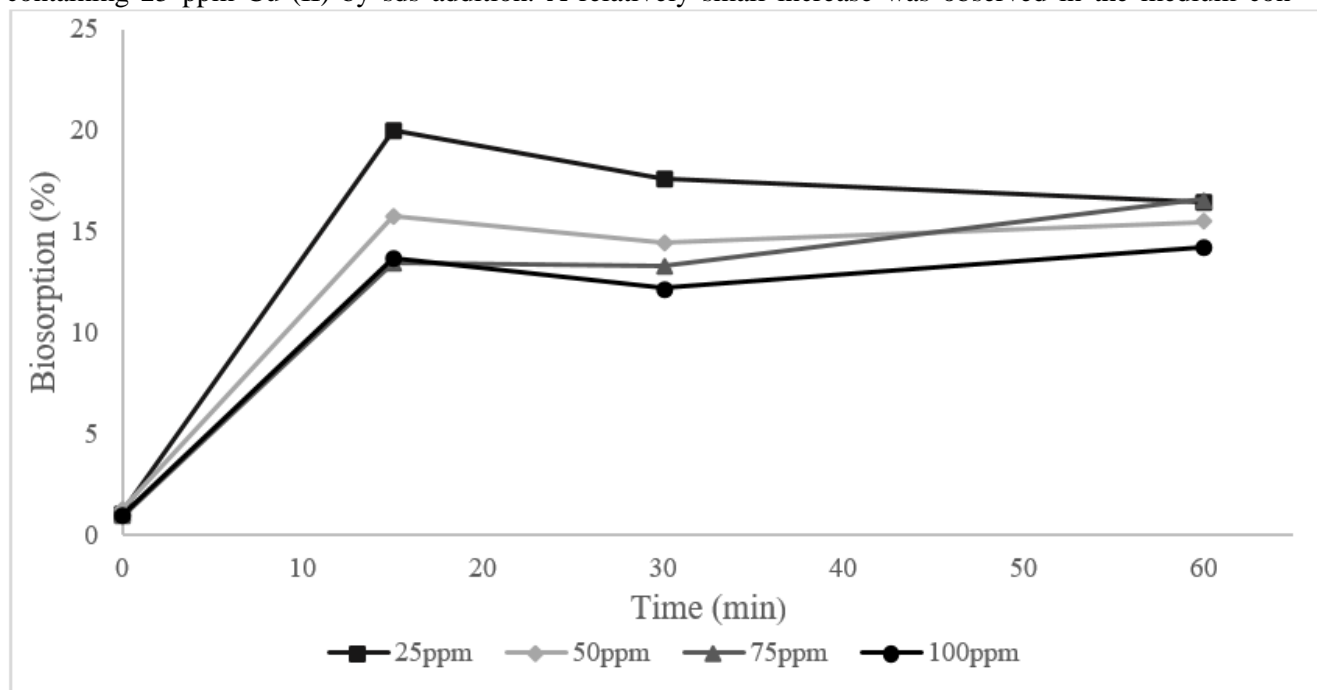
It can be understood from Figure 2, 0.1 mM SDS added to the medium shows a positive effect in the biosorption capacity at increasing pH values. In the presence of yeast cells and surfactant together, the highest biosorption was observed at the 15th minute. These values were found in 15%, 38.3%, 62% for pH 3, 6, and 9, respectively. The addition of surfactant to the medium increases the optimum pH value for biosorption from 6 to 9 according to the medium containing no surfactant, but the removal from 25.7% to 38.3% for pH 6 and from 20% to 62% for pH 9 was observed.



**Figure 1:** Biosorption capacity of *K. marxianus* at pH 3, 6 and 9 in the presence of about 25 mg / L Cu (II)

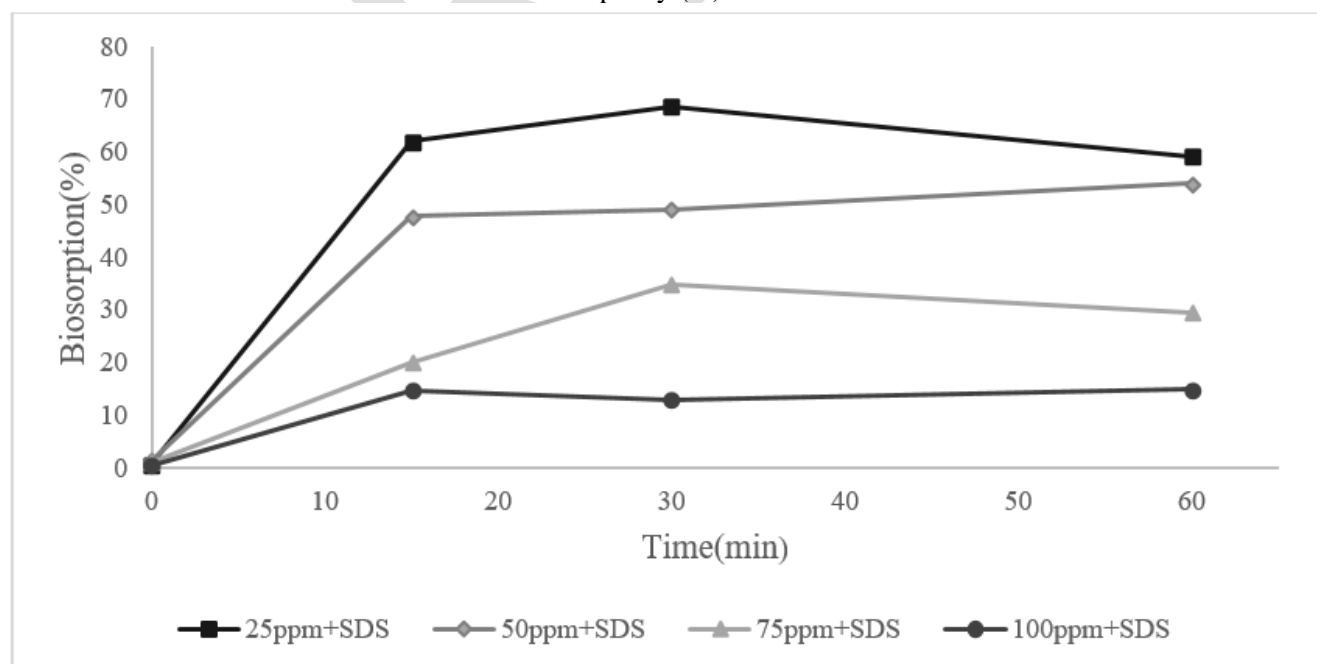
### Initial Cu (II) Concentration Effect On Biosorption

The effect of Cu (II) concentration was also investigated in the biosorption studies. While the concentration of Cu (II) increased, Cu (II) removal was decreased. (Figure 2-3). This can be caused by the dead biomass functional groups Cu (II) holding capacities are limited. Biosorption studies showed the effect of Cu (II) removal as a function time. During the experiment, it was observed that the Cu (II) sorption was generally maximum at 120 minutes (% 70.7) and post-released.  $q_m$  values increased from 08.1 to 18.9 in medium containing 25 ppm Cu (II) by sds addition. A relatively small increase was observed in the medium con



taining 100 ppm copper. (Table 1)

**Figure 2:** *K. marxianus* at a pH 9 of about 25, 50, 75, 100 mg / L Cu (II) and time dependent biosorption capacity (%)



**Figure 3:** *K. marxianus* at a pH 9 of about 25, 50, 75, 100 mg/L Cu (II) and 0.1mM SDS in the presence of time dependent biosorption capacity (%)

**Table 1:** Comparison of the amount of Cu (II) deposited per gram cell in bioaccumulation and biosorption processes with 1 g / L biomass of *K. marxianus* yeast

	q <sub>m</sub> (mg/g)	
	Biosorption	
	25 mg/L Cu (II)	100 mg/L Cu (II)
<i>K.marxianus</i>	08.1	15.8
<i>K.marxianus</i> +0.1 mM SDS	18.9	20.0

## DISCUSSION

Three different pH values (3,6 and 9) were tried to determine the effect of pH on biosorption. The highest removal (28.3%) was observed at pH 6 in without surfactant. Therefore surfactant was added pH 9 become is the optimum pH value. This is due to the fact that the surfactant entering the competition with H<sup>+</sup> ions does not have a positive effect on the removal potential.

Although the SDS did not have a positive effect on the growing rate of biomass, but much higher removal capacities were observed in the SDS medium. This is due to the hydrophobic tail parts of the SDS and also Cu<sup>2+</sup> ions, and with hydrophilic parts it is thought to be attached to the cell surfaces. It can be said that cell surfaces function as surfaces where SDS can be anchored in the environment. In addition, SDS modifies the electronegativity of the environment with various subatomic bonds and leads to more effective functioning of the functional groups (Kratochvil and Volesky 1998).

## CONCLUSION

In the light of all these findings and information, it has been shown that heavy metal bioremoval can perform very efficiently with microorganisms. It can be said that yeasts have eukaryotic cell structure, their resistance to toxicity, their ability to reproduce in low-cost media and their proliferation are suitable model organisms for heavy metal bioremoval. *K. marxianus* yeast is one of the fast-breaking yeasts in yeasts, resistant to high temperatures and able to reproduce even in the case of low carbon sources; It is a fast and effective solution in biomass. SDS, one of the frequently used anionic surfactants for removal, needs to be a matrix in which heavy metals can bind. (Ahn et al. 2009) Yeast cells are considered to be one of the most suitable candidates for this matrix.

As a result, it was revealed that *K. marxianus* was a promising microorganism in Cu (II) removal. With different studies such as metabolism engineering, media modifications and research of new chemical agents, the removal capacities of yeasts can be increased and the total cost of removal can be reduced. Further tests can be carried out to identify functional groups in yeast cells and to understand their working mechanisms.

## REFERENCES

- Ahn, C.K., Park, D., Woo, S.H. and Park, J.M. 2009. Removal of cationic heavy metal from aqueous solution by activated carbon impregnated with anionic surfactants. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3); 1130-1136.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1); 63-67.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. ve Lindman, B. 2003. *Surfactants and polymers in aqueous solution (Vol.2)*. Chichester: Wiley.
- Kratochvil, D. ve Volesky, B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7); 291-300.



Litchfield, C. 2005. Thirty years and counting: bioremediation in its prime. *AIBS Bulletin*, 55(3); 273-279.

Tabak, H. H., Lens, P., van Hullebusch, E. D. ve Dejonghe, W. 2005. Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides–1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(3); 115-156.

Van Hamme, J. D., Singh, A. ve Ward, O. P. 2006. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, 24(6); 604-620.

Wuana, R. A. ve Okieimen, F. E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Isrn Ecology*

DRAFT

## Effect of Temperature on Conventional Transesterification of *Coniochaeta hoffmannii* Lipids for Biodiesel Production

Sevgi Ertuğrul Karatay<sup>1\*</sup>, Ekin Demiray<sup>1</sup>, Hüseyin Kaan Kabadayı<sup>1</sup>, Gönül Dönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sertugrul@ankara.edu.tr

### Abstract

The lipids obtained from *Coniochaeta hoffmannii* which is isolated from biscuit factory wastes was used as a raw material in this study. Catalyst type (NaOH and KOH), catalyst concentration (1%, 2% and 3%), dried biomass concentration (1, 2 and 4 g/L) and reaction time (0.5, 4 and 12 h) were optimized at different temperatures (40 and 60 °C), for biodiesel production. When the temperature was increased, similar results were obtained at 40 and 60 °C. Higher C16 and C18 fatty acid methyl ester yields were observed when KOH was used at 40 °C. The highest C16+C18 fatty acid methyl ester yield was obtained as 83.7% in the presence of 4 g/L dried *C. hoffmannii* biomass, 3% KOH and methanol at the end of the 12 hours of reaction time. There was no significant difference for C16 and C18 fatty acid methyl ester yields when NaOH and KOH were used as catalyst.

**Keywords:** *Coniochaeta hoffmannii*, transesterification, temperature, biodiesel.

### INTRODUCTION

With the increasing human population, World needs to more energy. According to the World Energy Council, 80% of energy demands are met by fossil fuels. This fossil fuel consumption causes serious environmental concerns such as pollution and global warming. One of the biggest sources of this pollution is NO<sub>x</sub> compounds, resulted from diesel fuel combustion. NO<sub>x</sub> compounds cause increasing infectious diseases rates, water toxicity, and altered air quality.

Therefore, there is an urgent need for renewable and environmentally friendly alternative energy sources in order to reduce the negative effects of fossil fuels. One of the most significant environmentally friendly energy sources is biodiesel (Mohd Azhar et al., 2017; Montgomery, 2017; Watts et al., 2018,). The term biodiesel is the alkyl esters derived from renewable lipid sources. One of the advantageous aspects of biodiesel is the possibility of its production from a variety of different oil feed stocks such as plant, animal, waste oils and microorganisms. Commercialization is a big obstacle for biodiesel because of high production costs. Due to the ethical concerns of using genetically modified plants for mass biodiesel production is another disadvantage. Although the usage of waste oils can reduce the costs, additional cheap raw materials are still needed for the process (Bhuiya et al., 2016). In this sense, oils obtained from yeast, fungi and photosynthetic microorganisms have potential application in biodiesel production because of their similar structure and fatty acid composition with plant oils (Chew et al., 2018). Furthermore, microorganisms not affected by changing climatic conditions, have high lipid content in their cells. In addition, they can be produced in a short time (Patel et al., 2016). So many reports can be found in the literature on the usage of different kind of microbial oils as a raw material for biodiesel production (Rodrigues Reis et al., 2019, Singh et al., 2018, Yook et al., 2019). Today, studies about the use of microbial lipids as raw materials for biodiesel production are mostly focused on fungi and microalgae lipids.

*Coniochaeta hoffmannii* also known as *Lecythophora hoffmannii* is a filamentous ascomycetous fungus belongs to the Coniochaetaceae family. *C. hoffmannii* commonly grows in soil, leaf litter and wood debris. One of the most significant difference of *C. hoffmannii* is its degradation ability of lignocellulose. (Leonhardt et al., 2017). Despite these features, there is almost no attention about biotechnological properties of *C. hoffmannii* in the literature. This study suggests the usage of newly isolated *C. hoffmannii* strain from soil could be used for efficient biodiesel production. Some important parameters about lipid extraction and transesterification reaction such as dried biomass concentration, catalyst type and concentration, temperature and reaction time were optimized. For this purpose, conventional transesterification method with dried biomass were applied.

## MATERIALS AND METHODS

### Cultivation Conditions

Pure cultures were kept in a small fermentation medium to get their activation and 2 mL of 24 h-old preculture inoculated to the 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL growth medium. The cells were cultured for four days. Then, these biomass dried at 80 °C overnight.

### Transesterification Experiments

Dried biomass concentration (1–4 g/L), alcohol type (methanol) and temperature (40–60 °C), alkali catalyst concentration (1–3%) and reaction time (0.5–12 h) were optimized.

### Analytical Methods

The fatty acid methyl ester content of *C. hoffmannii* was analysed. The crude lipids cultivated at optimum conditions which were obtained from the yeast cells were solved in hexane and transesterified to biodiesel by alkali catalysis with dissolved in methanol. After transesterification step, 1 µL sample was taken from the upper phase and the methylated fatty acids were analysed by the GC-2010 gas chromatograph (Shimadzu, Japan). The analysis set up of GC was as follows: flame ionization detector (FID) 240 °C; column TR-CN100, 60 m 0.25 mm 0.20 mm (Teknokroma); carrier gas N<sub>2</sub>. Fatty acid peaks were identified against the chromatogram of a mixed fatty acid methyl ester standard (37 Comp. FAME Mix 10 mg/mL in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; Supelco, USA).

Each experiments and measurements were performed in triplicates.

## RESULTS

### Effect Of NaOH On Transesterification Reaction

According to the data, the highest C16 and C18 methyl ester yield was 79.5% in the presence of 4 g / L dry biomass and 3% NaOH was used as catalyst. When the effect of transesterification reaction is examined, it is observed that the reaction is completed in 0.5 hours and the increasing time does not lead to a significant improvement. When the temperature was increased, similar results were obtained at 40 and 60 °C.

**Table 15.** Effect of different parameters on transesterification reaction (alcohol: methanol, temperature: 40 °C catalyst NaOH)

Dry biomass concentration (g/L)	time (hour)	C16+C18 (%)		
		%1 NaOH	%2 NaOH	%3 NaOH
1	0.5	65.0±2.2	68.2±2.1	71.2±2.9
	4.0	64.7±2.1	66.9±2.6	70.9±2.0
	12.0	63.4±3.1	65.0±2.6	69.9±1.5
2	0.5	69.7±2.7	70.4±2.2	69.9±2.1
	4.0	70.5±2.9	71.3±3.2	73.4±3.1
	12.0	70.0±2.7	71.9±3.0	72.3±2.2
4	0.5	75.1±2.2	76.3±3.1	77.7±2.7
	4.0	76.5±3.0	75.8±2.8	76.5±2.8
	12.0	73.4±2.6	74.5±2.1	73.2±2.2

**Table 2** Effect of different parameters on transesterification reaction (alcohol: methanol, temperature: 60 °C, catalyst NaOH)

Dry biomass concentration (g/L)	time (hour)	C16+C18 (%)		
		% 1 NaOH	% 2 NaOH	% 3 NaOH
1	0.5	55.2±2.3	67.9±2.9	70.6±2.3
	4.0	65.4±2.9	63.9±2.2	72.9±2.5
	12.0	64.3±2.0	61.9±1.9	70.9±3.1
2	0.5	70.1±3.0	71.2±2.1	74.6±2.1
	4.0	69.9±2.7	68.8±3.1	77.5±2.0
	12.0	69.3±2.5	66.5±2.7	72.2±2.2
4	0.5	78.4±2.1	77.7±1.6	78.0±2.2
	4.0	77.6±2.0	76.9±2.3	79.5±3.1
	12.0	78.5±1.4	75.2±3.2	75.9±2.0

### Effect Of KOH On Transesterification Reaction

Table 3 and 4 show the results show the transesterification reaction when KOH used as a catalyst. The same trend is observed on transesterification when NaOH is used. The highest C16 and C18 methyl esters were obtained in the presence of 4 g/L dry biomass at similar results were obtained at 40 and 60 °C using KOH as catalyst.

**Table 3** Effect of different parameters on transesterification reaction (alcohol: methanol, temperature: 40 °C, catalyst KOH)

Dry biomass concentration (g/L)	time (hour)	C16+C18 (%)		
		% 1 KOH	% 2 KOH	% 3 KOH
1	0.5	58.8±2.2	65.4±2.2	67.5±2.4
	4.0	57.4±2.7	67.1±2.7	68.5±2.2
	12.0	55.7±2.5	65.5±2.5	66.1±3.1
2	0.5	56.0±3.1	69.4±2.3	70.5±2.0
	4.0	56.6±3.0	68.6±2.6	72.1±3.1
	12.0	54.9±3.3	67.6±2.2	71.7±2.4
4	0.5	59.6±3.2	81.5±3.1	80.0±2.6
	4.0	61.3±2.9	78.5±2.5	82.8±1.9
	12.0	60.0±1.7	80.5±3.0	83.7±2.2

**Table 4** Effect of different parameters on transesterification reaction (alcohol: methanol, temperature: 60 °C, catalyst KOH)

Dry biomass concentration (g/L)	time (hour)	C16+C18 (%)		
		% 1 KOH	% 2 KOH	% 3 KOH
1	0.5	52.3±3.1	66.7±2.5	69.8±2.6
	4.0	51.6±2.9	65.2±2.2	69.4±3.1
	12.0	53.1±2.2	64.3±3.1	65.2±2.9
2	0.5	52.0±2.5	68.4±2.9	71.2±3.1
	4.0	54.3±3.1	67.5±2.7	69.9±2.7
	12.0	56.7±2.2	66.3±3.0	67.9±2.5
4	0.5	60.6±1.9	80.8±2.6	79.9±2.2
	4.0	64.3±2.0	78.6±2.2	77.3±3.1
	12.0	63.9±2.7	79.7±2.6	76.9±2.5

Slight decrease was observed in the ratio of fatty acid methyl esters as the temperature increased. In a study, it is stated that the methyl ester mixture product increases as the temperature decreases because high temperatures accelerate the saponification reaction of triglycerides. However, it is clearly stated in the literature that the concentration of catalyst on the transesterification reaction is more effective than the temperature parameter (Leung and Guo, 2006; Colucci et al., 2005).

In the same study, it was shown that changing KOH concentrations did not affect methyl ester yield (Colucci et al. 2005).

As is known, the alkali catalysts complete the reaction in a short time, even at room temperature. Acidic catalysts, however, require higher temperatures and longer reaction times. (Anastopoulos et al. 2009).

In our study, NaOH and KOH were used as basic catalyst. Although the two catalysts were close to each other, maximum total C16 and C18 fatty acid methyl esters were observed using KOH.

## CONCLUSION

In the current report, the highest C16 and C18 FAME yields of *C. hoffmannii* were observed 83.7%, respectively. It is observed that there is no significant effect of temperature in the efficient conversion of lignocellulosic materials into microbial-based biodiesel. It is understood that the temperature and concentration of base used in the experiments did not have a significant impact on FAME yields of *C. hoffmannii*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), TURKEY, Project No: 216Z061.

## REFERENCES

- Anastopoulos, G., Zannikou, Y., Stournas, S., & Kalligeros, S. (2009). Transesterification of vegetable oils with ethanol and characterization of the key fuel properties of ethyl esters. *Energies*, 2(2), 362-376.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.
- Bhuiya, M. M. K., Rasul, M. G., Khan, M. M. K., Ashwath, N., & Azad, A. K. (2016). Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1109-1128.
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Biofuels from microbial lipids. In *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion* (pp. 359-388). Springer, Singapore.
- Colucci, J. A., Borrero, E. E., & Alape, F. (2005). Biodiesel from an alkaline transesterification reaction of soybean oil using ultrasonic mixing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(7), 525-530.
- Do Yook, S., Kim, J., Woo, H. M., Um, Y., & Lee, S. M. (2019). Efficient lipid extraction from the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using switchable solvents. *Renewable energy*, 132, 61-67.
- Leonhardt, S., Büttner, E., Gebauer, A., Hofrichter, M., & Kellner, H. (2017). Crossm draft genome sequence of the phenol-degrading bacterium. *Genome Announc.*, 6, 1-2.
- Leung, D. Y. C., & Guo, Y. (2006). Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. *Fuel processing technology*, 87(10), 883-890.
- Montgomery, H. (2017). Preventing the progression of climate change: one drug or poly pill?. *Biofuel Research Journal*, 4(1), 536-536.
- Patel, A., Arora, N., Sartaj, K., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2016). Sustainable biodiesel production from oleaginous yeasts utilizing hydrolysates of various non-edible lignocellulosic biomasses. *Renewable and sustainable energy reviews*, 62, 836-855.
- Reis, C. E. R., Carvalho, A. K. F., Bento, H. B., & de Castro, H. F. (2019). Integration of microbial biodiesel and bioethanol industries through utilization of vinasse as substrate for oleaginous fungi. *Bioresource Technology Reports*, 6, 46-53.
- Singh, G., Jeyaseelan, C., Bandyopadhyay, K. K., & Paul, D. (2018). Comparative analysis of biodiesel produced by acidic transesterification of lipid extracted from oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *3 Biotech*, 8(10), 434.
- Watts, N., Amann, M., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Belesova, K., Berry, H., ... & Campbell-Lendrum, D. (2018). The 2018 report of the Lancet Countdown on health and climate change: shaping the health of nations for centuries to come. *The Lancet*, 392(10163), 2479-2514.

## Bioremoval of Commonly Used Textile Dyes by *Aspergillus sp.*

Gözde Bodur<sup>1</sup>, Sevgi Ertuğrul Karatay\*<sup>1</sup>, Ekin Demiray<sup>1</sup>, Gönül Dönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sertugrul@ankara.edu.tr

### Abstract

Synthetic dyes are used in textile industry frequently. Exceeding usage of these dyes has a negative impact on the environment. Therefore, in this study bioremoval of common textile dyes with different chemical structures (Reactive Black 5, Reactive Red 120, Reactive Orange 14, Brilliant Blue R and Remazol Brilliant Blue) were investigated in molasses medium by newly isolated *Aspergillus sp.* Some important parameters such as pH, incubation time, initial dye type, initial dye concentration and inoculum amount were optimized. The bioremoval rate was obtained as 92.92% in the presence of 286.95 mg/L Reactive Black 5 at the end of the four day incubation period at pH 5. When the inoculum amount was increased the highest removal yield and maximum specific dye uptake values were 93.98% and 41.73 mg/g, respectively. According to these results fungal biomass that used in the study is a promising bioremoval agent for textile dyes.

**Keywords:** Fungus, Reactive Black 5, Bioremoval, *Aspergillus sp.*

### INTRODUCTION

As a result of industrial developments in recent years, environment have been affected negatively. Many industries, such as the textile, chemistry or cosmetics, use dyes to colour their products. These dyes causing pollution and they can exist at the wastewaters in the environment. Due to the release of dyes into wastewaters, some serious environmental and health problems occur such as cancer or kidney, brain and central nervous system dysfunctions (Przystas et al., 2018).

In the textile industry, the usage of synthetic dyes has increased dramatically over the years. This increase poses a major threat to fauna and flora by the release of synthetic dyes into the environment. Unfortunately it is difficult to decolorization of these dyes by chemical and physical methods because of their limited availability or high operation cost (Bankole et al., 2018). Therefore it is very important to develop alternative removal methods. In comparison with chemical or physical methods, biological treatment is very advantageous due to its low cost and environmental friendliness. Thus biological treatment has a great potential for dye removal studies (Yang et al., 2016).

Bioaccumulation, which is one of the most important biological treatment methods, can be defined as the accumulation of pollutants in actively growing cells by metabolic pathways (Taskin and Erdal 2010). Fungi have been used in many fields such as removal of organic substances, medical purposes, formation of industrial products and enzyme production and usage of fungi in biological treatment processes is an economical and environmentally friendly approach (Vidya et al., 2017).

In this study, fungal isolate which belong to the *Aspergillus sp.* was used as microorganism source. Reactive Red 120, Reactive Black 5, Brilliant Blue R, Remazol Brilliant Blue, Reactive Orange 14 dyes which are used in textile industry and have different chemical structure were used in bioremoval studies. Important Parameters such as the effect of increasing dye concentrations, the effect of increasing amount of fungus inoculum and initial pH were optimized.

### MATERIALS AND METHODS

#### Microorganism

*Aspergillus sp.* was obtained from Ankara University Culture Collection. Until experiments fungus was kept at +4 °C. Before bioaccumulation assays *Aspergillus sp.* was cultivated in 8% molasses medium which supplemented with 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and pH was adjusted to 5. Molasses medium was autoclaved prior to fermentation.

#### Dye Types and Stock Solutions of Dyes

Textile dyes with different chemical structures such as, Reactive Black 5 (CAS Number: 17095-24-8/Sigma), Reactive Red 120 (CAS Number: 61951-82-4/Sigma), Brilliant Blue R (CAS Number: 6104-59-2/Sigma), Reactive Orange 14 (CAS Number: 12225-86-4/Sigma) and Remazol Brilliant Blue R (CAS Number: 2580-78-1/Sigma) were used in the current study. Stock solutions of dyes were prepared as 2% in distilled water.

Dye concentrations were determined spectrophotometrically at 600 nm., 520 nm., 435 nm., 560 nm. and 590 nm. for Reactive Black 5, Reactive Red 120, Reactive Orange 14, Brilliant Blue R, Remazol Brilliant Blue R, respectively.

At a concentration of approximately 100 mg/L Reactive Black 5, Reactive Red 120, Reactive Orange 14, Brilliant Blue R and Remazol Brilliant Blue R dyes were added to 250 ml conical flask with 100 mL molasses. The molasses medium was allowed to incubate in a 100 rpm shaking incubator. At the end of the incubation period, 3 mL samples were taken and centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. Dye removal was determined spectrophotometrically.

#### Effect of initial pH and dye type on bioremoval

pH of the medium containing 100 mg/L of each dye was adjusted to 4, 5, 6 and 7. The growth and dye removal capacity of the *Aspergillus sp.* was investigated.

#### Effect of initial dye concentration on bioremoval

Reactive Black 5 (RB5), which was removed with the highest capacity was selected for further experiments. Increasing initial RB5 concentrations (300, 600, 900 and 1200 mg/L) were added to the molasses medium with increasing concentration to determine the effect of initial pollutant concentration on bioremoval.

#### Effect of increasing amount of inoculum on bioremoval

After investigating the effect of initial dye concentrations, the amount of inoculum was doubled in order to determine the effect of increased biomass volume. The initial dye amounts were added to the molasses medium. of approximately 300 mg/L, 600 mg/L, 900 mg/L, 1200 mg/L

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Effect of dye type on bioremoval

Because of bioremoval rates of the dyes were high and similar at 100 mg/L initial dye loading, higher concentration (300 mg/L) of dye was also tested for *Aspergillus sp.* On the 4th day of the incubation, the bioremoval were shown in Table 1. In the presence of 300 mg/L dye loading, the highest removal yield was detected at RB5 as 92.13% (Table 1). Therefore RB5 was selected for further studies. Some previous reports in the literature depict that, fungi can remove the RB5 dye. For instance, Grisales et al., (2019) reported that fungus *Leptosphaerulina sp.* removed 91.9% RB5 in the presence of 200 mg/L initial dye loading. In another study Mazmanci et al. (2005) investigated the bioremoval capacity of the RB5 by *Funalia trogii*. The maximum bioremoval rate was found as 99% in the presence of 150 mg/L initial dye loading at the end of 21 days incubation period.

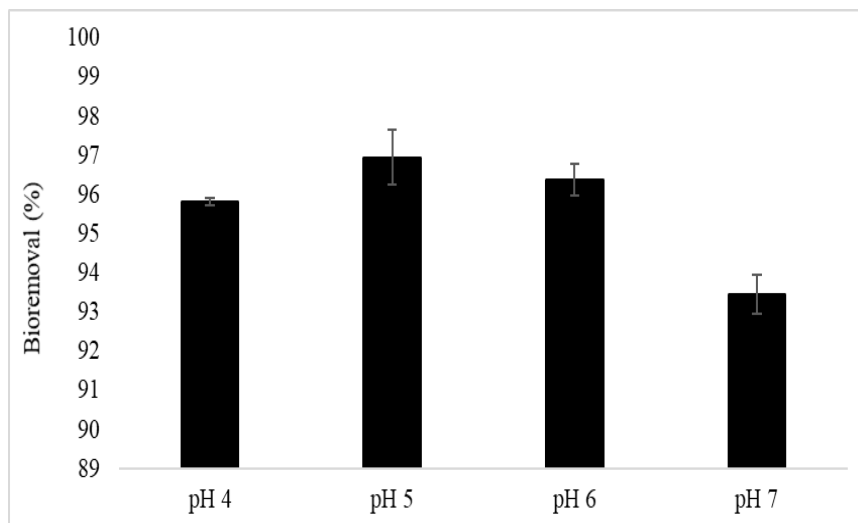
**Table 1.** Bioremoval yields of *Aspergillus sp.* in the presence of different dyes (T: 30 °C, agitation speed 100 rpm, pH:5)

Dye	Initial dye concentration C <sub>0</sub> (mg/L)	Bioremoval (%)	Initial dye concentration C <sub>0</sub> (mg/L)	Bioremoval (%)
RB5	107.24	96.37 ±0.4	310.14	92.13 ±0.9
RR120	98.72	98.25 ±0.8	293.63	86.99 ±0.6
RO14	95.68	94.31 ±1.0	257.2	57.85 ±2.8
BBR	112.44	96.21 ±0.1	279.68	91.94 ±0.7
RBBR	108.72	99.31 ±0.8	277.27	57.29 ±5.6

According to Table 1, the highest removal occurred on the fourth day of incubation as 92.13 % with RB5 dye in the presence of 310 mg/L initial dye concentration. On the other hand the lowest bioremoval was determined as 57.29 % in the presence of 277 mg/L RBBR. Therefore further studies were carried out with RB5.

### Effect of initial pH

pH is an important factor for bioremoval. Suboptimal or superoptimal pH values could result with lower bioremoval rate. Therefore, in this part of the study, optimal pH value for bioaccumulation was investigated. In order to investigate the effect of initial pH on the bioremoval, *Aspergillus sp.*, cultivated in the presence of approximately 100 mg/L RB5 with different pH values. pH of the RB5 contained molasses media were adjusted to 4, 5, 6 and 7 respectively. The removal yields of *Aspergillus sp.* at different pH values were presented in Figure 1. Mild pH values between 4-6 are generally regarded suitable for fungi. For example in a study, decolourization capacity of the *Aspergillus niger* was observed as 61.0%, when the researchers used 100 mg/L initial RB5 at pH 5 (Taskin and Erdal 2010).



**Figure 1.** Bioremoval rates of *Aspergillus sp.* in the presence of different pH values (T: 30 °C, agitation speed 100 rpm).

As Figure 1 depicted, *Aspergillus sp.* removed 95.82%, 96.95%, 96.39%, 93.45% RB5 at pH 4, 5, 6 and 7 respectively. The maximum bioremoval rates were detected at the pH 5. Thus, further studies were carried out at pH 5. Similarly in a study the highest RB5 bioremoval was found at pH 5 as 93% in the presence of 200 mg/L initial dye loading (Kumar et al., 2015).

### Effect of increasing dye concentrations on bioremoval

*Aspergillus sp.* were cultivated in increasing RB5 concentrations in order to determine the effect of dye concentrations on bioremoval. The amount of bioremoval yield from the 2nd day were shown in Table 2. Increasing dye concentrations caused lower bioremoval yields. On the fourth day of incubation, the highest removal rate was 92.92% and the lowest bioremoval rate was 35.67% due to increasing dye concentrations.

**Table 2.** Effect of increasing concentration of RB5 on *Aspergillus sp.* (T: 30 °C, agitation speed 100 rpm, pH:5)

Initial dye concentration $C_0$ (mg/L)	Day 2		Day 3		Day 4	
	$C_{ad}$	%	$C_{ad}$	%	$C_{ad}$	%
286.95	173.91	60.6 ±1.2	234.05	81.56 ±1.7	266.66	92.92 ±2.1
597.1	292.02	48.9 ±1.8	306.52	51.33 ±1.2	425.36	71.23 ±1.2
857.97	230.43	26.85 ±1.1	294.2	34.29 ±1.4	397.1	46.28 ±1.4
1214.49	248.55	20.46 ±1.6	323.91	26.67 ±0.0	433.33	35.67 ±0.5

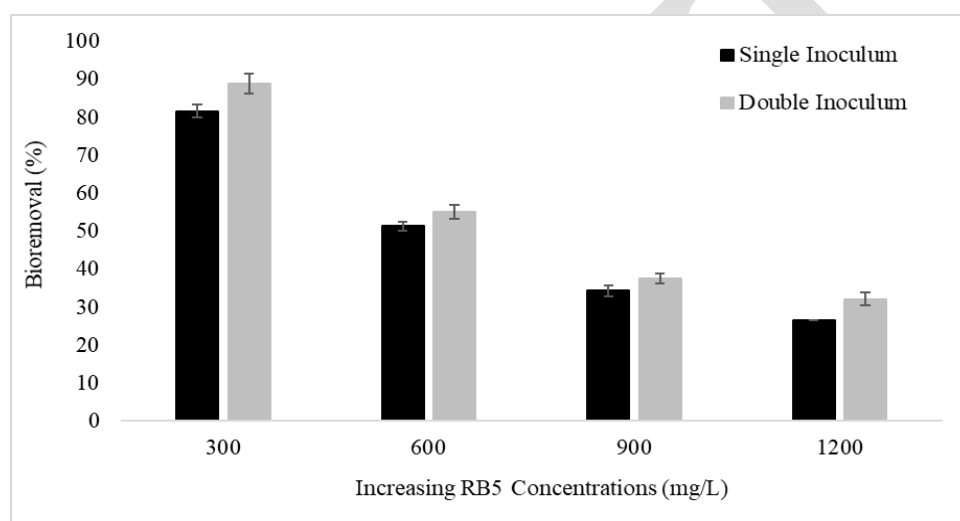


Similar observations were reported by Erdem et al., (2017). Researchers found 99% bioremoval yield for 50 mg/L reactive blue 19. On the other hand removal rate decreased to 47% when 500 mg/L initial dye was used. In another study, Wang et al., (2008) tested the effect of initial dye concentrations between 70.3-734.1 mg/L. The highest bioremoval was found in the presence of 70.3 mg/L as 100%. On the other hand the lowest bioremoval rate was detected as 20.6% in the presence of 734.1 mg/L initial dye loading.

### Effect of increasing inoculum concentration on bioremoval

The effect of single and double inoculum amount on RB5 bioremoval at the end of 3 days incubation time, was shown in Figure 2.

Figure 2 showed that the bioremoval of single and double inoculum of *Aspergillus sp.* in the presence of 300, 600, 900, 1200 mg/L increased RB5 concentrations. In the studies conducted with single inoculum, the percentages of bioremoval were found to be 81.56%, 51.33 %, 34.29 %, 26.67%, respectively. In the studies carried out with double inoculum, these values were observed as 88.88%, 55.09%, 37.49%, 32.15% in the presence of 300, 600, 900, 1200 mg/L RB5 respectively (Figure 2).



**Figure 2.** The effect of the increasing inoculum on the bioremoval of increasing RB5 concentrations on the third day with *Aspergillus sp.* (T: 30 °C, agitation speed: 100 rpm, pH: 5)

Table 3 depicts the maximum specific dye uptake values in the presence of increasing dye concentrations. The maximum specific dye uptake value at low concentration was found as 40.22 mg/g in single inoculum and 41.73 mg/g in double inoculum. The maximum specific dye uptake value at high concentration was 76.83 mg/g in studies with single inoculum and 82.37 mg/g in double inoculum.

**Table 3.** Maximum specific RB5 uptake values per gram in bioremoval studies with *Aspergillus sp.*

C <sub>0</sub> (mg/L)		C <sub>ad</sub> (mg/L)		q <sub>m</sub> (mg/g)		X <sub>m</sub> (g/L)		Bioremoval (%)	
Single inoculum	Double inoculum	Single inoculum	Double inoculum	Single inoculum	Double inoculum	Single inoculum	Double inoculum	Single inoculum	Double inoculum
286.95	313.04	266.66	294.2	40.22 ±0.1	41.73 ±0.1	6.63 ±0.02	7.05 ±0.02	92.92 ±2.1	93.98 ±0.6
597.1	626.08	425.36	455.07	65.54 ±0.2	66.53 ±0.1	6.49 ±0.02	6.84 ±0.01	71.23 ±1.2	72.68 ±2.6
857.97	927.53	397.1	462.31	68.11 ±0.2	73.61 ±0.5	5.83 ±0.02	6.28 ±0.04	46.28 ±1.4	49.84 ±1.1
1214.49	1275.36	433.33	500.0	76.83 ±0.4	82.37 ±0.0	5.64 ±0.03	6.07 ±0.01	35.67 ±0.5	39.2 ±2.0

## CONCLUSION

Removal of textile wastes has gained great importance in the recent years. Biological treatment has advantages such as being economic, eco-friendly and effective method. In this study, the effective and cheap bioremoval of RB5 which is a commonly used dye in textile industry was investigated by *Aspergillus sp.* It was shown that the fungus could tolerate really high dye concentrations such as 1200 mg/L. *Aspergillus sp.* was found effective for RB5 bioremoval. Therefore, usage of *Aspergillus sp.* biomass for removal studies is quite promising.

## REFERENCES

- Bankole O.P., Adekunle A. A., Obidi O.F., Olukanni O.D., Govindwar S.P. 2015. Degradation of indigo dye by a newly isolated yeast, *Diutina rugosa* from dye wastewater polluted soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5; 4639-4648.
- Erdem, Ö., Cihangir, N. 2018. Color Removal of Some Textile Dyes from Aqueous Solutions Using *Trametes versicolor*. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 45(4); 499-507.
- Kumar, S., Kumar, R. 2015. Decolorization of reactive black HFGR by *Aspergillus sulphurous*. *Annals of biology research*, 3; 3811-3817.
- Matheickal, J. T., Yu, Q. 1997. Biosorption of heavy metals from wastewater using Australian biomass. *Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing*, 5(1-2); 101-114.
- Mazmanci, M. A., Ünyayar, A. 2005. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochemistry*, 40(1); 337-342.
- Pérez-Grisales, M. S., Castrillón-Tobón, M., Copete-Pertuz, L. S., Plácido, J., Mora-Martínez, A. L. 2019. Biotransformation of the antibiotic agent cephadroxy and the synthetic dye Reactive Black 5 by *Leptosphaerulina sp.* immobilised on *Luffa (Luffa cylindrica)* sponge. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18; 101051.
- Przystaś, W., Zabłocka-Godlewska, E., Grabińska-Sota, E. 2018. Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports. *brazilian journal of microbiology*, 49(2); 285-295.
- Taskin, M., Erdal, S. 2010. Reactive dye bioaccumulation by fungus *Aspergillus niger* isolated from the effluent of sugar fabric-contaminated soil. *Toxicology and industrial health*, 26(4); 239-247.
- Vidya, S., Chandran, C., Bai, M. 2017. Dye decolourization using fungal laccase: A review. *International journal of innovations in engineering and technology*, 8; 118-123.
- Wang, B. E., Hu, Y. Y. 2008. Bioaccumulation versus adsorption of reactive dye by immobilized growing *Aspergillus fumigatus* beads. *Journal of Hazardous Materials*, 157(1); 1-7.
- Yang, P., Shi, W., Wang, H., Liu, H. 2016. Screening of freshwater fungi for decolorizing multiple synthetic dyes. *brazilian journal of microbiology*, 47(4); 828-834.

## Ceviz (*Juglans regia* L.) İç Yapracağının Antioksidan-Oksidan Durumu ve *İn Vitro* Antimikrobiyal Kapasitesi; Cevizin Bir Başka Olası Etnomedisinal Kısmı

Elif Azize Özşahin Delibaş<sup>1\*</sup>, Esin Kıray<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup> Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Tokat, Türkiye

<sup>2</sup> Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Kırşehir, Türkiye

\*elif.delibas@gop.edu.tr

### Özet

Ceviz (*Juglans regia* L.), kapsamlı biyolojik aktiviteleri ve farmasötik özellikleri ile eşsizdir. Literatürde, cevizin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlendiği birçok araştırmaya rastlanırken, cevizin odunsu iç yaprağının incelendiği çalışma sayısının çok az olduğu görüldü. Bu çalışmada, cevizin bir tür atığı olan odunsu iç yaprağının (perde) antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Ceviz iç yaprağının etanolik özütü soksilet cihazı ile elde edildi. Toplam antioksidan-oksidan kapasite (TAC-TOC) değerleri, Rel Assay Diagnostics (RL010/RL009; Gaziantep-Türkiye) marka kit kullanılarak ölçüldü. “Trolox ekivalanı” olarak verilen TAK değeri 3,889 µmol Trolox ekivalanı/L; “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı” olarak verilen TOK değeri 16,642 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı/L olarak tayin edildi. Bu çalışmada, ceviz iç yaprağı ekstraktı ayrıca tıbbi açıdan önemli bakteri suşlarına karşı potansiyel antibakteriyel aktivite açısından da değerlendirildi. Antibakteriyel aktivite, kuyu difüzyon metodu kullanılarak belirlendi. Ekstraktın antibakteriyel aktivitesi iki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve bir Gram negatif (*Escherichia coli*) bakteriye karşı test edildi. Ekstraktın oluşturduğu inhibisyon zonu, antibakteriyel aktivite için Tetrasiklin (30 mg), Gentamisin (10 mcg), Siprofloksasin (5 mg) ve Kloramfenikol (30 mg) gibi farklı standartlarla karşılaştırıldı. Bulgularımıza (12-16 mm) göre, *Juglans regia* L. iç yaprağının özütü, seçilen test mikroorganizmalarına karşı kayda değer bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu çalışmada, ceviz içi odunsu yaprağına ait özütün antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Juglans regia* L., total antioksidan kapasite, total oksidan durum, antimikrobiyal kapasite, kuyu difüzyon metodu.

### Antioxidant-Oxidant Condition And *İn Vitro* Antibacterial Capacity Of Walnut (*Juglans Regia* L.) Inner Leaf; Another Possible Ethnomedicinal Part Of Walnut

#### Abstract

Walnut (*Juglans regia* L.) is unique for its extensive biological activities and pharmaceutical properties. Many studies have been done to determine the physical and chemical properties of walnut, but in the literature there are very few studies examining the woody inner leaf of it. In this study, it is aimed to determine the antioxidant and antibacterial properties of walnut's inner leaf (curtain), a kind of waste. The ethanolic extract of the walnut inner leaf was obtained by using Soxhlet. Total antioxidant-oxidant capacity (TAC-TOC) values were measured using Rel Assay Diagnostics (RL010 / RL009; Gaziantep- Turkey) brand kit. TAC and TOC value is given as 'Trolox equivalent' and 'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent' respectively; TAC value was determined as 3,889 µmol Trolox equivalent/L and TOC values were assigned as 16,642 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalents/L. In this study, walnut inner leaf extract was also evaluated for potential antibacterial activity against medically important bacterial strains. The antibacterial activity was determined by using agar-well diffusion method. The antibacterial activity of extract was tested against two Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and one Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria. Zone of inhibition of extract was compared with that of different standards like Tetracycline (30 mg), Gentamicin (10 mcg), Ciprofloxacin (5mcg) and Chloramphenicol (30 mg) for antibacterial activity. Based on our findings (12-16 mm), the extract of the *Juglans regia* L. inner leaf, showed remarkable antimicrobial activity against the selected test micro-organisms. In this study, the extract of walnuts' woody inner leaf was determined to have antibacterial and antioxidant properties.

**Keywords:** *Juglans regia* L., total antioxidant capacity, total oxidant status, antibacterial capacity, well diffusion method

## 1. GİRİŞ

Hastalıkların tedavisinde tıbbi bitkilerin kullanımı, insanoğlunun yerleşik hayata geçmesiyle eş zamanlı gerçekleşen eski bir gelenektir. Bitkisel ilaçlar, gelişmekte olan ülkelerde kırsal toplulukların kültür ve geleneklerinin önemli bir parçasını oluşturur (Njume ve ark., 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan bitkiler, antik çağlardan beri gıdalara tat, koku ve renk verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca geleneksel tedavi yöntemlerinde sıklıkla başvurulan tıbbi bitkiler, içerdikleri etken maddeler dolayısıyla kozmetik ve ilaç sektöründe de aktif olarak rol almaktadırlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Modern anlamda farmakolojik olarak üretilen ilaçların etken maddelerinin en az %25'i bitkilerden elde edilmektedir. Ayrıca, sentetik olarak üretilen birçok ilacın etken maddeleri de ilk defa bitkilerden izole edilen kimyasalların yapı benzerleridir. İlaç elde edilen bitkilere olan talep; düşük maliyetli olması, yan etkilerinin olmaması, toksik etkilerinin azlığından dolayı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde artış göstermektedir (Sekar ve Kandavel, 2010).

Tıbbi bitkiler birçok hastalığa karşı kullanılabilen bileşimlerin doğal kaynağıdır (Vital ve ark., 2010). O nedenle günümüzde sentetik antioksidan ve koruyuculara alternatif olarak, yeni bitkisel materyallerin doğal antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini keşfetme çalışmaları çok ilgi çekmektedir (Tomaino ve ark., 2005). Hava kirliliği, katkı maddeleri, bilinçsiz beslenme ve hareketsizlik gibi nedenler canlı vücudunda serbest radikal adı verilen maddelerin oluşumuna yol açmaktadır. Canlı organizmaların biyolojik bütünlüklerini koruyabilmek için, endojen ve ekzojen kaynaklı radikallere karşı, antioksidan adı verilen birçok savunma mekanizmasına sahip oldukları; serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulmasıyla oksidatif stresin oluştuğu; ve sonrasında ortamdan uzaklaştırılmayan radikallerin oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir (Yılmaz İ, 2010). Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda, organizmanın ekzojen antioksidanlarla desteklenmesi oksidatif stres oluşumunu engelleyebilmektedir. Ekzojen antioksidanlar; çoğunlukla gıdalarla ve bazı preparatlarla alınabilen; antioksidan sistemi doğrudan/dolaylı olarak destekleyen moleküllerdir. Bundan dolayı gıdalardaki antioksidan etkili bileşenlerin miktar ve aktivite yönünden değerlendirilmesi önemlidir (Büyüktünel E, 2013).

Gün geçtikçe, bakterilerin mevcut antibiyotiklere geliştirmekte oldukları direnç artmaktadır. Diğer taraftan çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizma çeşitliliği de artmakta olup, sebep oldukları enfeksiyonun tedavisi daha güç hale gelmektedir. Bu nedenle ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmekte ve bazı geleneksel bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır (Yarnell ve Abascal, 2004). Dünyanın her yerinde yetişen birçok bitkinin kök, gövde, yaprak, çiçek, kabuk, meyve gibi dokuları antioksidan kapasite ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanılmış ve halen kullanılmaya devam etmektedir. Ülkemiz için ekonomik açıdan önemli bir ürün olan Ceviz (*Juglans regia L.*) Juglandaceae ailesine aittir. Ceviz çoğunlukla meyve olarak tüketilmekte olup, yeşil kabukları, yaprakları kozmetik ve ilaç sanayide etken madde, tekstilde ise boyar madde olarak kullanılmaktadır (Beiki ve ark., 2017). Geleneksel tedavide ise yeşil kabukları ya da yapraklarının özellikle venöz yetmezlik ve hemoroit semptomlarının giderilmesinde antidiyaretik, antihelmintik özelliklerinden yararlanıldığı bilinmektedir (Pereira ve ark., 2007). Özellikle genç yeşil yapraklarda fazla miktarda bulunan juglon maddesinin çok güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (Çapanoğlu GE, 2014).

Günümüzde oksidan ve antioksidanların ölçümünde kullanılan metodlar kalorimetrik, floresans yada kemiluminens esaslı yöntemlerdir. Bu ölçümler zaman ve emek isteyen, pahalı, rutin kullanımda zorlayıcı ve kısıtlayıcı yöntemlerdir (Korcan SE ve ark., 2013, Erel O, 2004, Erel O, 2005). Bitkisel kaynaklı antioksidanlar, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler (Nizamlioğlu NM ve Nas S, 2010). Bazen total antioksidanların ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilmektedir. Bu çalışmada da kullanılan ve diğerlerinden farklı olarak tam otomatik kitlerle çalışılan TAK/TOK tayin yöntemi ucuz ve güvenilir bir şekilde ölçüm yapmayı mümkün kılmaktadır (Erel O, 2004, Erel O, 2005).

Bu çalışmada ayrıca, cevizin odunsu iç yaprak ekstraktının antibakteriyel etkileri agar kuyucuk yöntemi kullanılarak test edilmiş (Holder and Boyce, 1994), ekstraktın antibakteriyel yeteneği iki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve bir Gram negatif (*Escherichia coli*) bakteriye karşı belirlenmiştir. Literatürde, gıda endüstrisinde ekonomik açıdan önemli yer tutan ceviz bitkisinin farklı dokuları ile yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Ancak cevizin atık kabul edilen odunsu iç yaprağı ile yapılan benzer bir çalışma yok denecek kadar azdır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1.1. Bitki örnekleri ve ekstraksiyon

Araştırmada Kırşehir ili Kaman ilçesinde doğal yayılış gösteren *Juglans regia L.* türü cevizler, ticari olarak temin edildi. Kuru olan cevizlerin iki ceviz parçasını birbirinden ayıran iç yaprakları (kabuk, perde) çıkartıldı. Normal oda koşullarında önce havan daha sonra blender (Waring 8011 EB) yardımı ile toz haline getirildi (Şekil 1). Güneş görmeyecek şekilde ince bir tabaka halinde serilerek kurutuldu ve çalışma gününe kadar -18 °C'de saklandı.



Şekil 1. *Juglans regia L* iç kabukları

Ekstraksiyon için soksilet cihazı kullanıldı. Toz materyalden 5 gr tartılarak 50 ml çözücü (Etanol) eklendi. Toz haline getirilip kurutulmuş bitki materyali, kartuşlar içinde hazırlanarak soksilet cihazında 60 °C'de, 8 saat süreyle etanol ile ekstrakte edildi. Kaba filtre kâğıdı ile süzülükten sonra ekstraktın çözücüsü 40-45°C'de döner buharlaştırıcıda (Heidolph Hei-Vap Rotary Evaporator) uzaklaştırıldı.

### 2.2. Bakteriyeş suşlar ve antimikrobiyal aktivite tayini

#### 2.2.1 Bakteriyeş suşlar

• Antibakteriyel aktivite için;

Gram pozitif bakteriler;

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Gram negatif bakteriler;

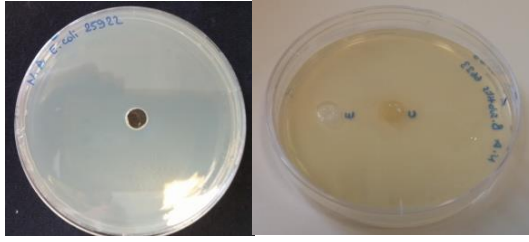
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Mikroorganizmalar Ahi Evran Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi.

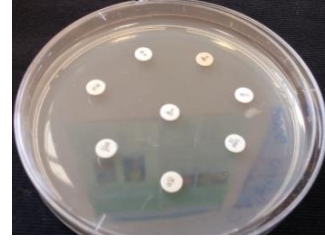
#### 2.2.2. Antimikrobiyal aktivite tayini

Ceviz ara kabuk ekstraktlarının antibakteriyel etkileri agar kuyucuk yöntemi kullanılarak test edildi. (Holder and Boyce, 1994). Nutrient-Broth Agar (NBA) besiyerinde 37 °C'de bir gece süreyle üretilen bakterilerden, ertesi gün 0,5 McFarland bulanıklık değerine göre süspansiyonlar hazırlandı. 5 ml soft agar (%0,5 agar) içerisine 100 µl 0,5 McFarland bulanıklıkta hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan eklenerek petrielerde hazırlanmış olan Müller-Hinton agar (MHA) besiyeri üzerine döküldü. Bir süre kurumaya bırakılan besiyerleri üzerinde 6 mm çapında cam pipet yardımı ile kuyucuklar açıldı (Şekil 2). Mikroorganizma yayılmış NBA besiyerinde kuyular açılıp birinin içine 25 µl ceviz iç yaprağı ekstraktı pipetlenirken; diğerinin içine negatif kontrol olarak ekstraksiyon işleminin çözücüsü olan etanol pipetlendi (Şekil 2). Diğer taraftan Tetracycline (30 mg), Penicilin G (10 U), Sulbactam (10 mcg)+Ampicillin (10mcg), Gentamicin (10 mcg), Rifampin (5 mcg), Teicoplanin (30 mcg), Ciprofloxacin (5mcg), Chlomodphenical (30 mg) içeren steril diskler de dikkatlice MHA besiyerlerine yerleştirilerek pozitif kontrol olarak kullanıldı. 35°C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan zon çapları ölçülerek antibakteriyel aktivite belirlendi.

İnkübasyon sonrasında zon çapı ölçülerek mm cinsinden sonuçlar verildi; duyarlılık durumları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'e göre değerlendirilip [NCCLS, 1998], ceviz iç yaprağı ekstraktının antibakteriyel aktivitesi değerlendirildi.



Şekil.2 Kuyu açılması ve negative kontrol



Şekil 3. Pozitif kontrol

## 2.3. Total Antioksidan/Oksidan Kapasite (TAK/TOK) tayini

### 2.3.1. Total Oksidan Kapasite (TOK)

Ceviz iç yaprağı ekstratının TOK değeri, Rel Assay Diagnostics (RL009; Gaziantep-Türkiye) marka kit ile ölçülmüştür.

Ölçümün prensibi, örnekte bulunan oksidanların ferröz iyon-orto-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlemesi ve ferrik iyonun asidik ortamda kromojen ile mavi-yeşil renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (11). Örnekte bulunan toplam oksidan miktarı ile orantılı olan kompleksin renk şiddeti, spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda ölçülmektedir.

Yöntemin kalibrasyonunda hidrojen peroksit çözeltisi, standart olarak kullanılmaktadır.

#### 2.3.1.1. Çözeltiler

- Çalışma tamponu (Reaktif 1)
- Prokromojen çözeltisi (Reaktif 2)
- Stok standart (800 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı/L) çözeltisi
- Çalışma standart (20.0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı/L) çözeltisi

#### 2.3.1.2. Çalışma

	Örnek	Standart
Çalışma standardı	-	75 µL
Örnek	75 µL	-
Çalışma tamponu	500 µL	500 µL
• Tüplerin OD <sub>1</sub> değerleri, 530 nm dalga boyunda okundu.		
Prokromojen çözeltisi	25 µL	25 µL

Standart ve numune tüpünün OD<sub>2</sub> değerleri, 37°C'de 5 dk inkübasyonu takiben 530 nm dalga boyunda okunmuştur.

#### Hesaplama:

$$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalanı/L} = \frac{\text{OD}_2 \text{ örnek} \times 10}{\text{OD}_2 \text{ standart}}$$

Örnekte tayin edilen TOK, yukarıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Ceviz iç yaprağı ekstratının TOK değeri, litre başına mikromol hidrojen peroksit ekivalanı olarak verilmiştir (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı/L).

### 2.3.2 Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Ceviz iç yaprağı ekstratının TAK ölçümü, Rel Assay Diagnostics (RL010; Gaziantep-Türkiye) marka kit kullanılarak yapılmıştır.

Ölçümün prensibi, örnekte bulunan antioksidanlar tarafından, koyu mavi-yeşil renkli 2,2'-azinobis 3-etil benzotiazolin-6-sülfonat radikalinin renksiz ABTS formuna redüklenmesi esasına dayanmaktadır (12). Antioksidanların miktarlarına ve kapasitelerine bağlı olan ABTS redüksiyonunun derecesi, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda renk farkından kaynaklanan absorbans değişikliği ile tayin edilmektedir.

Yöntem, "Trolox ekivalanı" olarak adlandırılan ve vitamin E analogu olan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilmektedir.

### 2.3.2.1. Çözeltiler

- Çalışma tamponu (Reaktif 1)
- Renkli ABTS radikal solüsyonu (Reaktif 2)
- Standart 1 (0.0 mmol Trolox Ekivalanı/L)
- Standart 2 (1.0 mmol Trolox Ekivalanı/L)

### 2.3.2.2. Çalışma

	Örnek	Standart 1	Standart 2
Çalışma tamponu	500 µL	500 µL	500 µL
Standart 1	-	30 µL	-
Standart 2	-	-	30 µL
Numune	30 µL	-	-

• Tüplerin OD<sub>1</sub> değerleri, 660 nm dalga boyunda okundu.

ABTS radikal solüsyonu	75 µL	75 µL	75 µL
------------------------	-------	-------	-------

- Standart ve örnek tüplerinin OD<sub>2</sub> değerleri, 37°C'de 5 dk inkübasyonu takiben, 660 nm dalga boyunda okunmuştur.

Örnekte tayin edilen TAK, aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. TAK değeri, litre başına milimol Trolox ekivalanı olarak verilmiştir (mmol Trolox ekivalanı/L).

#### Hesaplama:

$$\text{mmol Trolox Ekivalanı/L} = \frac{\Delta\text{OD standart 1} - \Delta\text{OD örnek}}{\Delta\text{OD standart 1} - \Delta\text{OD standart 2}} \times \text{Standart 2 konsantrasyonu}$$

### 2.3.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Son yıllarda, 'OSİ' oksidatif stresin ortaya konulmasında, bir "marker" olarak kullanılmaya başlanmıştır. TOK ve TAK değerlerinin % oranı olarak kabul edilen oksidatif stres indeksi, aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{OSİ (\%)} = \frac{\text{TOK } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalanı/L}) \times 100}{\text{TAK } (\mu\text{mol Trolox ekivalanı/L})}$$

## 3. BULGULAR

### 3.1.1.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

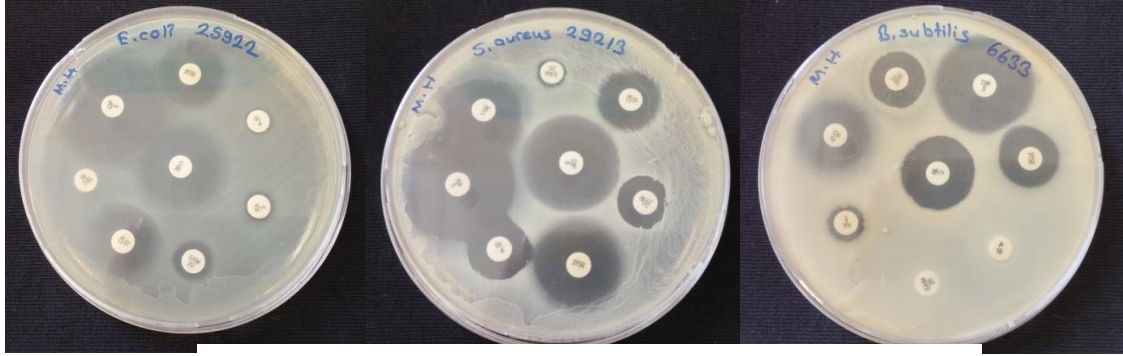
#### 3.1.1 Antibiyogram Bulguları

Bu yöntemde 6 mm çapa sahip steril diskler kullanılmıştır. Tetracycline (30 mg), Penicilin G (10 U), Sulbactam (10 mcg)+Ampicillin (10mcg), Gentamicin (10 mcg), Rifampin (5 mcg), Teicoplanin (30 mcg), Ciprofloxacin (5mcg), Chloramphenicol (30 mg) içeren steril diskler pozitif kontrol olarak kullanılmış; inkübasyon süresinden sonra inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 1'de mm cinsinden verilmiştir (Tablo 1) (Şekil 4).

**Tablo 1.** Antibiyotik emdirilmiş disklerin inhibisyon zon çapları

	SAM	C	RA	P	TE	TEC	CN	CİP
<i>B. subtilis</i> 6633	11	22	R	R	18	R	16	34
<i>S. aureus</i> 29213	R	23	27	15	20	14	17	25
<i>E.coli</i> 25922	R	19	R	R	17	15	17	26

Chloramphenicol:(C), Tetracycline:(TE), Rifampin:(RA), Penicilin:(P), Gentamicin:(CN), Teicoplanin:(TEC), Ciprofloxacin:(CİP), Sulbactam+Ampicillin:(SAM), R:Dirençli



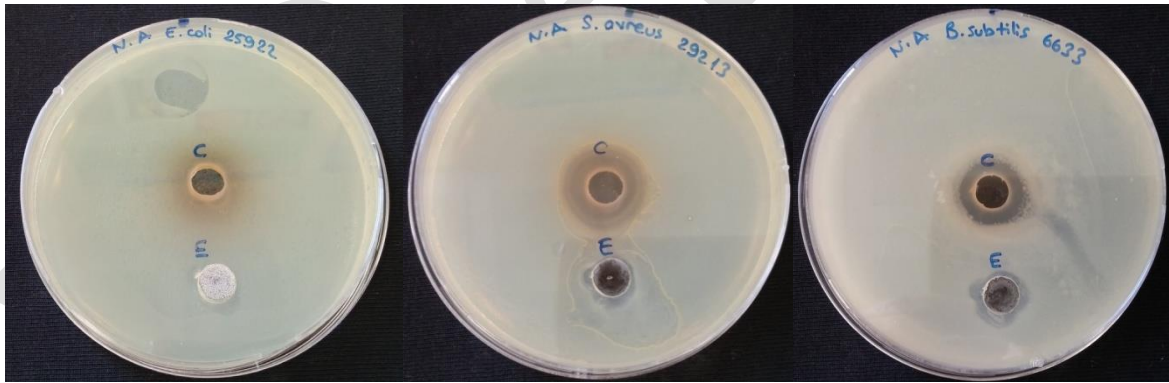
Şekil 4. İnkübasyon sonrası antibiyogram görüntüleri

### 3.1.2 Kuyu Difüzyon Bulguları

Ceviz iç yaprağı ekstraktı ve negatif kontrol olarak kullanılan etanolün inkübasyon süresinden sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 2’de mm cinsinden verilmiştir (Şekil 5).

Tablo 2: Ceviz iç yaprağı etanol ekstraktının inhibisyon zon çapları

	Ceviz iç yaprağı ekstraktı	Etanol
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	16	12
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	12



Şekil 5: İnkübasyon sonrası ceviz iç yaprağı ekstraktı ve etanolün inhibisyon zonlarının görüntüleri

### 3.1.1.3. Total Oksidan Kapasite Bulguları

Tablo 3. Ceviz iç yaprağı ekstraktının TOK değeri

	Ünite ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalanı/L)
Ceviz iç yaprağı ekstraktı	16,642



### 3.2.2.Total Antioksidan Kapasite Bulguları

Tablo 4. Ceviz iç yaprağı ekstraktının TAK değeri

	Ünite (mmol Trolox ekivalanı/L)
Ceviz iç yaprağı ekstraktı	3,889

### 3.2.3. Oksidatif Stres İndeksi Bulgusu

$$OSİ = \frac{TOK \left( \text{umol H}_2\text{O}_2 \frac{\text{ekivalanı}}{\text{L}} \right) \times 100}{TAK (\text{umol Trolox ekivalanı/L})} = 427,92$$

## 4. TARTIŞMA

Günümüzde bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklere dirençli türlerin ortaya çıkması ve seçenekleri sınırlı hale getirmesi çözüm üretilmesi gereken bir problemdir. Bu durum, bakteriyel enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için yeni antibiyotiklere acil ihtiyaç duyulduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Okunade ve ark., 2004).

Bu çalışmada, etanol ile hazırlanan ceviz iç yaprağı ekstraktının antimikrobiyal etkisi iki Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve bir Gram negatif (*Escherichia coli*) bakteri üzerinde disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Negatif kontrol olarak ekstrakt çözgeni olan etanol; pozitif kontrol olarak da Tetracycline (30 mg), Penicilin G (10 U), Sulbactam (10 mcg)+Ampicillin (10mcg), Gentamicin (10 mcg), Rifampin (5 mcg), Teicoplanin (30 mcg), Ciprofloxacın (5mcg), Chloramphenicol (30 mg) standart antibiyotik diskleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası, disk çapı da dahil olmak üzere inhibisyon zon çapları ölçülmüş ve sonuçlar antibiyogram için Tablo1'de; ceviz iç yaprağının etanol ekstraktı için Tablo 2'de, mm cinsinden verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, ceviz iç yaprağı ekstraktının test mikroorganizmaları üzerine farklı şekilde antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. En etkili sonuç *S. aureus* üzerinde görülmüştür. Şöyle ki bu ekstrakt; *B.subtilis* (15mm) ve *S. aureus* (16mm)'da inhibisyon zonu oluştururken; *E. coli* (12mm)'de inhibisyon zonu oluşumuna neden olmamıştır (Tablo 2). Bu sonuçtan hareketle, ceviz iç yaprağı özütünün gram (-) bakterilere kıyasla gram (+) bakterilere daha etkili olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada da olduğu gibi, bitki ekstraktlarının gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkili olduğunu ifade eden başka çalışmalar da mevcuttur (Zoral ve Turgay, 2014). Bu durumun gram (-) bakterilerin hücre duvarının en dışında bulunan lipopolisakkarit tabakadan kaynaklandığı ileri sürülmekte; bu yapının onları daha dirençli kıldığı ifade edilmektedir (Kavak ve ark., 2010).

Cevizin yeşil kabuk ve yaprağının, metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* ile *C. albicans* ve diğer Candida türlerine karşı antimikrobiyal aktivitelerin belirlendiği bildirilmektedir (Yiğit ve ark., 2009).

Bu çalışmada yapılan antibiyogram ölçümlerinde *E.coli'nin*, Sulbactam+Ampicillin, Rifampin, Penicilin antibiyotiklerine dirençli olduğu; en çok Ciprofloxacın'den etkilendiği; daha az olmakla beraber Chloramphenicol'den de etkilendiği belirlenmiştir. *S. aereus*, Sulbactam+Ampicillin hariç bütün antibiyotiklerden etkilenmiş, geniş inhibisyon çapları vermiştir. *B. subtilis*; Rifampin, Penicilin ve Teicoplanin antibiyotiklerine direnç gösterirken, en çok Ciprofloxacın en az Sulbactam+Ampicillin'dan etkilenmiştir (Tablo 1). Antibiyotik disklerinin mikroorganizmaların birçoğuna karşı etkili oldukları meydana gelen inhibisyon çaplarından anlaşılmıştır.

Bitkisel materyallerdeki antibakteriyel özelliklerin, fenolik bileşikler, alkaloidler, flavonoidler gibi antioksidanların varlığına bağlı olabileceği bildirilmektedir (Bandow ve ark., 2003)

Antioksidan maddelerin en önemli kaynağı bitkisel gıdalardır. Bundan dolayı diyetle alınan antioksidanlar genellikle fitokimyasal antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Bitkisel kaynaklı birçok gıda oksidatif zararlara karşı vücut savunmasına katkı sağlar (Güleşçi ve Aygül, 2016). Bitkilerin radikal süpürme aktivitesi, fitokimyasalların doğası ve bunların hidrojen verme eğilimi ile ilişkilidir (Khan ve ark. 2003).

Günümüzde TAK testleri serum, gıda maddeleri ve biyolojik dokuların analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Szeto ve ark., 2002; Percário, 2000; Koch ve ark., 2002). TAK; örnekteki vitaminleri, enzimatik radikal yakalayıcı sistemleri, bilinmeyen antioksidanları ve her çeşit antioksidan etkileşimlerini kapsayan, bütün antioksidanların ölçümüdür. Farklı antioksidanların ayrı ayrı ölçülmesi olası aditif etkileri

göstermede yetersiz kalabilmekte; zaman, emek ve maliyet gerektirebilmektedir. Bu durumlarda total antioksidanların ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilmektedir (Saril ve ark., 2012).

Bu çalışmada ceviz iç yaprağı ekstraktının TOK/TAK ölçümü, Erel ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. TAK yönteminin prensibi örnekte bulunan antioksidanlar tarafından, mavi-yeşil renkli radikalın rensiz formuna redüklenmesi esasına dayanmaktadır. Antioksidanların miktarlarına ve kapasitelerine bağlı olan redüksiyonunun derecesi, spektrofotometrede absorbans değişikliği ile tayin edilmektedir. TOK yönteminin prensibi ise, örnekte bulunan oksidanların ferröz kompleksi ferrik iyonla oksitlemesi ve ferrik iyonun asidik ortamda kromojen ile kompleks oluşturması esasına dayanmakta ve örnekte bulunan toplam oksidan miktarı ile orantılı olan kompleksin renk şiddeti, spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Bu çalışmadaki spektrofotometrik ölçümler sonucunda, ceviz iç yaprağı ekstraktının TOK değeri 16,642 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalanı/L olarak (Tablo 3 ); TAK değeri 3,889 mmol Trolox ekivalanı/L olarak (Tablo 4) tayin edilmiştir. Literatürde bu yöntemle, anne sütünde (Saril ve ark., 2012), bitki çaylarında (Özdatlı ve ark., 2014), kan ve doku örneklerinde (Akcılar ve ark., 2015) total antioksidan/oksidan kapasite tayin eden çalışmalar mevcuttur. Ancak bu ölçümle ceviz iç yaprağının antioksidan durumunu belirleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## 5. SONUÇ

Atık kabul edilen pek çok bitki kısmı potansiyel olarak antioksidan/antimikrobiyal özellikte olabilir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, *Juglans regia L.* meyvesinin bir atığı olan iç odunsu yaprağı antimikrobiyal aktiviteye ve antioksidan etkiye sahiptir. Sonuçlarımızı doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu öngörülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- 1) Njume C ve ark. 2009. An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of Helicobacter pylori Infections. Afr J Pharm Pharmacol, 3: 685-699.
- 2) Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Antimikrobiyal, Antioksidan Aktiviteleri ve Kullanımı. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6 (2): 233-265.
- 3) Sekar S, Kandavel D 2010. Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) and endophytes with medicinal plants-New Avenues for Phytochemicals. J Phytology, 2: 91-100.
- 4) Vital, PG, Velasco, JRN, Demigillo, JM, Rivera, WL. 2010
- 5) Tomaino A ve ark. 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical comparison of some spice essential oils. Food Chemistry, 89, 549-554.
- 6) Yılmaz İ, 2010. Antioksidan İçeren Bazı Gıdalar ve Oksidatif, Stres İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 17 (2): 143-153.
- 7) Büyüktünel E 2013. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal, 17: 93-103.
- 8) Yarnell E, Abascal K 2004. The Leading Publisher in Biotechnology. Alternative & Complementary Therapies Part 2: 10 (5): 277-284.
- 9) Beiki T ve ark. 2017. Evaluation of antimicrobial and dyeing properties of walnut (*Juglans regia L.*) green husk extract for cosmetics. Society of Dyers and Colourists, Color Technol, 134: 71-81.
- 10) Pereira JA ve ark. 2007. Walnut (*Juglans regia L.*) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45: 2287-2295.
- 11) Çapanoğlu GE 2014. Cevizin (*Juglans regia L.*) farklı Kısımlarının ve Ceviz İçeceğinin Sağlıkla İlgili Özellikleri (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- 12) Korcan SE ve ark. 2013. Evaluation of antibacterial, antioxidant and DNA protective capacity of *Chenopodium album*'s ethanolic leaf extract. Chemosphere, 90: 374-379.
- 13) Erel O 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem, 38: 1103-11.
- 14) Erel O 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 37: 277-85.
- 15) Nizamlioğlu NM, Nas S 2010. Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. Electronic Journal of Food Technologies, 5 (1): 20-35.

- 16) Karaarslan D 2010. *Calamintha Nepeta* (L.) Savı. Subsp. *Glandulosa* (Req.) P. W. Ball Türünün Petrol Eteri, Etanol Ve Metanol Ekstrelerinin Antibakteriyel, Antifungal Ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- 17) Holder IA Boyce ST, 1994. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20 (5): 426-429.
- 18) Okunade AL ve ark. 2004. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*, 65 (8): 1017-1032.
- 19) Bandow, JE ve ark. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (3): 948-955.
- 20) Khan MR, Omotoso AD 2003. Antimicrobial activity of extractives of *Sarcocephalus coadunatus*. *Fitoterapia*, 74: 695-698.
- 21) Yang J ve ark., 2014. Effect of solvents on the antioxidant activity of walnut (*Juglans regia* L.) shell extracts. *J. Food Nutr. Res*, 2(9): 621-626.
- 22) Zoral FB, Turgay Ö 2014. Çeşitli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeriğinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin araştırılması. *KSÜ Doğa Bil Derg*, 17 (2): 24-33.
- 23) Kavak DD ve ark. 2010. Pistacia terebinthus extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible -glucuronidase inhibitor. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 64: 167-171.
- 24) Yiğit D ve ark., 2009. Ceviz (*Juglans regia* L.)'in Antimikrobiyel Aktivitesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39 (1-2): 7-11.
- 25) Güleşçi N ve Aygül İ 2016. Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (1): 109-129.
- 26) Saril FN ve ark. 2012. Antioxidant capacity of fresh and stored breast milk: is -80°C optimal temperature for freeze storage?. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25 (6): 777-782.
- 27) Özdatlı Ş ve ark. 2014. Bitki çaylarına bal ilavesinin total antioksidan kapasitesine etkisi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 18: 147-152.
- 28) Akcılar R ve ark., 2015. Effects of Ukrain in Rats with Intestinal Ischemia and Reperfusion, *Journal of Surgical Research*, 195(1): 67-73.
- 29) Szeto YT ve ark., 2002. Total Antioxidant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: Implications for dietary planning and food preservation. *Brit J Nutr.* 87: 55-59.
- 30) Percário S. Oxidative and antioxidant defense changes in acute bronchospasm induced in guinea-pigs. São Paulo, 2000. [PhD Thesis – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP]. 106p (in portuguese).
- 31) Koch TR ve ark., 2002. Total antioxidant capacity is reduced in Crohn's disease. *Nutr Res*, 22: 825-833.

## Effect of Sodium Dodecyl Benzenesulfonate on the Biosorption of Reactive Black 5 by Yeast Cells

Hatice Elçin Özkuzucu<sup>1</sup>, Ekin Demiray<sup>1</sup>, Sevgi Ertuğrul Karatay\*<sup>1</sup>, Gönül Dönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sertugrul@ankara.edu.tr

### Abstract

Reactive Black 5 (RB5) is a reactive textile dye and usage of RB5 creates serious environmental problems. Biosorption of the textile dyes is a cheap and effective alternative to physical or chemical removal methods. Additionally using microorganisms and surfactants together can significantly improve the biosorption capacity via changing the surface tension. Therefore, in this study we investigated the RB5 biosorption by *Candida tropicalis* in the presence of sodium dodecyl benzenesulfonate (DBS). Important parameters on biosorption such as pH (2, 4, 6, 8, 10) and surfactant concentration (0.05 mM, 0.5 mM and 5 mM) were tested. When DBS and *C. tropicalis* were used together, the maximum biosorption was calculated as 98.2% in the presence of 0.05 mM surfactant and 91.2 mg/L initial RB5 concentration at pH 2. It was also observed that increasing surfactant concentrations caused lower biosorption yields.

**Keywords:** *Candida tropicalis*, DBS, surfactant, Reactive Black 5, biosorption.

### INTRODUCTION

Reactive dyes are widely used chemical substances in paper, textile, plastics and cosmetic industries and they are important pollutants for various ecosystems. They are left in different wastewaters and inevitably affected the water or soil sources. Due to their properties, these dyes can remain food, soil or aquatic environments. Because of reactive dyes are harmful for living organisms, their removal from different environments has crucial importance. Removal of these reactive dyes generally regarded as difficult because of their synthetic and aromatic nature. Among the bioremoval techniques, biosorption considered as one of the most effective one that have been successfully applied for colour removal (Aksu et al., 2010).

Reactive Black 5 (RB5) is a anionic azo dye and has one or more N=N bonds. RB5 used in such as textile, leather and other industries. Widespread usage of azo dyes including RB5 occurs serious problems such as reducing reoxygenation of water sources, disturbing photosynthetic activities and aesthetic problems. This situation causes toxic effects for organisms. Therefore it is very important to remove azo dyes including RB5 from aquatic and soil environments. Different removal approaches such as chemical, electrochemical, physical or biological has been employed for the treatment of azo dyes. Among these techniques adsorption of dyes onto surface of the microorganisms is a cheap and effective method for dye removal (Capar et al., 2006; Patel and Suresh 2008).

Surfactants are surface active molecules and they reduce the surface tension of some certain liquids. The most significant feature of the surfactants is being have both hydrophilic and hydrophobic structure. Surfactants can be divided into four groups depending on the charge of the their hydrophilic parts. Non-ionic, anionic, cationic and zwitterionic. Surfactants have a broad usage spectrum in mining, detergent chemistry, pharmaceutical, and petroleum industries. On the other hand they are important elements for some study area such as molecular biology. Surfactants also increased the adsorption capacity of the absorbent significantly (Simoncic and Kert 2008).

Sodium dodecylbenzenesulfonate (DBS) is an anionic surfactant which is widely used for dye removal or some other processes. In some previous reports, it has been demonstrated that DBS is suitable agent for dye removal and biosorption (Lu et al., 2003; Cestari et al., 2009).

Microorganisms such as yeasts, fungi or bacteria have been widely used for dye removal. They reproduce cheaply and they can be obtained from waste by products. Therefore usage of microorganisms is beneficial for dye removal (Santos et al., 2018).

By this context in this study we investigated the effect of sodium dodecyl benzenesulfonate on the Biosorption of Reactive Black 5 by *C. tropicalis*. Some important parameters on biosorption such as pH or initial surfactant concentration were optimized.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganisms and Growth Conditions**

*C. tropicalis* was obtained from Ankara University Culture Collection and cultivated in the molasses medium. Stock solution of the molasses were prepared as 300 g/L. Stock molasses solution were hydrolysed in 1.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at the 121 °C for 15 minutes. Stock molasses was diluted to 8% and pH was adjusted to 5. 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> were added to molasses medium for growth of microorganisms.

### **Preparation of the biomass, dye and surfactant for Biosorption**

For the experiments, *C. tropicalis* was cultivated for 72 hours in the molasses medium. The biomass was centrifuged at 6000 rpm. for 10 min. After that step, biomass was dried in the oven at 70 °C overnight and 1 g/L dried biomass was used for biosorption studies.

### **Biosorption Experiments**

Biosorption studies were carried out in 150 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of working solutions. The flasks were continuously agitated at 100 rpm and 3 mL samples were taken from flasks periodically. Before analysis, samples were centrifuged at 6000 rpm for 10 min and supernatant was analysed for dye concentration. In all experiments, temperature was 25 °C and were performed as triplate.

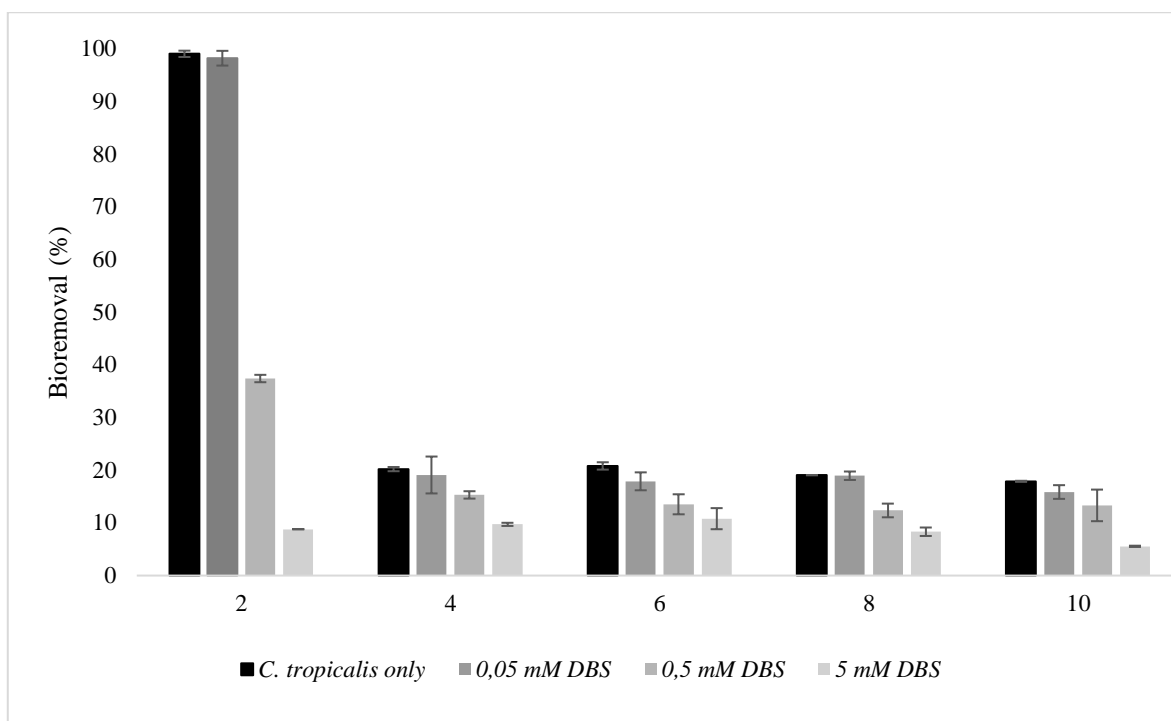
### **Analytical Methods**

RB5 concentrations in the solution was determined by spectrophotometrically at the 600 nm wavelength at spectrophotometer (Shimadzu).

## **RESULTS AND DISCUSSIONS**

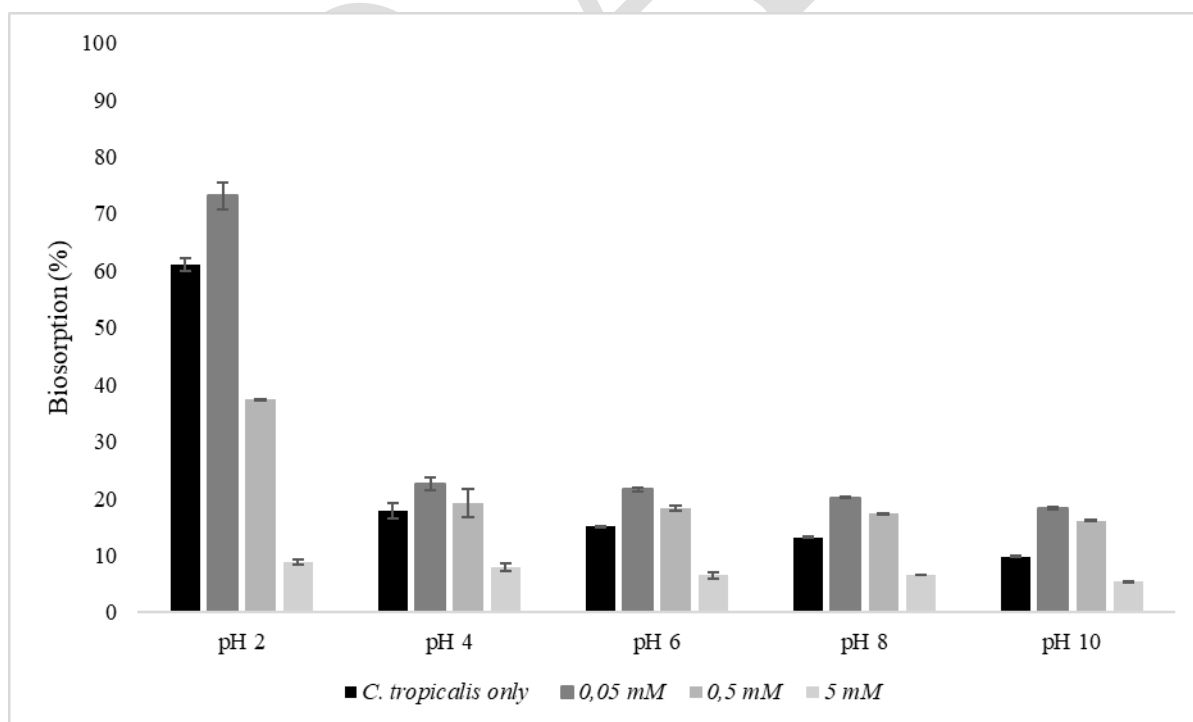
### **Effect of pH on Biosorption**

To investigate the effect of pH and DBS concentration to the biosorption of the RB5, 5 different pH (2, 4, 6, 8, 10) and 3 different DBS concentrations (0.05, 0.5, 5 mM) were tested in the presence of 91.2 mg/L RB5. Only *C. tropicalis* and RB5 contained Erlenmeyers were used as a control. The data at the figure 1 depicts that the highest biosorption yield were 98.2% at the pH 2 and 0.05 mM DBS. Increasing pH values resulted with significantly lower biosorption yields. Yeast cells removed 19.09%, 17.89%, 18.95% and 15.86% RB5 respectively at the pH 4, 6, 8 and 10 in the presence of 0.05 mM DBS. It was also observed that increasing surfactant concentrations leded to decreasing in the biosorption. For instance, at pH2 yeast cells removed 37.4% RB5 in the presence of 0.5 mM DBS. Biosorption yield decrease to 8.8% when 5 mM DBS was used. Therefore 0.05 mM DBS and pH 2 were selected for further studies. Similar observation to our results was reported by Kodal and Aksu (2017). This situation may related with in acidic conditions, functional groups that have nitrogen are positively charge. On the other hand hydroxyl groups negatively charge. Thus dye can bind the biosorbent and surfactant by electrostatic forces (Hubbe et al., 2012).



**Figure 1.** Effect of pH and 3 different DBS concentrations to the biosorption of RB5 ( $C_0$ :91.2 mg/L, T: 25 °C, Agitation speed: 100 rpm).

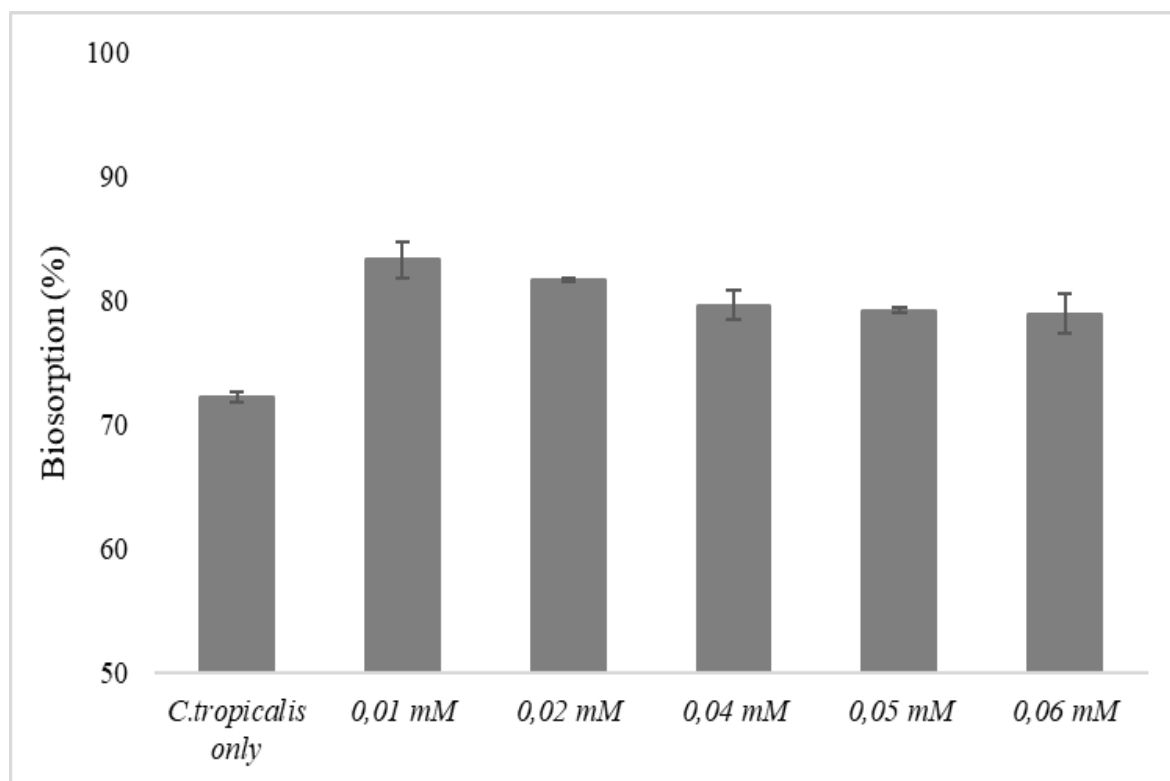
Figure 2 shows the biosorption yields of 200 mg/L RB5 in the presence of different concentrations of DBS. It can be clearly seen that when the initial RB5 concentration increased, biosorption yields decreased. Interestingly only yeast cells and RB5 contained group remove 61.1% dye at pH 2, however this value was 73.1 % when 0.05 mM DBS was used.



**Figure 2.** Effect of pH and 3 different DBS concentrations to the biosorption of RB5 ( $C_0$ :187.3 mg/L, T: 25 °C, Agitation speed: 100 rpm).

### Effect of DBS Concentrations on Biosorption

Because of higher DBS concentrations than 0.05 mM and resulted lower biosorption yields, different DBS concentrations of DBS (0.01, 0.02, 0.04 and 0.06 mM) were tested in the presence of 200 mg/L RB5. As a control group, only DBS and RB5 contained samples were used. Biosorption yields of only DBS contained samples were significantly lower than both DBS and yeast contained samples. The highest biosorption yields were observed at in the presence of 0.01 mM as 83.2%. Biosorption values for *C. tropicalis* 0,01 mM, 0.02 mM, 0.04 mM, 0.05 mM and 0.06 mM were 72.1%, 83.2%, 81.6%, 79.5%, 79.2% and 78.9% respectively.



**Figure 2.** Effect DBS concentrations on the biosorption of RB5 ( $C_0$ :193.4 mg/L, pH 2, T: 25 °C, Agitation speed: 100 rpm).

### CONCLUSION

In this study, the effect of the anionic surfactant DBS on the biosorption of the anionic dye, Reactive Black 5 by *C. tropicalis* was examined. RB5 is pollutant often found in wastewater produced by the textile industry. Biosorption experiments were carried out using a batch system at 25 °C. The adsorption of the dye was measured as a function of the initial pH and the initial concentration of RB5 and DBS. The highest removal of dye was 98.2% in the presence of 91.2 mg/L initial RB5 and 0.05 mM DBS. Lower biosorption yields were observed at the higher initial dye concentrations. In summary we have found the *C. tropicalis* is suitable biosorbents for reactive dye biosorption such as RB5. It was also observed that anionic surfactants at the low concentrations can be effective against anionic dyes at low pH values.

### REFERENCES

- Aksu, Z., Ertuğrul, S., Dönmez, G. 2010. Methylene Blue biosorption by *Rhizopus arrhizus*: Effect of SDS (sodium dodecylsulfate) surfactant on biosorption properties. *Chemical Engineering Journal*, 158(3), 474-481.
- Capar, G., Yetis, U., Yilmaz, L. 2006. Membrane based strategies for the pre-treatment of acid dye bath wastewaters. *Journal of hazardous materials*, 135(1-3), 423-430.
- Cestari, A. R., Vieira, E. F., Vieira, G. S., da Costa, L. P., Tavares, A. M., Loh, W., Airoidi, C. 2009. The removal of reactive dyes from aqueous solutions using chemically modified mesoporous silica in the presence of anionic surfactant—The temperature dependence and a thermodynamic multivariate analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 307-316.

Hubbe, M. A., Beck, K. R., O'Neal, W. G., Chsharma, Y. 2012. Dye biosorption: review. *Bioresources*, 7(2), 2592-2687.

Kodal, S. P., Aksu, Z. 2017. Cationic surfactant-modified biosorption of anionic dyes by dried *Rhizopus arrhizus*. *Environmental technology*, 38(20), 2551-2561.

Lu, Y., Zhu, X., Peng, Y. 2003. The removal of methyl violet from water by solvent sublation. *Separation science and technology*, 38(6), 1385-1398.

Patel, R., Suresh, S. 2008. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, 99(1), 51-58.

Santos, B. A. P. D., Cossolin, A. S., Reis, H. C. O. D., Castro, K. C. D., Silva, E. R. D., Pereira, G. D. M., Morais, E. B. D. 2019. Baker's yeast-MnO<sub>2</sub> composites as biosorbent for Malachite green: An ecofriendly approach for dye removal from aqueous solution. *Revista Ambiente & Água*, 14(1).

Simončič, B., Kert, M. 2008. Influence of the chemical structure of dyes and surfactants on their interactions in binary and ternary mixture. *Dyes and pigments*, 76(1), 104-112.



## Bioethanol Production from Turnip Juice Discards as a Raw Material by an Osmotolerant Yeast

Ekin Demiray<sup>1</sup>, Sevgi Ertuğrul Karatay\*<sup>1</sup>, Gönül Dönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sertugrul@ankara.edu.tr

### Abstract

Environmental concerns that derived from fossil fuel consumption, force the researchers to investigate renewable alternative energy sources. Among them bioethanol considered as the most promising one because of its cheapness, renewable and eco-friendly properties. Therefore, in this present study bioethanol production capacity of turnip juice discards, which are abundant by-products of beverage industry of Turkey, was determined. In all experiments an osmotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, was used. In order to optimize the bioethanol production, effects of different pretreatment methods, initial biomass loading, nitrogen sources, mineral salts and carbon sources on the bioethanol production were investigated. The highest ethanol concentration was obtained as 7.25 g/L in the presence of 100 g/L turnip juice discards that supplemented with 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L yeast extract and 24 g/L molasses at pH 5. Under these conditions, *K. marxianus* reached the 64% of the theoretical ethanol yield. These results shows that turnip juice discards are suitable raw materials for renewable energy sources and *K. marxianus* is a promising agent for ethanol production.

**Keywords:** Turnip Juice Discards, Yeast, Bioethanol, Second generation biofuel

### INTRODUCTION

Because of exhausting of the fossil fuels, scientist investigate the alternative energy sources such as solar, wind, geothermal or biomass (Bai et al., 2008). In the 17th sustainable development report published by the United Nations in 2016, it was stated that the use of reliable, sustainable and environmentally friendly energy resources for all was adopted as the 7 th objective and this would be achieved by limiting the use of fossil fuels, which account for 60% of total greenhouse gas emissions (United Nations 2015).

Among these sources, ethanol or bioethanol is one of the most promising one with its cheap and environmentally friendly properties (Wang et al., 2017). Bioethanol can be divided into 4 different types according to the type of raw material produced. In the first generation, there are materials such as wheat and corn consumed as direct food. Second generation bioethanol is produced from non-consumable wastes as food. Lignocellulosic raw materials such as pomegranate peels, wheat straw, orange peel or turnip juice discards are the source of second-generation bioethanol production (Jönsson et al., 2013; Robak and Balcarek 2018). Macro and microalgae are the source of third generation bioethanol. In the fourth generation, genetically modified organisms or raw materials are used (Phwan et al., 2018; Ko and Lee, 2018).

Turnip juice discards are one of the by-product of the beverage industry of Turkey. Turnip juice contains mainly turnip and black carrots. After turnip juice production, these turnips and purple carrots dispose as wastes. However, these raw materials are suitable for evaluation in the production of second-generation bioethanol due to their components such as fermentable sugars, cellulose and hemicellulose (Tangüler and Erten, 2012).

Therefore, in this study we investigated the bioethanol production capacity of the turnip juice discards. Bioethanol producer *K. marxianus* used for fermentation experiments. Some important parameters such as pretreatment conditions, initial raw material loading, effects of nitrogen, mineral salts and different carbon source (molasses and carrot pomace) to the bioethanol production were optimized.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms and Raw Materials

*K. marxianus* was obtained from Ankara University Culture Collection. Turnip juice discards were supplied from Kilikya Şalgam Co. Adana/Turkey. Turnip juice discards were dried in the oven at 70 °C overnight.

### Pretreatment of Turnip Juice Discards

Turnip juice discards were first subjected to three different pretreatments in the presence of 50 g/L initial raw material (15 minutes at 90 °C, 60 minutes at 90 °C and 15 minutes at 121 °C). After that, 3 different raw material loadings were (50 g/L, 100 g/L and 150 g/L) tested for bioethanol production. Hydrolysates were then filtered and pH was adjusted to 5 with sodium hydroxide (NaOH) and autoclaved again for sterilization and fermentation.

### Supplementation of Different Nitrogen, Metal Salts and Agricultural Wastes

3 g/L peptone, 1 g/L yeast extract, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added turnip juice discard medium for determining the effect of nitrogen sources and mineral salts on ethanol production.

Two different carbon sources (molasses and carrot pomace) were used separately to determine the effects of different carbon sources on ethanol production in turnip juice discards. 300 g/L molasses and 300 g/L carrot pomace were first autoclaved at 121 °C for 15 minutes in the presence of 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for stock solutions preparation. At the time of the experiment, these raw materials were diluted to 12 g/L and 24 g/L.

### Analytical Methods

Before the ethanol, sugar and microbial growth determinations, 3 mL of the samples were centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes. Ethanol concentration was determined by Gas Chromatography (GC-2010/Shimadzu). The flame-ionizing detector (FID) and 0.25 mm. diameter and 60 meters long RTX-Wax (RESTEK) column were used. Nitrogen was the carrier gas. FID detector uses dry air and hydrogen. 1 µL of the sample was injected into the injection port at a temperature of 140 °C. The temperature of the FID detector is set to 160 °C, and the starting temperature of the column is set to 50 °C and adjusted to 150 °C in 19 minutes. The column flow was adjusted to 200 kPa and the column flow was 1.86 mL / min (Wistara et al., 2016).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of Different Pretreatment Methods on Bioethanol Production

In order to investigate the effect of different pretreatments, 3 different turnip juice discard medium were prepared. Results were shown in Table 1. The highest sugar rate were detected in turnip juice discard medium which hydrolysed with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 121 °C at 1 atm for 15 min as 7.15 g/L. 1.73 g/L and 2.99 g/L reducing sugar were detected when turnip juice discard hydrolysed with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 90 °C for 15 min and 90 °C for 60 min respectively. It was also observed that *K. marxianus* reached the maximum ethanol titer at the end of the 6 hours as 0.71 g/L in the presence of turnip juice hydrolysate pretreated with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 121 °C, 1 atm for 15 min. Application of high pressure and temperature is an effective method for the pre-treatment of raw materials. In this method, most of the hemicellulose and a portion of the cellulose are hydrolysed with lignin, and some reducing sugars release into the fermentation medium. In this way, microorganisms can use these sugars for bioethanol production. Therefore, autoclaving of the raw material as a pre-treatment method in bioethanol production has become a commonly used method. In a study about comparing the different pretreatment methods for ethanol production from two different grape pomace, it was reported that the acid / autoclave pretreatment gave the highest total carbohydrate ratio (58% and 84%) (Corbin et al., 2015). In another study, the effect of four different pre-treatment methods for ethanol production from wheat straw was investigated. In the group using acid / autoclave method, glucose and xylose concentrations before fermentation were 7 g/L and 1 g/L, respectively (Toquero and Bolado, 2014). Thus for further studies, turnip juice discards were hydrolysed with 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 121 °C at 1 atm for 15 min

**Table 1.** Effect of different pretreatment methods to the ethanol production of *K. marxianus* (Initial turnip juice discard loading: 50 g/L, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Pretreatment Method	Initial Sugar (g/L)	Ethanol (g/L)		
		Time		
		6 h	12 h	24 h
90 °C 15 min	1.73±0.28	0.52	0.44	0.23
90 °C 60 min	2.99±0.12	0.57	0.32	0.30
121 °C 1 atm 15 min.	7.15±0.34	0.71	0.60	0.42

### Effect of Biomass Loading on Bioethanol Production

Usage of the optimal biomass loading is a crucial step for bioethanol production. In order to determine the effect of the initial turnip juice discards amount on ethanol production, three different (50, 100, 150 g/L) media were prepared. These media were tested for fermentation of *K. marxianus*. In the experiments, it was observed that *K. marxianus* produced the highest ethanol in the presence of 100 g/L initial turnip juice discard loading. However, it was determined that ethanol production decreased in the presence of 50 g/L and 150 g/L. It was also observed that the highest ethanol production time was increase from 6 hours to 12 hours in *K. marxianus*. In this set of experiments, the highest ethanol concentration was 2.61 g/L in the presence of 100 g/L biomass loading. The highest amount of ethanol in 50 g/L was found as 0.67 g/L. In the presence of 150 g/L initial turnip juice discard loading, 1.85 g/L ethanol was determined (Table 2).

In the pretreatment of lignocellulosic biomass with dilute acid, the usage of 100 g/L of initial raw material generally gives the best results (Jung et al. 2014). Therefore, in the literature, there are many studies on the production of ethanol with the initial raw material amount of 100 g/L. In one of these studies, Shavanas et al (2011) reported that the 100 g/L of initial biomass yielded the highest ethanol production when using kassava biomass in bioethanol production. In another study Narra et al (2015) found that the usage of 100 g/L wheat straw and sugar cane wastes caused higher ethanol production rates than usage of same material as 50 g/L and 150 g/L concentrations. Moreover Das et al (2016) found that acid pretreated 100 g/L water hyacinth biomass had the highest reducing sugar content. Therefore, for further studies, 100 g/L initial turnip juice discard loading was selected.

**Table 2.** Effect of Initial Turnip Juice Discard Loading on Ethanol Production

Initial Turnip Juice Discard Loading (g/L)	Ethanol (g/L)		
	Time		
	6 h	12 h	24 h
50	0.67 ±0.0	0.58 ±0.0	0.41 ±0.0
100	2.25 ±0.2	2.61 ±0.1	2.34 ±0.0
150	1.85 ±0.2	1.80 ±0.1	1.51 ±0.0

### Effects of Nitrogen Sources and Mineral Salts on Ethanol Production

Addition of the nitrogen sources and metal salts to the fermentation medium has positive effects on the bioethanol production. Therefore, two different media were prepared in order to observe the effect of different supplementation on the ethanol production. 100 g/L turnip juice discard was used to investigate the effects of different media components on ethanol production. Medium 1 were prepared with 100 g/L turnip juice discard,

3 g/L peptone, 1 g/L yeast extract. On the other hand medium 2 contained 100 g/L turnip juice discard, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1 g/L yeast extract. In the experiments, it was observed that both media increased ethanol production in *K. marxianus*. However, it has been seen that the medium has a higher ethanol production than medium 1. In medium 2, the maximum ethanol production in *K. marxianus* was 3.12 g/L. In Medium 1, the highest ethanol concentration of *K. marxianus* determined as 2.66 g/L. Ethanol concentrations produced in the control medium, medium 1 and 2 was shown in Table 3.

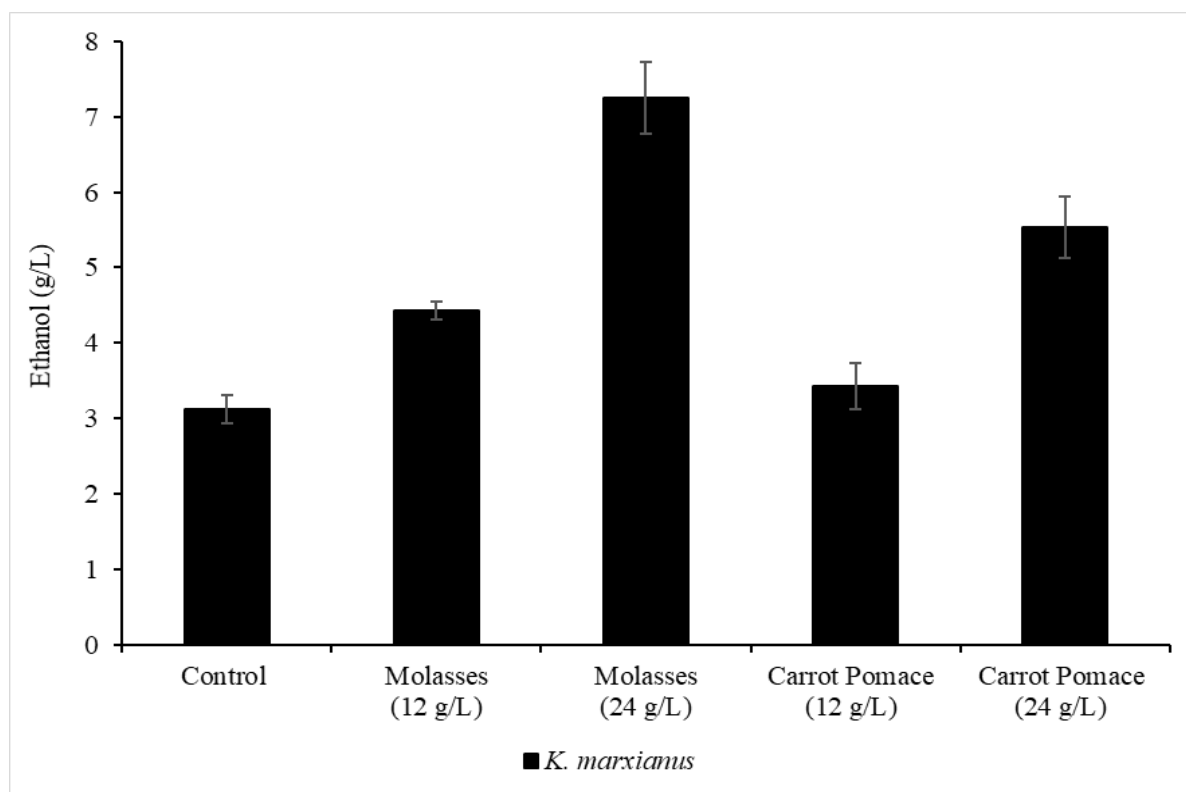
Studies in the literature show that the addition of nitrogen and mineral salts to the fermentation medium increases ethanol production. For instance, Nasir et al (2017) investigated the ethanol production from sugar cane molasses in *S. cerevisiae* strains resistant to environmental stress factors and found the highest ethanol production in the KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> supplemented group. In a study, which investigated the effects of magnesium on the production of ethanol from biomass, it was found that the addition of 40 mg magnesium increased the production of ethanol by *S. cerevisiae* (Pejin et al., 2015). Both medium 1 and 2 increased the production of ethanol in *K. marxianus*, higher ethanol amounts were observed in medium 2, by this reason, further studies were carried out with medium 2.

**Table 3.** Production of ethanol in turnip juice discards containing different media components (pH: 5, 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w/v)) Control: 100 g/L turnip juice discards. Medium: 1: 100 g/L turnip juice discard, 3 g/L peptone, 1 g/L yeast extract. Medium 2: 100 g/L turnip juice discard, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L yeast extract).

Time (hour)	Ethanol (g/L)		
	Control	Medium 1	Medium 2
6	2.25 ±0.2	2.46 ±0.0	2.65 ±0.1
12	2.61 ±0.1	2.66 ±0.2	3.12 ±0.2
24	2.34 ±0.0	2.36 ±0.1	2.81 ±0.0

### The Effect of Different Agricultural Wastes on Ethanol Production

In this part of the study, effects of different additive carbon sources (molasses and carrot pomace) on bioethanol production were investigated. According to the results, it was observed that both molasses and carrot pomace increased ethanol production. However, the highest ethanol concentrations was reached for *K. marxianus* in the presence of 24 g/L molasses. This group was followed by a 24 g/L carrot pomace contained turnip juice discard medium. In the study, the highest ethanol concentration was determined in *K. marxianus* as 7.25 g/L in the presence of 100 g/L turnip juice discard and 24 g/L molasses. Moreover, *K. marxianus* produced 5.41 g/L ethanol in the presence of 100 g/L turnip juice discard medium supplemented with 24 g/L carrot pomace. Ethanol production of the same microorganism in the presence of 100 g/L turnip juice discard and 12 g/L molasses was 4.34 g/L. In the presence of 100 g/L turnip juice discard and 12 g/L carrot pomace, *K. marxianus* produced 3.32 g/L ethanol (Figure 1). Unlike the nitrogen sources and mineral salts, molasses and carrot pomace also contain fermentable sugars. Therefore, the increase in ethanol concentrations due to the addition of these raw materials to turnip juice discard is not surprising.



**Figure 1.** The effect of different carbon sources on the production of ethanol in *K. marxianus* containing 100 g/L turnip juice discard (Control: 100 g/L turnip juice discard, 0.3 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g/L  $KH_2PO_4$ , 1 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 1 g/L yeast extract, pH 5, 1%  $H_2SO_4$  (w/v)).

## CONCLUSION

In this study, turnip juice discards which are important agricultural by-products of turnip juice industry turned into ethanol effectively by *K. marxianus*. The highest ethanol concentration was determined as 7.25 g/L when 100 g/L turnip juice discard medium supplemented with 24 g/L molasses. As a result, turnip juice discards are suitable feedstocks for ethanol production.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ankara University Research Foundation. Project Number: 17L0430007.

## REFERENCES

- Corbin, K.R., Hsieh, Y.S., Betts, N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., and Burton, R.A 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource technology*, 193; 76-83.
- Das, A., Ghosh, P., Paul, T., Ghosh, U., Pati, B.R., and Mondal, K.C 2016. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech*, 6(1); 70-79.
- Jönsson, L.J., Alriksson, B., and Nilvebrant, N.O 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for biofuels*, 6(1); 16-25.
- Jung, Y.H., Kim, I.J., Kim, H.K., and Kim, K.H. 2013 Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 132; 109-114.
- Ko, J.K., and Lee, S.M 2018. Advances in cellulosic conversion to fuels: engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. *Current opinion in biotechnology*, 50; 72-80.
- Narra, M., James, J.P., and Balasubramanian, V 2015. Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. *Bioresource technology*, 179; 331-338.
- Nasir, A., Rahman, S.S., Hossain, M.M., and Choudhury, N 2017. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7(1); 76-91.

- Pejin, J.D., Mojović, L.V., Pejin, D.J., Kocić-Tanackov, S.D., Savić, D.S., Nikolić, S.B., and Djukić-Vuković, A.P 2015. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel*, 142; 58-64.
- Phwan, C.K., Ong, H.C., Chen, W.H., Ling, T.C., Ng, E.P., and Show, P.L 2018. Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy conversion and management*, 173; 81-94.
- Robak, K., and Balcerek, M 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2); 174-187.
- Shanavas, S., Padmaja, G., Moorthy, S.N., Sajeev, M.S., and Sheriff, J.T. 2011 Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes. *Biomass and Bioenergy*, 35(2); 901-909.
- Tanguler, H., and Erten, H 2012. Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish fermented beverage. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1); 36-41.
- Toquero, C., and Bolado, S. 2014 Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource technology*, 157; 68-76.
- United Nations 2015. Affordable and clean energy: why it matters. 87-95.
- Wang, W., Kang, L., Wei, H., Arora, R., and Lee, Y.Y 2011. Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(7); 1139-1149.
- Wistara, N. J., Pelawi, R., and Fatriasari, W 2016. The effect of lignin content and freeness of pulp on the bioethanol productivity of Jabon wood. *Waste and biomass valorization*, 7(5); 1141-1146.

## Estimation of Natural Radioactivity of Some Medicinal or Herbal Plants Used in Kars, Turkey

Gülçin Bilgici Cengiz<sup>1\*</sup>, İlyas Çağlar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas University, Faculty of Arts and Sciences, Physics Department, Kars, Turkey.

<sup>2</sup>Kafkas University, Kazım Karabekir Vocational School of Technical Sciences, Kars, Turkey

\*gulcincengiz@kafkas.edu.tr

### Abstract

In Natural radioactive materials may be existing in the environmental substances that have uses in pharmacy and medicine as health supplements. In this study, natural radionuclides such as <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th, and <sup>40</sup>K were measured in seven medicinal or herbal plants collected from the local market in Kars, Turkey were analysed. All samples were analysed by means of gamma-ray spectrometer using NaI(Tl) detector. The radioactivity concentrations were found to vary in the range of 16.39±2.2 to 32.76 ±3.5 Bqkg<sup>-1</sup> for <sup>226</sup>Ra, 19.74±3.7 to 85.01±5.6 Bqkg<sup>-1</sup> for <sup>232</sup>Th, and from 795.82±9.8 to 1056.28±14.4 Bqkg<sup>-1</sup> for <sup>40</sup>K. Rosehip showed the lowest activity concentrations of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K, while rumex patientia showed the highest activity concentration of <sup>40</sup>K.

**Keywords:** Kars, Medicinal Plants, Natural radionuclides, Activity concentration, Gamma Spectroscopy

### INTRODUCTION

Since the beginning of human history, many plants have been used as nutrients and medicines. Today, some of the alternative medicine methods have been scientifically proven by pharmacists, medicine people and molecular biologists and reintroduced into the lives of people with the approval of the authorities (Chan, 2003). The use of traditional herbal medicines for the treatment of various diseases makes it very important to determine the radionuclide concentrations in such plants (Chandrashekara et al. 2016; Desideri et al., 2010; Sussa et al., 2013). Plants can be affected by radioactive substances in two basic ways. These are direct and indirect contamination. Direct contamination is the accumulation of atmospheric radionuclides in the above-ground parts of the plant. Indirect contamination is the absorption of radionuclides from the soil by the plants' root systems (Badran et al., 2003, Ahmed et al., 2010). The extent to which roots absorb radionuclides from the soil does not only depend on their physiology but also on the processes within the soil (UNSCEAR, 2000). The study of the concentration of radioactivity in plants in the environment is interesting in terms of ecological and plant development under certain geochemical point of view and adaptation conditions and therefore provides information in monitoring environmental radioactivity (Mukhammedov and Tillaeva, 2005; Tetey-Larbi et al., 2013; Fahad et al 2014).

The aim of this study is to determine the natural radioactivity of some selected medicinal plants commonly used in Kars, Turkey and to evaluate the radiological risks associated with the use of these medicinal plants.

### MATERIALS AND METHODS

Kars has the geographical coordinates 40° 14' 34" - 40° 84' 38 " North and 42° 59' 01" - 43° 62' 08" East. At an altitude of 1768 meters above sea level, the city has plateaus, mountains and green spaces. The area of the city is 18557 km<sup>2</sup> and as of 2018 the city population is 288878.

Leaves, flowers and fruits in the form of 2 kg weight, seven medicinal plants were collected from various local markets in Kars. The samples were open-air dried in trays for one week and then oven dried at 100 ° C for 2 to 4 hours in the laboratory. The dried samples were then pulverized with a blender and sieved through a 1 mm mesh to achieve homogeneity. The prepared samples were weighed into powder form and packaged in radon impervious plastic containers (2.5 inch in height and 3 inch in diameter) and encoded. The samples were stored for 40 days to provide balance between <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and their short-lived degradations (Gezer et al. 2019; Günay and Eke, 2019).

Radioactivity measurements were performed by using NaI(Tl) detector based on gamma spectrometry system. The detector was shielded with a 5 cm thickness lead layer to reduce the background due to cosmic rays and radiation nearby the system. Before the measurements an empty plastic sample container was counted in the same manner as the samples for the determination of the background effects. The system was calibrated using a standard reference material (IAEA-375) prepared by IAEA. For determining the activity concentrations in the medicinal plant and herbal plant samples, suitable photopeaks at several energies were taken into account and the appropriate area (ROI) regions were selected for each peak. The activity concentrations of <sup>40</sup>K was

evaluated from the 1460.8 keV gamma line. <sup>226</sup>Ra concentration was found out by measuring the 609.3, 1120.3 and 1764.5 keV gamma-rays from <sup>214</sup>Pb. Similarly, 583 keV and 2614.5 keV gamma-rays from <sup>208</sup>Tl were used to indicate the activity concentration of <sup>232</sup>Th. The samples were counted for a period of 24 h. The output of the detector was analysed using a MCA system connected to PC. Ortec Maestro software was used for analysing the gamma-ray spectra. After measurements and subtraction of the background, the activity concentrations were determined. The activity concentrations of the samples were determined from radionuclide's own energies or gamma-ray photopic of their decay products (Bilgici Cengiz, 2019).

The activity concentrations of the samples are calculated using the expression in equation (1)

$$A = \frac{A_{Net}}{\epsilon_{\gamma} P_{\gamma} t_c M_s} \quad (1)$$

where  $A_{Net}$  corresponds the net peak area of gamma-ray energy,  $\epsilon_{\gamma}$  denotes the absolute efficiency,  $P_{\gamma}$  is the gamma-ray yield per decay,  $t_c$  and  $M_s$  denotes the counting time (s) and dry weight of sample (kg), respectively (Tetty-Larbi et al., 2013).

## RESULTS and DISCUSSION

In this study, the activity concentrations of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K have been determined for 7 kinds of medicinal herb plants in a total of 20 samples. The range of radioactivity concentrations (in dry weight, Bqkg<sup>-1</sup>) of the natural radionuclides (<sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K) in the selected medicinal plants are listed in Table 1. As can be seen from Table 1, the measured values of <sup>226</sup>Ra content range from 16.39±2.2 Bqkg<sup>-1</sup> (rosehip) to 32.76±3.0 Bqkg<sup>-1</sup> (chamomile). The range of <sup>232</sup>Th content in the studied herbs is from 19.74±3.7 Bqkg<sup>-1</sup> (rosehip) to 85.01±5.6 Bqkg<sup>-1</sup> (parsley). <sup>40</sup>K (Bqkg<sup>-1</sup>) were ranged from 795.82±9.8 in rosehip sample to 1056.28 ±14.2 Bqkg<sup>-1</sup> in patience dock sample. Rosehip had the lowest activity concentration of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K, while patience dock had the highest activity concentration of <sup>40</sup>K.

**Table 16.** Activity concentrations of the studied medicinal plant samples.

Common name	Scientific name	Average of activity concentration (in Bq kg <sup>-1</sup> )		
		<sup>40</sup> K	<sup>232</sup> Th	<sup>226</sup> Ra
Patience dock	Rumex patenia	1056.28 ± 14.2	53.09 ± 3.2	17.99 ± 3.2
Stinging nettle	Urtica dioica	999.68 ± 15.0	59.36 ± 4.0	22.82 ± 3.4
Thyme	Thymus	828.30 ± 9.2	60.98 ± 4.2	27.45 ± 5.2
Rosehip	Rosa canina L.	795.82 ± 9.8	19.74 ± 3.7	16.39 ± 2.2
Parsley	Petroselinum sativum	949.23 ± 15.2	85.01 ± 5.6	21.03 ± 4.1
Mint	Mentha longifolia L.	934.87 ± 16.3	64.26 ± 4.1	20.22 ± 3.2
Chamomile	Matricaria chamomilla L.	965.20 ± 18.2	84.82 ± 5.2	32.76 ± 3.5

The high activity potassium concentration recorded for patient dock samples may be due to potassium-rich fertilization in the soil where it grows. Differences in activity concentrations may be due to differences in the geological location of plants and the radiochemical composition of the soils where these medicinal plants are grown or planted. Even in plants grown in the same region, the activity concentration levels of natural radionuclides may vary because some plants also absorb certain elements more than others (Tetty-Larbi et al., 2013).

The important factors that affect the natural radionuclide levels in the studied medicinal plants are their different origins, the plant transfer factors and the levels of radionuclides in different edible portions. For these reasons, the levels of naturally occurring radionuclides have wide ranges. The concentrations of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K activity in the medicinal plants obtained from this study are compared with other published work in Table 3.



**Table 2.** Comparison of the activity concentration of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K in the medicinal plants from this study with those from other countries

Reference	Country	Scientific name of plant	Activity concentration (Bqkg <sup>-1</sup> )		
			<sup>226</sup> Ra	<sup>232</sup> Th	<sup>40</sup> K
<b>This study</b>	Kars/Turkey	Studied medicinal Plants	16.39-32.76	19.74-85.01	736.91-1056.28
<b>Djelic et al. 2016</b>	Serbia	Urtica dioica	14.4±1.7	15.8±1.9	761±9
		Rosa canina L.	3.8±0.9	7.3±1.7	385±5
		Matricaria chamomilla L.	28.6±2.6	9.0±2.1	917±8
		Mentha longifolia (L.)	35.7±3.2	13.9±1.7	649±7
<b>Ahmed et al. 2010</b>	Egypt	Matricaria chamomilla L.	19.62±0.6	11.71±0.4	1170±36
		Petroselinum sativum	42.85±1.5	5.87±0.2	933±29
		Thymus	90.88±3.0	15.68±0.3	1003±31
<b>Najam et al. 2015</b>	Iraq	Thymus	-	-	587.0 ± 44.5
		Matricaria chamomilla L.	-	-	883.3 ± 85.8
<b>Desideri et al. 2010</b>	Italy	Mentha longifolia (L.)	-	-	814
		Thymus	-	-	615
		Matricaria chamomilla L.	-	-	1077
		Rosa canina L.	-	-	703
<b>Chandrashekara et al. 2016</b>	India	Citrus limonum	6.08±0.73	5.67±1.00	1910.00±139.09

Table 2 shows the comparison of the results obtained with other reports, the mean values of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K in urtica dioica are higher than the reported values in Serbia (Djelic et al., 2016). In this study with published data in Egypt by Ahmed et al. (2010) that the average activity concentration values obtained for <sup>226</sup>Ra in petroselinum sativum is lower than their reported value but the average value of <sup>232</sup>Th in this study is higher than their reported value. Similarly, <sup>40</sup>K concentrations in medicinal plants were higher than concentration in medicinal plants from other countries except India (Chandrashekara et al., 2016).

## CONCLUSION

The average values of activity concentrations of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K in medicinal plant were 22.66±3.5, 61.03±4.3, and 932.76±13.4 Bq kg<sup>-1</sup> dry weight, respectively. These results are in good agreement with the published values of other countries. It is very important to determine the level of radioactivity concentrations in medicinal plant to ensure consumer safety. The obtained results provide useful information to carry out a dose assessment due to ingestion of these plants because people use traditional medicinal plants for healing various diseases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported as financial by Kafkas University Scientific Research Projects Coordinator ship (BAP 2017FM25).

## REFERENCES

- Ahmed F, Daif MM, El-Masry NM and Abo-Elmagd M 2010. External and internal radiation exposure of herbal plants used in Egypt. Radiation Effects & Defects in Solids: Incorporating Plasma Science & Plasma Technology, 165 (1):65-71
- Badran HM, Sharshar T, Elnimer T 2003. Levels of <sup>137</sup>Cs and <sup>40</sup>K in edible parts of some vegetables consumed in Egypt. J Environ Radioact, 67:181-190.
- Bilgici Cengiz G 2019. Transfer factors of <sup>226</sup>Ra, <sup>232</sup>Th and <sup>40</sup>K from soil to pasture-grass in the northeastern of Turkey. J Radioanal Nucl Chem, 319: 83-89
- Chan, K 2003. Some Aspects of Toxic Contaminates in Herbal Medicine. Chemosphere, 52: 1361-1371.
- Chandrashekara K, Somashekarappa HM 2016. Estimation of radionuclides concentration and average annual committed effective dose due to ingestion for some selected medicinal plants of South India. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9: 68 -77

- Desideri D, Meli, MA, Roselli, C 2010. Natural and artificial radioactivity determination of some medicinal plants. *Journal of Environmental Radioactivity* 101:751-756.
- Djelic G, Krstic D, Stajic JM, Milenkovic B, Topuzovic M, Nikezic D, Vucic D, Zeremski T, Stankovic M, Kostic D 2016. Transfer factors of natural radionuclides and <sup>137</sup>Cs from soil to plants used in traditional medicine in central Serbia. *Journal of Environmental Radioactivity*, 158-159: 81-88
- Fahad SM, Abdin MJ, Hasan MM, Rahman MO, Islam SMA, Akramuzzaman MM and Russell M 2014. Study of Elemental Profile of Some Medicinal Plants of Bangladesh. *Journal of Nuclear and Particle Physics*, 4, 1-6.
- Gezer F, Turhan Ş, Kurnaz A, Ufuktepe Y 2019. Radiometric characterization of zeolite minerals used in many industries and assessment of radiological risk. *Applied Radiation and Isotopes* 152: 57-63
- Günay O, Eke C 2019. İstanbul-Sarıyer İlçesindeki Bazı Toprak Örneklerinde Cs-137 Konsantrasyonunun Belirlenmesi. *Kırklareli Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi* 5: 29-39
- Mukhammedov S, Tillaeva K 2005. Natural radioactivity of some medicinal plants. *J Nucl Radiat Phys*, 1: 73-6
- Najam LA, Tafi NF, Kitah FH 2015. Estimation of Natural Radioactivity of Some Medicinal or Herbal Plants Used in Iraq. *Detection*, 3: 1-7
- Tetty-Larbi L, Darko EO, Schandorf C, Appiah AA 2013. Natural radioactivity levels of some medicinal plants commonly used in Ghana. *Springerplus*; 2:157
- Sussa FV, Damatto SR, Alencar MM, Mazzilli BP, Silva, Paulo S.C 2013. Natural radioactivity determination in samples of *Peperomia pellucida* commonly used as a medicinal herb. *Journal of Environmental Radioactivity* 116:148-151.
- UNSCEAR, 2000. Sources and effects of ionizing radiation. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly, with scientific annexes, United Nations, New York.

## Expression of transcription factors and miRNAs under salt stress responses in canola (*Brassica napus* L.)

Ebru Derelli Tüfekçi

Cankiri Karatekin University, Yapraklı Vocational School, Department of Field Crops, Cankiri, Turkey

Corresponding author e-mail: [ebru.derelli@gmail.com](mailto:ebru.derelli@gmail.com)

### Abstract

Canola (*Brassica napus*) is one of the most widely cultivated oil crops in the world because of the healthy fatty acid composition of its oil and high protein content of its meal and it (*Brassica napus* L., AACC, 2n=38) is one of the most important oil crops, and also is one of the major economic crops. Salinization of agricultural land has been a major problem worldwide for decades and the high concentration of salt negatively influenced growth as well as water and nutrient use of canola. Transcription factors are integral in linking salt sensory pathways to many tolerance responses. The interaction partners of the transcription factors determine the activation or repression of response pathways and are crucial to understand the regulatory networks that modulate plant defense responses. Plant microRNAs (miRNAs) are a highly conserved class of small, non-coding RNAs that regulate gene expression by post-transcriptional degradation or translational repression. Functional analysis of conserved miRNAs revealed their involvement in multiple biological and metabolic processes in plants. They also regulate plant responses to biotic and abiotic stresses, and the miRNA pathway itself. In current study, to investigate transcription factors and miRNAs that are involved in response to salt stress in *Brassica napus* L. leaf and root tissues through in silico analysis. To assess the complex network of signaling pathways in salinity stress, we further compared the profiles of the TFs and miRNAs in root and leaf. Results of this study it was observed that salt stress induced the transcriptional activity of several TFs and miRNAs further experiments are in progress towards functional validation of TFs and miRNA pathways to provide genetic resources for the improvement of salt-stress tolerance in canola.

**Keywords:** Canola, salt stress, transcription factor, miRNA, transcriptome

### 1. INTRODUCTION

Canola plant (*Brassica napus* L.) is used as a solid, liquid and crude oil in the seeds of 40-45% oil, which contains the oil in the medium and highly unsaturated oleic acid, high boiling point (223°C) due to a good it is one of the best oil plants rich in vitamin E, which shows frying oil feature. Canola is one of the most widely cultivated oil crops in the world because of the healthy fatty acid composition of its oil and high protein content of its meal. Similar to the other crops, *B. napus* is threatened by salt stress, especially in arid and semi-arid countries (or regions). Its salt tolerance mechanism at the molecular level remains unclear, despite of a few recent reports (Xue et al., 2009).

Salinity, which is one of the abiotic stress factors, affects both cultivated soils negatively and causes many negativities in the plants grown in soils under salinity threat. The adverse effects of salt stress are expressed on whole plant levels and appear during all developmental stages, and nearly all the major processes such as photosynthesis, protein synthesis, energy and lipid metabolisms are injured (Bazihizina et al., 2012). Plants have evolved a series of tolerance mechanisms to survive under this unfavorable environmental condition. High soil salt level can result in physiological drought and ionic poisoning in plants by decreasing their water potential and causing the accumulation of excess ions. Plants evolve several mechanisms to cope with salt stress, such as ion homeostasis, osmotic homeostasis, redox equilibrium, growth regulation and others (Zhu, 2002; Jamil et al., 2011). Therefore, it is of great importance to achieve a deeper exploration of salt response mechanisms in plants. These mechanisms are all achieved through corresponding physiological and biochemical changes by regulation of numerous salt-responsive genes and pathways. High concentration of salt negatively influenced growth as well as water and nutrient use of radish. More importantly, radish roots are the first vulnerable organs sensing high salinity in soil and their inhabitation by salinity unfavorably impacts the survival capability of the entire plant (Kitashiba et al., 2014).

The interaction mode among the mentioned genes above, several pathways that potentiate the salt-stress signal have been revealed, such as the salt overly sensitive (SOS) pathway, the calcium-dependent protein kinase (CDPK) pathway and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Zhu, 2003; Ludwig et al., 2004; Nakagami et al., 2004). One such group of genes consists of structural protein-coding genes, including osmoregulatory genes, antioxidant proteins, late embryogenesis abundant (LEA) proteins, and transporters/antiporters. The cloned a major quantitative trait locus encoding a high-affinity K<sup>+</sup> transporter

(HKT)-type sodium transporter that recycles the Na<sup>+</sup> from the shoots to the roots (Ren et al., 2005). Another group of salt-response genes includes transcription factors (TFs), most of the stress-inducible genes are dependent upon their interaction with TFs. Molecular responses, the interaction partners of the TFs determine the activation or repression of response pathways and are crucial to understand the regulatory networks that modulate plant defense responses. They are integral in linking salt sensory pathways to many tolerance responses, such as basic leucine zipper (bZIP), APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF), myeloblastosis protein (MYB), basic helix-loophelix (bHLH), WRKY, heat shock factor (HSF), NAC (NAM, ATAF, and CUC) families and signal-related protein kinases. Furthermore, phytohormone, such as abscisic acid (ABA), ethylene, salicylic acid, and jasmonic acid, also play important roles in stress signaling and adaptation (Xiong and Zhu, 2002; Ma et al., 2006). In spite of the progress that has been made in detailing these processes, the integrated mechanisms of salt tolerance in plants require further exploration.

Plant microRNAs (miRNAs) are a highly conserved class of small (21–24 nucleotides), non-coding RNAs that regulate gene expression by post-transcriptional degradation or translational repression (Liu et al., 2008; Zhang 2015). miRNAs have emerged as important players in post-transcriptional gene regulation. After discovery of miRNAs as a post-transcriptional regulator, it has led to the understanding of the expression behavior of genes at post-transcriptional level (Gupta et al. 2014). In recent years, several studies showed that miRNAs are involved in response to abiotic stress (Sunkar et al., 2007; Eren et al., 2015).

In current study, to investigate transcription factors and miRNAs that are involved in response to salt stress in *Brassica napus* L. leaf and root tissues through in silico analysis. To assess the complex network of signaling pathways in salinity stress, we further compared the profiles of the TFs and miRNAs in root and leaf. Results of this study it was observed that salt stress induced the transcriptional activity of several TFs and miRNAs further experiments are in progress towards functional validation of TFs and miRNA pathways to provide genetic resources for the improvement of salt-stress tolerance in canola.

## 2. MATERIALS and METHODS

### 2.1. RNA-Seq data use in study

Illumina RNA-Seq data for *Brassica napus* L. was obtained from NCBI Short Read Archive (SRA) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under accession number root and leaf tissue PRJNA237675 (Long et al., 2015). The sequenced read length for forward and reverse sequences of paired-end data is 100 bp in length. All readings were obtained in raw sequence data as “.sra” format and converted to “fastq” format for Illumina by the NCBI (National Center for Biotechnology Information) SRA Toolkit. Low-quality reads and those containing adapter were removed from raw data using in-house Perl scripts. All subsequent analyses were performed on high-quality clean data. Transcriptome assembly for cleaned data was performed in Trinity with default parameters (Grabherr et al., 2011). For sequence mapping, all clean reads were aligned to the reference database using the SOAPaligner/SOAP2 v2.20 program (Xie et al., 2014).

### 2.2. Defining transcription factors and miRNAs responsive to salt stress

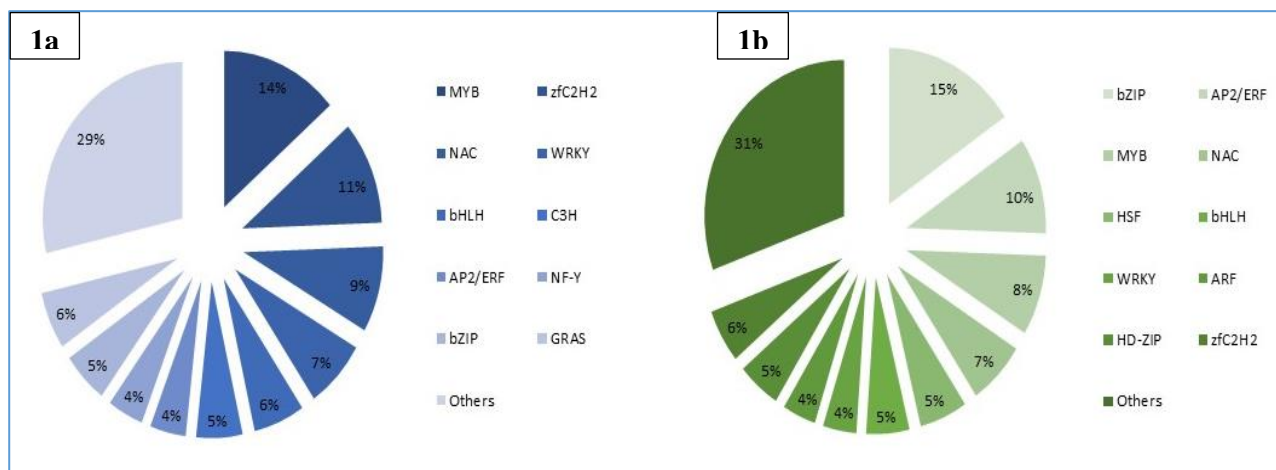
To identify transcription factor (TF) families in all sequences, the BLASTx with a 10<sup>-5</sup> E-value as a cutoff point against Plant Transcription Factor Database (PlantTFDB; <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/downloads.php>). Moreover, the identified TF reads of each sample were mapped to reference file using Bowtie (Langmead ve Salzberg, 2012), redundant sequences were removed on the basis of their chromosome locations and sequence similarity.

For the identification of miRNAs, one of the non-protein encoding transcripts; mapping results for each library, containing the contig files in.fasta format, miRBase (miRBase=the microRNA database, v22.1; <http://www.mirbase.org/>) containing the sequence of approximately 28,645 miRNA families After fasta format sequences of all miRNA hairpins were downloaded, BlastN 2.2.28 algorithm was performed on the previously known miRNA sequences using Bio-Linux 8 software based on E-value 1e-10. Through the miRBase database (Griffiths-Jones et al., 2008), mature sequences of 22-24 bp specific for each miRNA were obtained for the analysis of target genes of miRNAs. And then the target genes of these sequences of miRNAs were detected via the miRU (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) database.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

Transcription factors (TFs) typically regulate the expression of multiple genes in a metabolic pathway, and TFs analysis has played a very important part in stress response research. In this study, we analysed the gene expression of a few important transcript factors (DREB, AP2/ERF, NAC, bZIP, MYB, and WRKY) that were

known to be involved in stress tolerance in plants. We identified different families of transcription factors root and leaf tissues in canola. 44 and 60 TF families were found in RT and LT samples respectively (Figure 1a, Figure 1b).

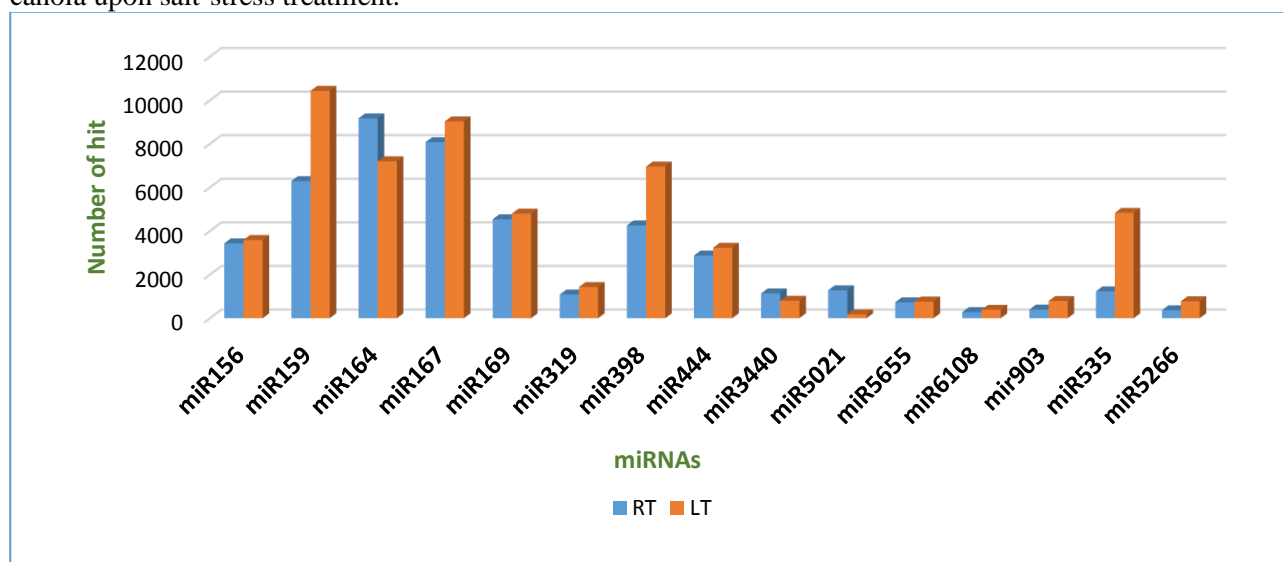


**Figure 1a.** Distribution of transcription factor gene families in root tissue salt stress, **Figure 1b.** Distribution of transcription factor gene families in leaf tissue salt stress

Hit numbers of MYB, C2H2, NAC, WRKY, bHLH, C3H, AP2/ERF, NF-Y, bZIP and GRAS on genome were found to be the highest on RC sample (Figure 1a) while hit numbers of bZIP, AP2/ERF, MYB, NAC, HSF, bHLH, WRKY, ARF, HD-ZIP and C2H2 on genome were detected the highest on RT sample (Figure 1b). A key regulator of salt stress adaptation, the bZIP TF family, was identified by differential screening of salt-inducible transcripts in *A. thaliana* and the other plants (Yang et al., 2009). Similarly our data indicated that bZIP type TFs could also participate in the response to salt stress, or there was another different potential mechanism of salt stress responses regulated by the bZIP type TFs in salt treated root tissues. In plant kingdom, AP2/ERF (APETALA2/ethylene response factor) is a large family of TFs. Our result showed that the AP2/ERF-type TFs have been shown to be significantly involved in the salt stress tolerance mechanisms as in other studies (Wu et al., 2007; Cheng et al., 2013). Sun et al. (2016) reported that the majority of TFs belonging to MYB, NAC, HSF and zinc finger families were predominantly up-regulated, indicating their critical involvement in salt stress response. For example HSFs, involved in the modulation of signal transducers such as protein kinase A, protein kinase C and protein phosphatase, might play a broad role by participating in modulating the expression of many downstream genes in signal transduction pathways during salt stress in plants (Wang et al., 2004). Involvement of WRKY factors in plant salt adaptation were shown for WRKY25 and WRKY33 that increased salt tolerance and ABA sensitivity independent of the SOS-pathway when over-expressed in *A. thaliana* (Jiang and Deyholos, 2009). According to the previous studies and our data analyses, we observed that all these stress-inducible TF families may play more important roles in responding to salt stress (Luo et al., 2013; Deinlein et al., 2014; Shen et al., 2014; Xu et al., 2014). Numerous studies have demonstrated that increasingly suggest integration of the TFs in dynamic network hubs as well as interaction and competition of pathways manifesting complexity of molecular links in stress adaptation.

Many recent studies have revealed that plant miRNAs have pivotal roles in plant response to abiotic stresses, including drought (Zhao et al., 2007; Li et al., 2008), salt (Lu et al., 2008; Zhao et al., 2009), cold (Zhang et al., 2009), oxidative stress (Sunkar et al., 2006) and UV-B radiation (Jia et al., 2009). The miRNAs whose expression level is significantly altered in salt stress condition compared with normal conditions have been well-reviewed in recent works. It has been indicated that a certain number of miRNAs involve in response to salt stress by altering the gene expression (Trindade et al., 2010). Here, we investigated salt-responsive miRNAs of wheat in root and leaf tissues by comprehensive in silico analysis. A total of 44 miRNAs, including both conserved and non-conserved family members were identified as having a significant change in expression upon salt-stress treatment (Figure 2). Similarly, Wang et al. (2014) reported the expression profiles of 31 known and three novel wheat miRNAs upon salt stress. Of those, 11 miRNAs, namely miR156, miR159, miR160, miR164, miR167, miR169, miR319, miR395, miR396, miR444 and miR1134 were in common with our study. Additionally, Gupta et al. (2014) examined the expression of conserved miR159, miR164, miR168, miR172, miR393, miR397 and miR529 under salt stress, which were also found to be differentially expressed in this study. Moreover, for the first time, we identified that 16 miRNAs; miR3440b-3p, miR5021, miR5655,

miR6108f, miR1168.2, miR5049a in root tissue while miR5227, miR5266, miR5083, miR5800, miR3710, miR1074, miR903, miR6222-3p, miR535a and miR482-5p in leaf tissue were differentially expressed in canola upon salt-stress treatment.



**Figure 2.** miRNAs that hit on transcriptome reads of root and leaf tissue (RT: Root tissue, LT: Leaf tissue)

In the present study, we genome-widely identified miRNAs and their expression pattern of salt-responsive miRNAs in roots and leaves of *Brassica napus* L. The majority of the identified miRNAs were significantly responsive to salinity stress in canola. Most of putative target transcripts for these miRNAs in biological process were related to nucleic acid binding (transcription factors) and catalytic activity. These results will greatly contribute to the understanding of post transcriptional gene regulation response to salt stress in canola.

## REFERENCES

- Bazihizina N, Barrett-Lennard EG, Colmer TD 2012. Plant growth and physiology under heterogeneous salinity. *Plant Soil*, 354(1-2):1-19.
- Cheng MC, Liao PM, Kuo WW, Lin TP 2013. The arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulate abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol*, 162(3): 1566-1582.
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci*, 19(6): 371-379.
- Eren H, Pekmezci MY, Okay S, Turktas M, Inal B, Ilhan E, Atak M, Erayman M, Unver T 2015. Hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) root miRNome analysis in response to salt stress. *Ann Appl Biol*, 167(2015): 208-216.
- Griffiths-Jones S, Kaur Saini H, Dongen S, Enright A 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(1): 154-158.
- Gupta OP, Meena NL, Sharma I, Sharma P 2014. Differential regulation of microRNAs in response to osmotic, salt and cold stresses in wheat. *Mol Biol Rep* 41: 4623-4629.
- Jamil A, Riaz S, Ashraf M, Foolad MR 2011. Gene expression profiling of plants under salt stress. *Crit Rev Plant Sci*, 30(5): 435-458.
- Jia X, Ren L, Chen QJ, Li R, Tang G 2009. UV-B-responsive microRNAs in *Populus tremula*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 2046-2057.
- Jiang Y, Deyholos MK 2009. Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol*, 69(1-2): 91-105.
- Kitashiba H, Li F, Hirakawa H, Kawanabe T, Zou Z, Hasegawa Y, Tonosaki K, Shirasawa S, Fukushima A, Yokoi S 2014. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome. *DNA Research*, 21(5): 481-490.
- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK 2008. The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20: 2238-2251.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC 2008. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14:836-843.

- Long W, Zou X, Zhang X 2015. Transcriptome Analysis of Canola (*Brassica napus*) under Salt Stress at the Germination Stage. *PLoS ONE* 10(2): e0116217.
- Lu S, Sun YH, Chiang VL 2008. Stress-responsive microRNAs in *Populus*. *Plant J*, 55: 131-151.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD 2004. CDPK-mediated signaling pathways: specificity and crosstalk. *Journal Experimental Botany*, 55(395): 181-188.
- Luo X, Wu J, Li Y, Nan Z, Guo X, Wang Y, Zhang A, Wang Z, Xia G, Tian Y 2013. Synergistic effects of GhSOD1 and GhCAT1 overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses. *PLoS One*, 8(1): 1-11.
- Ma S, Gong Q, Bohnert HJ 2006. Dissecting salt stress pathways. *Journal Experimental Botany*, 57(5): 1097-1107.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci*, 10(7): 339-346.
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HL 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 37(10): 1141-1146.
- Shen X, Wang Z, Song X, Xu J, Jiang C, Zhao Y, Ma C, Zhang H 2014. Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodeling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 86(3): 303-317.
- Sun X, Xu L, Wang Y, Luo X, Zhu X, Kinuthia KB, Nie S, Feng H, Li C, Liu L 2016. Transcriptome-based gene expression profiling identifies differentially expressed genes critical for salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 35(2): 329-346.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 12:301–309.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/ Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18: 2051-2065.
- Trindade I, Capita C, Dalmay T, Fevereiro M, Santos D 2010. miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231: 705-716.
- Wang B, Sun Y, Song N, Wei J, Wang X, Feng H, Yin Z, Kang Z 2014. MicroRNAs involving in cold, wounding and salt stresses in *Triticum aestivum* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 90-96.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5): 244-252.
- Wu L, Chen X, Ren H, Zhang Z, Zhang H, Wang J, Wang XC, Huang R 2007. ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco. *Planta*, 226(4): 815-825.
- Xiong L, Zhu JK 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* 25(2): 131-139.
- Xu XB, Pan YY, Wang CL, Ying QC, Song HM, Wang HZ 2014. Overexpression of DnWRKY11 enhanced salt and drought stress tolerance of transgenic tobacco. *Biologia*, 69(8): 994-1000.
- Xue X, Liu A, Hua X 2009. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB Rep*, 42: 28-34.
- Yang O, Popova OV, Suthoff U, Luking I, Dietz KJ, Gollack D 2009. The *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factor AtbZIP24 regulates complex transcriptional networks involved in abiotic stress resistance. *Gene*, 436(1): 45-55.
- Zhang B 2015. MicroRNA: a new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot* 66:1749-1761.
- Zhang J, Xu Y, Huan Q, Chong K 2009. Deep sequencing of *Brachypodium* small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics*, 10: 449.
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y 2009. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Mol Biol*, 10:29.
- Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y 2007. Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 585-590.
- Zhu JK 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann Rev Plant Biol*, 53(1): 247-273.
- Zhu JK 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol*, 6(5): 441-445.

## Prenatal ve laktasyon döneminde glifosat-bazlı bir herbisite maruziyet sıçan yavrularında oksidatif strese neden olur

Ruhi Türkmen

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: ruhiturkmen@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada glifosat-bazlı ticari bir herbisit (GBH)'e prenatal ve laktasyon döneminde maruziyetin yenidoğan erkek sıçanların kan, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularının oksidatif stres ile ilişkili parametreleri üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmada kullanılan toplam 6 gebe sıçan; 3 gebe sıçan kontrol grubunda, 3 gebe sıçan GBH grubunda olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Gebe sıçanlara E18'den başlayarak E21. güne kadar günlük subkutan olarak (s.c.) deney grubuna 50 mg/kg/gün GBH ve kontrol grubuna ise taşıt madde FTS (fizyolojik tuzlu su) uygulandı. Daha sonra yenidoğan erkek yavru sıçanlara PND1'den PND21'e kadar 2 mg/kg dozunda GBH ve taşıt madde uygulamasına devam edildi. Son ilaç uygulamadan bir gün sonra PND22'de (laktasyon periyodu, 6 erkek yavru/her grupta) yavru erkek sıçanlar hafif eter anestezi ile sakrifiye edildi. GBH verilen grupta kontrole grubuna göre Kan, karaciğer ve böbrek dokularında indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyi azalırken, malondialdehid (MDA) düzeyleri arttı. Ayrıca GBH; kan, böbrek, beyin ve testis dokularında süperoksit distumaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerini arttırdı. Sonuç olarak prenatal ve laktasyon döneminde GBH'ye maruz kalmanın sıçan yavrularında oksidatif strese neden olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Glifosat-bazlı herbisit; sıçan yavrusu; oksidatif stres.

### Exposure to a glyphosate-based herbicide during prenatal and lactation period induces oxidative stress in rat offspring

#### Abstract

In this study, investigated the effects of prenatal and lactational period exposure to glyphosate-based commercial herbicide (GBH) on the oxidative stress-related parameters of blood, liver, kidney, brain and testicular tissues of newborn male rats. A total of 6 pregnant rats that were used in the study were divided into two groups so that there would be 3 pregnant rats in the control group and 3 pregnant rats in the GBH group. Starting from E18 to E21 the pregnant rats in the experimental group were administered at 50 mg/kg/day GBH subcutaneously (s.c.) and the physiological saline was administered as vehicle to the control group. Subsequently, male pups received vehicle or 2 mg/kg GBH from PND1 to PND21. On PND22, all male offspring (lactational period, 6 newborn male rats from each group) were sacrificed by light ether anesthesia. While GBH decreased the levels of reduced glutathione (GSH) in blood, liver and kidney tissues, it considerably increased malondialdehyde (MDA) levels compare to control group. Moreover, GBH increased the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in blood, kidney, brain and testis tissues. Thus, it was observed that GBH exposure during prenatal and the lactation period induced oxidative stress in in rat offspring.

**Keywords:** Glyphosate-based herbicide; rat offspring; oxidative stress.

### GİRİŞ

İnsan, hayvan ve bitki sağlığının korunmasında pestisitler yoğun biçimde kullanılmaktadır. Bununla birlikte yararlı etkilerinin yanında bu tür kimyasallar bilinçsiz ve yanlış şekilde kullanıldığında özellikle insan ve hayvanlarda akut ve kronik zehirlenmeler ile teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkilere sebep olabilirler (Kaya ve ark., 1998). Herbisitler, pestisitlerin kimyasal bir sınıfı olup yabancı otlara karşı mücadelede tarımda ve tarımsal olmayan alanlarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle glifosat-bazlı herbisitler (GBH), glifosata dayanıklı bitkilerin geliştirilmesiyle Amerika'da kullanımı son 20 yılda 15 katına çıkmıştır (Benbrook, 2016). Türkiye'de de ruhsatlı herbisit sayısı günümüzde 1162 adettir ve en çok ruhsatlandırılan aktif maddesi ise isopropilamin tuzudur (Anonim, 2019). Tarımda kullanımlarının artmasıyla bu kimyasalların hava, su ve yiyeceklere bulaşması kaçınılmazdır. Bunun sonucunda insan ve hayvanlar gibi hedef olmayan organizmalar GBH kalıntısına daha fazla maruz kalmakta ve bu canlılarda çeşitli sağlık problemlerine neden olabilmektedir. Çoğu araştırmada glifosat ve glifosat-bazlı ticari kimyasalların reproduktif sistem, endokrin sistem ve hatta fetal gelişim üzerine zararlı etkileri belirtilmiştir (de Souza ve ark., 2019; Manservisi ve ark., 2019; Türkmen ve Türkmen, 2019; Avdatek ve ark., 2018).



Glifosat triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi aromatik amino asitlerin bitkilerde sentezini inhibe eden bir herbisittir. Bitkilerde 5-enolpiruvilshikimat 3-fosfat sentaz'ı (EPSPS) glifosat tarafından inhibe edilir. EPSPS, primer olarak plastidlerde yer alır ve inhibisyonu shikimat-3-fosfat birikimine neden olur, bundan ötürü aromatik amino asitlerin üretimi engellenir ve bu da protein sentezinin engellenmesi anlamına gelir (Gomes ve ark., 2014). Şikimat aromatik sentez yolu sadece bitki ve bazı mikroorganizmalarda olduğu için diğer hayvanlara ve memelilere gösterdiği düşünülen toksik etkiler farklı nedenlerden meydana gelmektedir. GBH'lerin hayvanlardaki toksisite mekanizması henüz netliğe kavuşmamış olmasına rağmen, bir çok araştırmada reaktif oksijen türleri(ROT)'nin oluşumunun veya antioksidan savunma mekanizmasının bozulması olarak adlandırılan oksidatif stresin rolü olabileceği rapor edilmiştir (Turkmen ve ark., 2019a, Turkmen ve ark., 2019b). Daha önce yapılan bir çalışmada yine GBH'lerin gebe sıçan ve onların yavrularının karaciğer dokusunda antioksidan savunma sistemi bozucuları olarak işlev gördüklerini ve bunun sonucunda lipid peroksidasyona ve oksidatif strese neden oldukları gösterilmiştir (Beuret ve ark., 2005). Bununla birlikte bu çalışma GBH'nin prenatal ve laktasyon periyodu boyunca maruziyeti ile ilgili etkisinin yenidoğan erkek sıçanların kan ve bazı dokularında oksidatif stres parametreleri yönünden araştırıldığı ilk çalışma konumundadır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Hayvan materyali ve deneysel prosedür**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (No:03; Tarih: 14/02/2018). Araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden elde edilen 2 aylık 6 adet Wistar Albino ırkı dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar propilen kafeslerde tutularak, 12'şer saatlik karanlık/aydınlık döngüsünde, 22±2 °C sıcaklık ve nem (%30-70) kontrollerinin yapıldığı odalarda bakıldı ve temiz çeşme suyu ve standart sıçan yemi ad libitum verildi. Sıçanların vajinal sitoloji yöntemi ile östrus siklusu takip edildi. Gebeliği sağlamak üzere proöstrus döneminde olduğu belirlenen 3 dişi ile 1 erkek sıçan aynı kafese konuldu. Ertesi gün vajinal smear ile sperm varlığı saptanan sıçanlar gebe kabul edildi ve gebeliğin 0. (E0) günü olarak kaydedildi. 7 gün boyunca östrus siklusları takip edilerek bu süreçte diöstrus döneminde olduğu gözlenen sıçanların gebeliği doğrulandı. Deney iki kısımdan oluştu. Deneyin birinci kısmında 6 adet gebe sıçan, deney ve kontrol gruplarında 3 adet gebe sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Gebe sıçanlara E18 günden başlayarak subkutan olarak (s.c.) 50 mg/kg/gün GBH ve kontrol grubuna ise taşıt madde olarak fizyolojik tuzlu su (FTS) uygulandı. GBH, taşıt madde içinde çözündürülerek hazırlandı. Taşıt madde ve GBH, doğuma kadar günlük takip eden subkutan enjeksiyonlarla uygulandı. Deneyin ikinci kısmında 12 adet yavru erkek sıçan, deney ve kontrol gruplarında 6 adet yavru erkek sıçan olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Doğum sonrası yavru erkek sıçanlara subkutan olarak PND1'den PND21. güne kadar (laktasyon periyodu) 48 saatte bir olacak şekilde 2 mg/kg/gün GBH ve taşıt madde uygulamasına devam edildi. GBH'nin gebe ve yavru sıçanlara uygulanan dozları, Amerika Çevre Koruma Ajansı tarafından belirlenen, GBH'nin yan etkisi gözlenmeyen düzeyi (NOAEL) referans alınarak seçilmiştir (USEPA, 1993).

### **Çalışmanın sonlandırılması**

Son ilaç uygulamadan sonra PND22'de her iki grubun erkek yavruları ketamin-ksilazin ile anestezi altına alındı ve daha sonra tekniğine uygun olarak göğüs kafesleri açıldı. Çalışır durumda iken kalpten 1 mL'lik enjektörlerle EDTA'lı tüplere ortalama 1-2 mL kan alındı.

### **Eritrositlerin hazırlanması**

Antikoagülanlı tüplere alınan kan örneklerinin 1 mL'si malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerinin tayininde kullanılmak üzere hiçbir işleme tabi tutulmadan tam kan olarak ayrıldı ve aynı gün taze olarak çalışıldı. Geriye kalan kan örnekleri ise Nüve NF 1000 R model santrifüj cihazı ile 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Eritrositler izotonik solüsyonda 3 kere yıkandı ve beyaz kısmı atıldı. Daha sonra aynı miktarda izotonik solüsyon ile eritrositlerden eklendi ve -20 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Kullanılacak eritrosit süspansiyonlarının 5 katı hacminde deiyonize su kullanılarak osmotik basınçla eritrosit süspansiyonları parçalandı. Eritrosit lizati 3 gün içerisinde ölçülene kadar 4°C'de saklandı (Winterbourn ve ark., 1975).

### **Homojenatların hazırlanması**

Deney aşamasının sonunda hayvanlardan ksilazin ve ketamin anestezisi altında karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokuları çıkarıldı ve soğuk % 0.9' luk NaCl ile iyice yıkandı. Dokuların her biri dondurulmuş 0.15 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) içinde yabancı dokulardan uzaklaştırılarak kesildi. Bu dokular %10 (w/v) homojenat elde edebilmek için 0.15 M Tris-HCl buffer (pH 7.4)'de homojenize edildi. Dokular 4 °C'de 10 dk 2500g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar ise -20°C'de analiz edilinceye kadar saklandı (Küçük Kurt ve ark., 2008).

### **Tam kan ve doku homojenatlarında lipid peroksidasyon ölçümü**

Lipid peroksidasyon (LPO) için önemli bir belirteç olan MDA, tam kanda Draper ve Hardley (1990), doku homojenatlarında ise Ohkawa ve ark., (1979)'nın metoduyla belirlendi. Metotların prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu sonucu ortaya çıkan rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır ve bu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçüldü. MDA konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısıyla hesaplanır ve kanda nmol/ml veya dokuda nmol/g olarak ifade edildi.

### **Eritrosit lizatında ve doku homojenatlarında süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçümü**

Eritrosit lizatında ve doku homojenatında süperoksit dismutazın (SOD) antioksidan enzim aktivitesi Sun ve ark., (1988)'nin metoduna göre ölçüldü. Süperoksit radikallerinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolyumu (NBT) mavi renkli formazona indirilmesiyle elde edilen absorbans, spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda belirlendi. SOD aktivitesi eritrosit için U/mgHb veya dokudaki protein için U/ $\mu$ g olarak ifade edildi.

### **Eritrosit lizatında ve doku homojenatlarında katalaz aktivitesinin ölçümü**

Eritrosit lizatında ve doku homojenatında katalaz (CAT) aktivitesi sırasıyla Luck (1955) ve Aebi (1974)'nin metoduna göre belirlendi. Bir birim CAT miktarı, 25°C'de pH (4.5)'da her bir dakikada 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i parçalayan enzim miktarına karşılık gelir. CAT aktivitesi (*k*; nmol/min) eritrosit için *k*/mgHb veya dokudaki protein için *k*/ $\mu$ g olarak ifade edildi.

### **Hemoglobin ve protein konsantrasyonları ölçümü**

Hemoglobin (Hb) Drabkin ve Austin (1935)'e göre siyanomethemoglobin metoduyla kolorimetrik olarak belirlendi. Dokudaki protein içeriği ise Lowry ve ark., (1951)'nin kolorimetrik metoduna göre test edilmiştir.

### **Spektrofotometrik ölçümler**

Spektrofotometrik ölçümler Shimadzu 1601 UV-VIS spektrofotometresi (Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirildi.

### **İstatistiksel analiz**

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov ve Shapiro Wilk testleri ile kontrol edilmiş ve normal dağılıma sahip olduğu belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ). İki grup ortalamasını karşılaştırmak için bağımsız örneklem t testi kullanılmıştır.

## **BULGULAR**

### **Lipit peroksidasyon üzerine etkisi**

Glifosat-bazlı herbisit verilen sıçanların tam kan, karaciğer, böbrek ve beyin dokuları MDA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu; testis dokusunda ise değişmediği gözlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Glifosat-bazlı herbisit MDA üzerine etkisi

Değişken	Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	t	p
Tam kan (nmol/mL)	Kontrol	6	5,52	0,37	-10,604	0,001
	GBH	6	8,12	0,47		
Karaciğer (nmol/g doku)	Kontrol	6	5,16	0,42	-15,346	0,001
	GBH	6	9,01	0,45		
Böbrek (nmol/g doku)	Kontrol	6	5,25	0,58	-13,092	0,001
	GBH	6	8,97	0,39		
Beyin (nmol/g doku)	Kontrol	6	6,59	0,24	-4,916	0,001
	GBH	6	7,12	0,11		
Testis (nmol/g doku)	Kontrol	6	4,59	0,17	-1,590	0,143
	GBH	6	4,72	0,08		

### **İndirgenmiş glutatyon üzerine etkisi**

Glifosat-bazlı herbisit verilen sıçanların tam kan, karaciğer ve böbrek GSH seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma olduğu; beyin ve testis dokularında ise değişmediği gözlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Glifosat-bazlı herbisit GSH üzerine etkisi

Değişken	Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	t	p
Tam kan (nmol/mL)	Kontrol	6	12,68	0,76	11,107	0,001
	GBH	6	8,48	0,53		
Karaciğer (nmol/g doku)	Kontrol	6	27,70	0,49	36,659	0,001
	GBH	6	17,81	0,44		
Böbrek (nmol/g doku)	Kontrol	6	24,65	0,72	11,706	0,001
	GBH	6	18,94	0,95		
Beyin (nmol/g doku)	Kontrol	6	17,38	0,80	0,695	0,503
	GBH	6	17,08	0,70		
Testis (nmol/g doku)	Kontrol	6	15,85	0,55	2,178	0,054
	GBH	6	15,22	0,44		

### Süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkisi

Glifosat-bazlı herbisit verilen sıçanların eritrosit, karaciğer, böbrek, beyin ve testis dokularındaki SOD seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

**Tablo 3.** Glifosat-bazlı herbisit SOD üzerine etkisi

Değişken	Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	t	p
Eritrosit (U/mgHb)	Kontrol	6	54,90	3,56	-6,790	0,001
	GBH	6	103,27	17,08		
Karaciğer (U/µg protein)	Kontrol	6	0,01	0,00	3,733	0,004
	GBH	6	0,01	0,00		
Böbrek (U/µg protein)	Kontrol	6	0,01	0,00	3,568	0,005
	GBH	6	0,01	0,00		
Beyin (U/µg protein)	Kontrol	6	0,01	0,00	-8,508	0,001
	GBH	6	0,02	0,00		
Testis (U/µg protein)	Kontrol	6	0,01	0,00	-7,401	0,001
	GBH	6	0,02	0,00		

### Katalaz aktivitesi üzerine etkisi

Glifosat-bazlı herbisit verilen sıçanların eritrosit, böbrek, beyin ve testis dokularındaki CAT seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış olduğu; karaciğer dokusunda ise değişmediği gözlenmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** Glifosat-bazlı herbisit CAT üzerine etkisi

Değişken	Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	t	p
Eritrosit (k/mgHb)	Kontrol	6	15,14	4,00	-12,832	0,001
	GBH	6	47,56	4,73		
Karaciğer (k/µg protein)	Kontrol	6	0,10	0,01	-1,093	0,300
	GBH	6	0,11	0,02		
Böbrek (k/µg protein)	Kontrol	6	0,08	0,02	-3,431	0,006
	GBH	6	0,11	0,01		
Beyin (k/µg protein)	Kontrol	6	0,00	0,00	-2,715	0,022
	GBH	6	0,01	0,01		
Testis (k/µg protein)	Kontrol	6	0,01	0,00	-3,588	0,005
	GBH	6	0,02	0,01		

## TARTIŞMA

Glifosat bazlı herbisit canlı sistemlerde oluşturduğu toksik etkilerin mekanizmasında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı rolü öne sürülmüştür (Beuret ve ark., 2005). Ayrıca embriyonik dönemde düşük doz GBH'ye maruz kalmanın, maruziyetin sona ermesinden sonra bile kalıcı etkilere sahip olabileceği, bu herbisitlerin yetişkinlik dönemindeki belirli hastalıkların ortaya çıkmasında rolü olabileceğini öne sürdüğü bildirilmiştir (Diamanti-Kandarakis ve ark., 2009; Schug ve ark., 2011). Bu bağlamda çalışmamızın ana amacı, gebelik ve

laktasyon dönemi boyunca GBH maruziyetinin, yavru erkek ratların kan ve bazı dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerinde değişiklik meydana getirip getiremeyeceğini ortaya koymaktı.

Malondialdehid, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun başlıca oksidasyon ürünlerinden birisidir ve MDA düzeyi artışı LPO'nun en önemli göstergesidir. Pestisit ile indüklenmiş toksisitede rol oynayan en önemli moleküler mekanizmalardan birisinin de LPO olduğu önerilmiştir (Kehrer, 1993). GSH ise nonenzimatik antioksidan olarak vücudun antioksidan savunma sisteminde önemli görevler üstlenir. Glutasyon peroksidazın (GPx) ko-substratı olduğu gibi direkt olarak serbest radikalleri temizlemede de rol oynar. Aynı zamanda hücre içi redoks tampon sisteminin ana bileşenidir (Johansen ve ark., 2005). Pestisitler gibi ksenobiyotikler ile reaksiyona girerek kompleks formlar oluştururlar. GSH, bu şekilde hücreleri ksenobiyotiklerin toksik etkilerinden korur (Chhabra ve ark., 1993). Oksidatif stres durumlarında artmış LPO bağlı olarak meydana gelen peroksidlerin detoksifikasyonunda görev alan enzimler tarafından GSH tüketilir (Cathcart, 1985). Bu çalışmamızda kan ve doku örneklerinde kontrol grubuna göre GBH verilen grupta MDA düzeylerinin arttığı; bunu aksine GSH düzeylerinin ise azaldığı görüldü. Bu sonuçlar bizim daha önce yaptığımız GBH-oksidatif stres ilişkili çalışmalarımızla uyumludur (Turkmen ve ark., 2019a, Turkmen ve ark., 2019b).

Normal fizyolojik şartlarda SOD ve CAT gibi hücre içi antioksidan enzimler, serbest radikalleri ortadan kaldırarak hücrelerin antioksidan savunma sisteminde bütünleyici bir rol oynarlar (Bukowska, 2004). SOD, süperoksit radikalleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalize ederken, CAT H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya dönüştürür. Bu antioksidan enzimler bu yüzden serbest radikallerin toksik etkilerini azaltabilir (Mansour ve Mossa, 2009). Farklı pestisitlerle yapılan çalışmalarda pestisitlerin SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerine etkisi konusunda çelişkili ifadeler bulunmaktadır. Kanbur ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada organik fosforlu bir pestisid olan propetamfosun rat eritrosit SOD ve CAT aktivitelerini azalttığını bildirmişlerdir. Ince ve ark. (2017) ise malatyon tarafından oluşturulan oksidatif hasar neticesinde rat eritrosit ve dokularında SOD ve CAT aktivitelerinin arttığını rapor etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada kan ve doku örneklerinde SOD ve CAT aktivitelerinin GBH verilen grupta kontrol grubuna göre kıyaslandığında arttığı görüldü. GBH verilen grupta SOD ve CAT antioksidan enzim aktivitelerinin artmasının, oksidatif strese bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikalleri temizleyebilmek ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak prenatal ve laktasyon döneminde GBH'ye maruz kalmanın sıçan yavrularında oksidatif strese neden olduğu görüldü.

## KAYNAKLAR

- Aebi H 1974. Catalase In Vitro. Methods of enzymatic analysis. In: Bergmeyer HU (ed), New York: Academic Press, pp. 673–677.
- Anonim 2019. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Bitki Koruma Ürünleri Daire Başkanlığı, Erişim adresi: <https://bku.tarim.gov.tr/BKURuhsat/Index> [Erişim 02.07.19]
- Avdatek F, Birdane YO, Turkmen R, Demirel HH 2018. Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Andrologia*, 50(7):e13036. doi: 10.1111/and.13036.
- Benbrook CM 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(3):1-15.
- Beuret CJ, Zirulnik F, Giménez MS 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology*, 19:501–504
- Bukowska B 2004. 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role of glutathione. *Cell Biology International* 28(7): 557-63.
- Cathcart RF 1985. Vitamin C: the nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses* 18: 61-77.
- Chhabra SK, Hashim S, Rao AR 1993. Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translocationally to malathion. *Journal of Applied Toxicology* 13(6): 411–416.
- de Souza JS, Laureano-Melo R, Herai RH, da Conceição RR, Oliveira KC, da Silva, IDCG, Dias-da-Silva MR, Romano RM, Romano MA, Maciel RMDB, Chiamolera MI, Giannocco G 2019. Maternal glyphosate-based herbicide exposure alters antioxidant-related genes in the brain and serum metabolites of male rat offspring. *NeuroToxicology*, 74:121-131.

- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC 2009. Endocrine-disrupting chemicals, an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30(4): 293-342.
- Drabkin DL, Austin JH 1935. Spectrophotometric Studies. II. Preparations From Washed Blood Cells; Nitric Oxide Hemoglobin and Sulfhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 112(1): 51.
- Draper HH, Hardley M 1990. Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186: 421-431.
- Gomes MP, Smedbol E, Chalifour A, Hénault-Ethier L, Labrecque M, Lepage L, Lucotte M, Juneau P 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17): 4691-4703.
- Ince S, Arslan-Acaroz D, Demirel HH, Varol N, Ozyurek HA, Zemheri F, Kucukkurt I 2017. Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 96: 263-268.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 4: 5.
- Kanbur M, Eraslan G, Silici S 2009. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 909-915.
- Kaya S, Piriñçi İ, Bilgili A 1998. Çevre Bilimi ve Çevre Toksikolojisi. *Medisan Yayın Serisi:36*, Ankara, 53 pp.
- Kehrer JP 1993. Free radicals as mediator of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23: 21-48.
- Küçükkurt İ, Ince S, Fidan AF, Özdemir A (2008) The effects of dietary supplementation of different amount of yucca schidigera powder (*Sarsaponin 30®*) on blood and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7: 1413-17.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Luck H 1965. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*. In: Bergmeyer HU (ed), New York: Academic Press, pp. 885-894.
- Manservigi F, Lesseur C, Panzacchi S, Mandrioli D, Falcioni L, Bua L, Manservigi M, Spinaci M, Galeati G, Mantovani A, Lorenzetti S, Miglio R, Andrade AM, Kristensen DMØ, Perry MJ, Swan SH, Chen J, Belpoggi F 2019. The Ramazzini Institute 13-week pilot study glyphosate-based herbicides administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: Effects on development and endocrine system. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 18: Article number 15.
- Mansour SA, Mossa AH 2009. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 93: 34-39.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 127 (3-5): 204-215.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34: 497-500.
- Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Kabu M, Ince S 2019b. Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicology Research*, 8(2):238-245.
- Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S 2019a. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(11):11427-11437.
- Türkmen R, Türkmen T 2019. Prenatal and neonatal exposure to glyphosate-based herbicide reduces the primordial to primary follicle transition in the newborn rat ovary: A preliminary study. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 12:2 doi: 10.30607/kvj.543261.
- USEPA, 1993. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Glyphosate. Erişim adresi: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/red\\_PC-417300\\_1-Sep-93.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_PC-417300_1-Sep-93.pdf) [Erişim 04.07.19]
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brain M, Carrell RW 1975. The Estimation of red cell superoxide activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 55: 337-41.

## New boronate compounds and N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate compounds: synthesis and spectroscopic properties

Ahmet Kilic<sup>1</sup>, Bayram Sobay<sup>2</sup>, Rahime Yavuz<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, 63190, Turkey.

<sup>2</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, 63190, Turkey.

<sup>3</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, 63190, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: rahimeyvz@gmail.com

### Abstract

Firstly, in this study we reported the design, synthesis, and characterization of the novel three-coordinated boronate esters (**1-3**) via the reaction of 3-Cyclohexene-1,1-dimethanol and corresponding with various boronic acids under suitable conditions. In the latter case, the novel a class of four-coordinate boronate esters (**4-6**), which have the general formula N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate esters (**4-6**) were designed and synthesized by the condensation of 1,3-Bis(2,4,6-trimethylphenyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene and 1 mole equiv of the corresponding three-coordinate boronate esters (**1-3**) at room temperature in toluene solvent inside respectively. Boron center has an unoccupied p-orbital and which allows them to form four-coordination bonds with N-Heterocyclic Carbene (NHC) nucleophiles as well as covalent B-O and B-C bonds make the structure stable in air. In the light of this information about the three-coordinate (**1-3**) and four-coordinate N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate ester catalysts (**4-6**) successfully were prepared and characterized by various spectroscopic techniques including NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>11</sup>B), FT-IR, UV-Vis, LC-MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques. However, attempts at growing crystals of the boronate esters (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate esters (**4-6**) suitable for single-crystal XRD were not successful. On the other hand, boron compounds have recently become an important not only in academia but has also found its way into a wide range of industrial processes due to unique properties, different chemical structures, spectroscopic properties and rich history in other science fields.

**Keywords:** Boronate compounds, Synthesis, Spectroscopy, N-Heterocyclic Carbene (NHC) nucleophiles

### INTRODUCTION

Boron compounds and related molecules are strong Lewis acids because boron has an empty p-orbital which allows them to form dative bonds (coordinate covalent bonds) with nucleophiles. The boron center can be readily converted from neutral trigonal planar sp<sup>2</sup> to tetrahedral sp<sup>3</sup> hybridization under physiological conditions, rendering the unique spectroscopic and biological properties of boron-containing molecules. Boron compounds are nowadays broadly applied not only in academia but has also found its way into a wide range of industrial processes due to unique properties, different chemical structures, spectroscopic properties and rich history in catalytic chemistry. Highly Lewis acidic organoboranes continue to attract tremendous interest and current applications range from Lewis acid catalysis of organic transformations (Yamamoto, 2000). N-heterocyclic carbene (NHC)-stabilized boron compounds, which showing electronically highly unsaturated species, ligands featuring both strong  $\sigma$ -donating and  $\pi$ -accepting ability, playing a key role exponential growth in the 21st century. In addition, further progress in (NHC)-stabilized boronate chemistry would be expedited by the development of a general, operationally simple and reliable pathway for the synthesis of such complexes (Brahmi et al., 2010). However, the carbene coordination to the boron atom weakens the B-C bond, making these (NHC)-stabilized boronate compounds highly reactive and severely hindering isolation and characterization (Müller et al., 2019). In addition, NHC addition to the boron atom might activate the B-C bond in these molecules due to simultaneously occupy the two vacant orbitals to decrease the Lewis acidity of the boron center.

In the light of this information given about boronate compounds and N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate compounds, we report on a series of novel tri-coordinate boronate compounds and N-heterocyclic carbene (NHC)-stabilized boronate compounds in which the boron is four-coordinate due to chelation by NHC ligands for detail spectroscopic studies. For this purpose, the three-coordinate and four-coordinate N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate compounds successfully were prepared and characterized by various spectroscopic techniques including NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>11</sup>B), FT-IR, UV-Vis, LC-MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques.

## MATERIALS AND METHODS

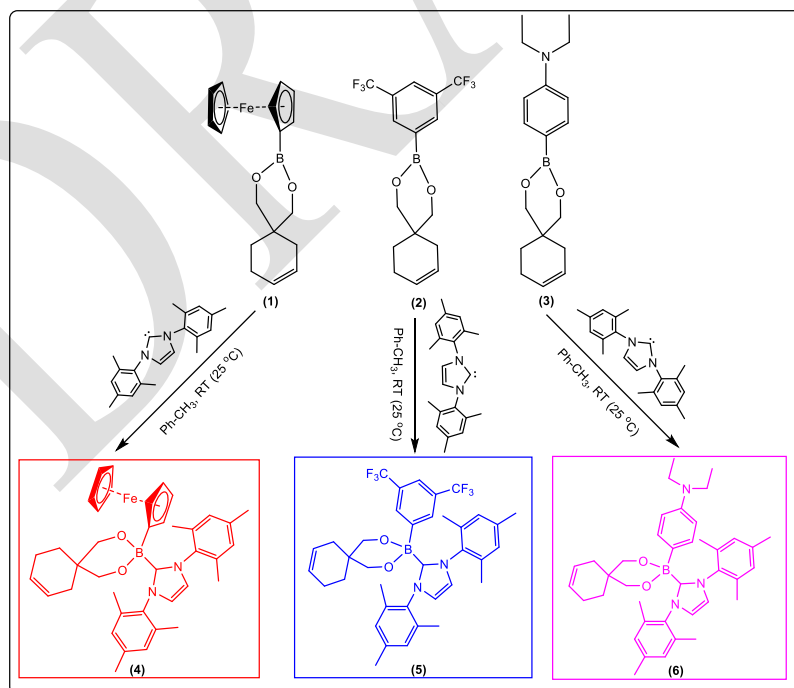
All organic solvents and starting materials used for the synthesis of the boronate esters (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>) and their corresponding N-heterocyclic carbenes (NHC)-stabilized boronate esters (B<sub>4</sub>-B<sub>6</sub>) were commercially available, and used without any additional purification and any additional chemical process. FT-IR spectra were obtained in the range of 4000-400 cm<sup>-1</sup> using the ATR accessory using a Perkin-Elmer Two UATR-FT spectrophotometer. UV-Vis measurements were acquired on a Perkin-Elmer model Lambda 25 spectrophotometer in the range of 200 to 1100 nm and CHCl<sub>3</sub> with C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH have been selected as solvents. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>11</sup>B NMR spectra were recorded on a Agilent Technologies and on a Bruker Avance III (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz and <sup>11</sup>B: 192.5 MHz) in CDCl<sub>3</sub> or DMSO-d<sub>6</sub> using TMS as internal standard. The mass spectra (LC-MS/MS) were obtained through using an **Agilent** LC-MS/MS spectrometer by ESI technique. Elemental analyses for C, H and N were performed on a LECO CHNS 932 model elemental analyzer. Melting points of all complexes have been determined in open capillary tubes on an Electrothermal 9100 melting point apparatus and are uncorrected.

### Synthesis of boronate esters (1-3)

To a 100 mL round-bottom flask with a argon (Ar) connection, 3-Cyclohexene-1,1-dimethanol (0.5 g, 0.36 mmol) and corresponding ferrocene boronic acid (0.81 g, 0.36 mmol) for boronate compounds (**1**), 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl boronic acid (0.91 g, 0.36 mmol) for boronate compounds (**2**), and 4-(Diethylamino)phenyl boronic acid (0.68 g, 0.36 mmol) for boronate compounds (**3**) in toluene (40 mL) were stirred under reflux conditions for 24 h. Then, the three solutions were cooled slowly to 25 °C. Solvents were removed in vacuo yielding a crude oil and the crude oil was washed three times with diethyl ether with n-hexane, successively, and crystallized in a freezer. The precipitate was vacuum filtered to yield the corresponding pure boronate compounds.

### N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate esters (B<sub>4</sub>-B<sub>6</sub>)

To a 100 mL round-bottom flask, a toluene solution (40 mL) of compound **1** (0.17 g, 5.0 mmol), compound **2** (0.18 g, 5.0 mmol), and compound **3** (0.15 g, 5.0 mmol) was slowly added to a mixture of 1,3-Bis(2,4,6-trimethylphenyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene (0.15 g, 5.0 mmol) in toluene (20 mL) at room temperature, respectively. Then, the reaction mixtures were stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed three times with 10 mL of n-hexane and dried in vacuo.



Scheme 1. Synthesis route of proposed boronate compounds (1-6)

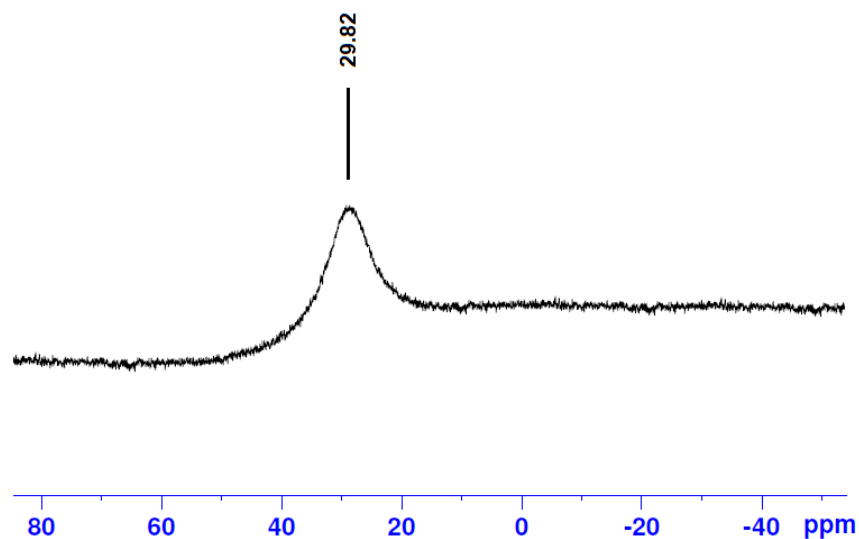


Figure 1. <sup>11</sup>B NMR spectrum of boronate compound (2)

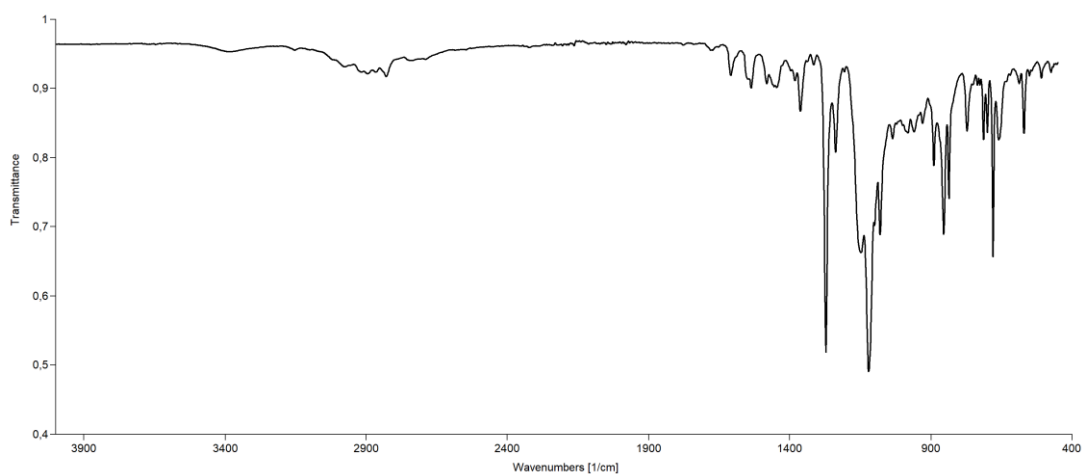


Figure 2. FT-IR spectrum of (NHC)-stabilized boronate compound (5)

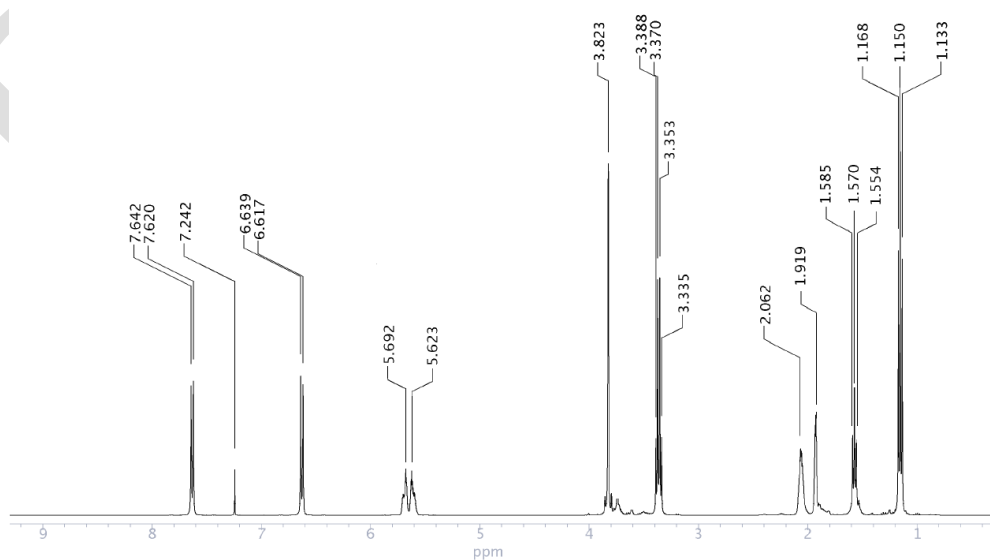


Figure 3. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of boronate compound (3)



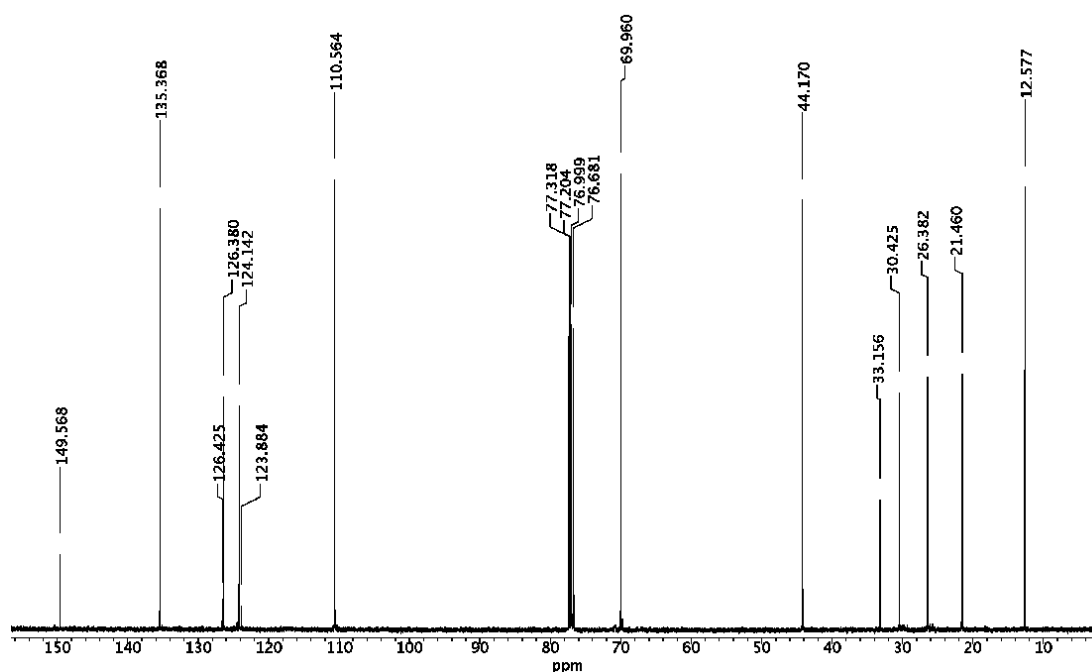


Figure 4. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of boronate compound (3)

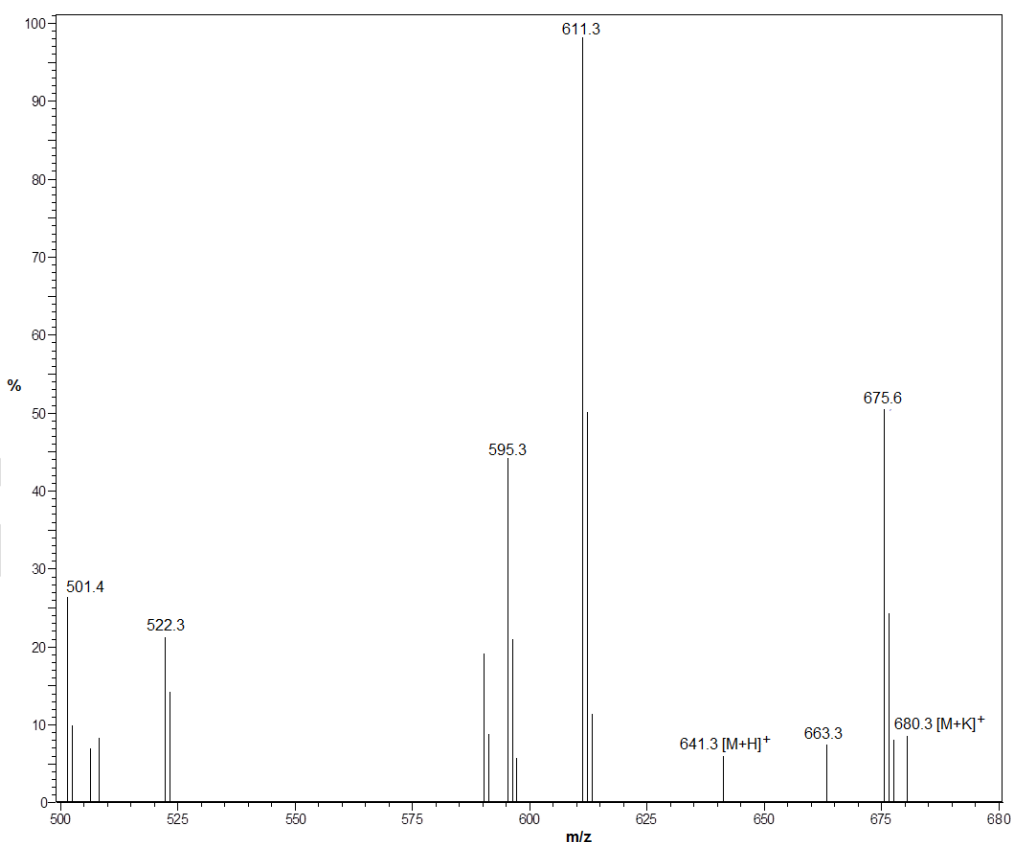


Figure 5. LC-MS/MS spectrum of boronate compound (4)

## RESULTS and DISCUSSION

At first, the novel three-coordinated boronate compounds (**1-3**) were prepared from the reaction of Cyclohexene-1,1-dimethanol with corresponding ferrocene boronic acid, 3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl boronic acid, and 4-(Diethylamino)phenyl boronic acid in toluene and reflux conditions for 24 h, as shown in Scheme 1. Subsequently, the boronate compounds (**1-3**) were then converted into the corresponding N-Heterocyclic Carbene (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) by using 1,3-Bis(2, 4, 6-trimethylphenyl)-1,3-dihydro-2H-imidazol-2-ylidene as NHC in toluene at room temperature overnight (see Scheme 1). All

boronate compounds (**1-6**) have been characterized by NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>11</sup>B), FT-IR, UV-Vis, LC-MS/MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques (Figure 1-6). Attempts at growing crystals of the boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) suitable for single-crystal XRD were not successful. However, the obtained spectroscopic and analytical results of all the boronate compounds (**1-3**) and the corresponding (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) are consistent with the proposed structure. The FT-IR data of all boronate compounds (**1-6**) show very similar stretching vibrations probably due to similar chemical environment of the boron center, as expected. Regarding the UV-Vis absorption spectroscopy, the boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) were evaluated in C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH and CHCl<sub>3</sub> (2.10<sup>-6</sup>-2.10<sup>-8</sup> M) at room temperature. For comparison, boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) typically display a λ<sub>max</sub> value of between 220 and 448 nm in their solution UV-Vis absorption spectra. UV-Vis spectra of boronate compounds (**1-6**) with a λ<sub>max</sub> = 443 nm in CHCl<sub>3</sub>, whereas in more polar solvent such as C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, the maximum absorption bands were slightly red-shifted to range 448 nm, can be attributed to the π→π\* or n→π\* transitions (Cassidy et al., 2018). The NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>11</sup>B) spectral results were in good agreement with the proposed boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) in CDCl<sub>3</sub> or DMSO-d<sub>6</sub> using TMS as internal standard. The major difference between the <sup>1</sup>H NMR spectrum of boronate compounds (**1-3**) with (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**), appears a new chemical shift values of the NHC group on the NMR timescale at room temperature. Also, the <sup>13</sup>C NMR spectra results can be analyzed in an analogous manner to that of the proton spectra and the chemical shift of <sup>13</sup>C NMR peaks supports the formation of a series of boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) derivatives. In this study, the characteristic carbene carbon resonances appeared in the range 141.36-140.92 ppm, confirms the binding of the NHC group attached to the boron center. Additionally, in order to demonstrate the formation of the proposed boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**), analysis of the <sup>11</sup>B NMR results were also performed. In the <sup>11</sup>B NMR spectrum of boronate compounds (**1-3**) in DMSO-d<sub>6</sub>, the only broad singlet signals at range 31.03-29.82 ppm, whereas (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) showed only broad singlet resonances and shifts upfield compared to the boronate compounds (**1-3**). Further confirmation of the formation of the proposed boronate compounds (**1-3**) and (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) was also provided by LC-MS/MS spectrometry. The LC-MS/MS spectral results showed the expected molecular and fragmentation ions, with appropriate isotope distribution and the isotopic distribution of parent ions in the spectra demonstrated the presence of one atom of boron in the boronate compounds

## CONCLUSION

In this study, the novel boronate compounds (**1-3**) and N-heterocyclic carbene (NHC)-stabilized boronate compounds (**4-6**) were successfully synthesized and characterized by means of NMR spectroscopy (<sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C), FT-IR, UV-Vis, LC-MS, melting point as well as elemental analysis. Following a full characterization, the study of spectroscopic properties of these novels boronate esters was done in detail.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge gratefully the financial support from Research Fund of Harran University, Sanliurfa, Turkey.

## REFERENCES

- Brahmi MM., Monot J, Murr MDE, Curran DP, Fensterbank L, Lacote E, Malacria M 2010. *J. Org. Chem.* 75: 6983-6985.
- Cassidy SJ, Brettell-Adams I, McNamara LE, Smith MF, Bautista M, Cao H, Vasiliu M, Gerlach DL, Qu F, N. Hammer NI, Dixon DA, and Rupar PA 2018. *Organometallics* 37: 3732-3741.
- Müller C, Andrada DM, Bischoff IA, Zimmer M, Huch V, Steinbrück N, A. Schäfer A 2019. *Organometallics* 38: 1052-1061.
- Yamamoto H 2000. *Lewis Acids in Organic Synthesis*, ed., Wiley VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.

## Sülfatlanmış Polisakkarit Fucoidan'ın Antioksidan Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Merve Kaya\*, Petek Piner Benli<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi ABD, Adana, Türkiye

\*kkayamerve46@gmail.com

### Özet

Fucoidan; kahverengi markroalglerde (*Phaeophyceae*) hücreler arası bölümlerde yada matrikste bulunan kahverengi renge sahip, bir sülfatlanmış polisakkarittir. Fucoidan isminin yanı sıra fucan, fucosan veya sülfatlanmış fucan olarak da adlandırılan biyoaktif bir moleküldür. Fucoidan *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia cava*, *Turbinaria decurrens*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus evanescens*, *Fucus serratus*, *Pelvetia canaliculata*, *Cladosiphon okamuranus*, *Hizikia fusiforme*, *Laminaria japonica*, *Sargassum horneri*, *Padina gymnospora* ve *Laminaria hyperborea* türlerinden elde edilmektedir. Kaynağına ve mevsimlere göre farklı kompozisyonlarda bulunur ve bu farklı kompozisyonların biyoaktif özellikleri de farklılık göstermektedir. Fucoidan; kurşun hidroksit kompleksi halinde saflaştırma ve alkol ilavesi ile çöktürme sonucu saflaştırma ile kahverengi makroalg türlerinden saf olarak edilebilmektedir.  $\alpha$ -L-(1-3), (1-4) bağlı fruktopiranoz rezidülerinden oluşan fucoidan homopolisakkarit yapıdadır ancak farklı miktarlarda galaktoz, glikoz, glukuronikasit, mannoz ve ksiloz içerebildiği için parçalanma ürünleri heteropolisakkarit olarak sınıflandırılmaktadır. Fucoidanın anti-tümör, anti-koagulan, anti-inflamatuar, anti-viral etkilerinin yanı sıra antioksidan etkisinin olduğu da bildirilmektedir. Serbest radikal temizleme kapasitesi ile güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile ortaya konmuştur. Antioksidan kapasitenin düşük moleküler ağırlıklı ve sülfat içeriği yüksek olan türlerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Genel olarak suda çözünüyor olması, diğer biyoaktif özellikleri ile birlikte antioksidan kapasitesinin yüksek olması, doğadan fazla miktarlarda ve kolay elde edilebiliyor olması nedeniyle fucoidan son yıllarda Biyoteknolojik ve Farmakolojik araştırmalarda araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli bir bileşik olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Sülfatlanmış polisakkarit, fucoidan, biyoaktif özellik, antioksidan.

### GİRİŞ

Fucoidan; kahverengi makroalg türlerinden (*Phaeophyceae*) elde edilen sülfatmış polisakkarit yapıda kahverengi renge sahip bir bileşiktir. Bileşiğe rengini veren pigmentin adı ise fucoksanthin'dir. Fucoidan molekül ağırlığına göre düşük (<10 kDa), orta (10-10.000 kDa) ve yüksek (>10.000 kDa) olarak üç grupta değerlendirilmektedir. Fucoidanın biyoaktif özelliği molekül ağırlığına göre farklılık gösterebilmektedir. Fucoidan kahverengi makroalg türlerinin hücrelerarası bölümlerinde veya matriksinde bol miktarda bulunmaktadır (Senthilkumar et al., 2013). Bu polisakkarit ilk kez 1913 yılında Kylin tarafından kahverengi makroalg türleri olan *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* ve *Ascophyllum nodosum*'dan izole edilmiş ve "fucoidan" olarak adlandırmıştır (Kylin, 1913). Fucoidan isminin yanı sıra fucan, fucosan veya sülfatlanmış fucan olarak da adlandırılmaktadır (Li et al., 2008). Canlı metabolizması için önemli ve nadir sentezlenebilen bir pentoz olan L-fukoz fucoidandan elde edilmektedir (Berteau & Mulloy, 2003).

Fucoidanın karmaşık yapıda olduğu ve tek bir çekirdekten meydana gelmediği 1954 yılında O'Neill, daha sonra 1963 yılında Larsen ve Haug tarafından ortaya konmuştur. Saflaştırılmış fucoidan da farklı oranlarda sülfatlanmış polisakkaritlerin olmasının yanı sıra, çekirdek yapıları farklı olan polisakkaritlerin de bulunduğunu belirtilmektedir (Percival & McDowell, 1967). Fucoidan L-fukoz monomerlerinden oluşan bir homopolisakkarittir. Ayrıca farklı miktarlarda galaktoz, glikoz, glukuronikasit, mannoz ve ksiloz içerebildiği için parçalanma ürünleri heteropolisakkarit olarak sınıflandırılmaktadır (Berteau & Mulloy, 2003). Fucoidanın ana zinciri  $\alpha$ -L-(1-3), (1-4) bağlı fruktopiranoz rezidülerinden oluşmaktadır (Cumashi et al., 2007).

Fucoidanın izole edildiği kahverengi makroalg türleri; Çin, Japonya ve Kore başta olmak üzere Avustralya'nın Kuzey Atlas Okyanusu kıyıları, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi bölgelerde bulunmaktadır (Cecere et al., 2000). Fucoidan içeren kahverengi makroalg türleri: *Fucus vesiculosus*, *Laminaria digitata*, *Fucus evanescens*, *Fucus serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata*, *Cladosiphon okamuranus*,

*Hizikia fusiforme*, *Laminaria japonica*, *Sargassum horneri*, *Nemacystus decipiens*, *Padina gymnospora*, *Laminaria hyperborea* olarak sıralanabilir (Ahmad, 2015).

### 1.1. Fucoidanın Biyoaktif Özellikleri

Fucoidan ile ilgili yapılan çalışmalarda; anti-kanser, anti-viral, anti-koagulan, anti-inflamatuvar, antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir ve bunların yanı sıra böbrek hastalıklarına karşı koruyucu etkisi, mide koruyucu etkisi ve yara tedavi edici etkiside bulunmaktadır.

Fucoidanın anti-koagulan etkiye sahip olduğu farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Anti-koagulan mekanizmasının heparin kofaktör II aracılı aktivite ve anti-trombin ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Nishino et al., 1991). Anti-koagulan etkisi yapısındaki sülfat miktarı, pozisyonu, moleküler ağırlığı ve şeker içeriği ile ilişkilidir. Sülfat miktarı yüksek (Dobashi et al., 1989) ve moleküler ağırlığı büyük olan fucoidanların yüksek anti-koagulan etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Chandía & Matsuhiro, 2008). Fucoidanın şeker bileşiminin antikoagulan etkiyi değiştirebildiği ve içerisindeki üronik asitin şeker zincirinin fleksibilitesini artırarak anti-koagulan aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir (Liu et al., 2008).

Fucoidanın anti-inflamatuvar etkisi deneysel modellerle belirlenmiştir. Yangısal model olarak kullanılan ratlarda fucoidanın lökosit yenilenmesini engellediği belirtilmektedir. Fucoidanın deneysel oluşturulan beyin enfeksiyonlarında lökositler üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış ve fucoidanla tedavi edilen grupta inflamasyonun önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Cumashi et al., 2007). Ayrıca fucoidanın, pulmoner yangıyı hafiflettiği, alerjik yangıların tedavisinde etkili olduğunda gösterilmiştir (Maruyama et al., 2005).

Fucoidanın anti-tümör aktivitesi *in vitro* ve *in vivo* çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Fucoidanın anti-tümör aktivitesini apoptozu tetikleyip tümörün damarlaşmasını baskılayarak ve hücreye bağlı bağışıklığı aktifleştirerek gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Han et al., 2015). Ayrıca apoptozla olan ilişkisinin kaspaz aktivasyonu, mitokondri membran geçirgenliğinin artışı, sitokrom c ile Smac/Diablo salınımı, Bad ve t-bid seviyelerinin artışı, Mcl-1/5 seviyelerinin düşüşü ile Fas, DR5, ve TRAIL seviyelerindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir (Atashrazm et al., 2015). Fucoidanın meme kanseri üzerindeki apoptotik etkisinin özellikle kaspaz-8 yolağı üzerinden olduğu da anti-kaspaz ajanlar kullanılarak belirlenmiştir (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009). İnsan lenfoma HS-Sultan hücre hatlarında, proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bilinmektedir. HS-Sultan İnsan lenfoma hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada, kaspaz ve ERK geçitleri yolu ile hücre ölümünü uyardığı ve hücre proliferasyonu engellediği böylece anti-kanser etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Aisa et al., 2005). Ayrıca hepatokarsinom hücre hattında (Huh7) hücrelerin G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına neden olabileceği rapor edilmiştir (Nagamine et al., 2009).

Fucoidan ve diğer bazı fucanların *in vitro* ve *in vivo* anti-viral etkiye sahip ve anti-viral ilaçlardan daha az sitotoksik olduğunda gösterilmiştir. Vero hücre kültüründe *Cystoseira indica*'dan elde edilen sülfatlanmış fucan ekstaktlarının sitotoksik etki göstermeden herpes simplex virus tip 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2)'ye karşı anti-viral etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Mandal et al., 2007). Fucoidanın Hepatit B ve HIV gibi virüslerin farklı epitop bölgelerine bağlanarak virüsün aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Schaeffer & Krylov, 2000). *L. japonica*'dan elde edilen fucoidanın anti RNA ve DNA virüs fonksiyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Fucoidanın poliovirüs3, adenovirüs3, ECHO6 virüs, coxsackie B3 ve coxsackie A16 gibi virüsler üzerine anti-viral etkisi olduğu ve bu virüslerin neden olduğu enfeksiyonları engellediği belirlenmiştir (Li et al., 1995). Enteral prion enfeksiyonundan sonra oral yolla alınan fucoidanın, anti-prion etki gösterdiği ve prion kaynaklı hastalıkların (Creutzfeldt-Jakob, Gerstmann-Straussman-Scheinker ve Ölümcül ailesel uykusuzluk) başlamasını önlediği belirlenmiştir (Doh-ura et al., 2007).

Fucoidanın böbrek hastalıklarına karşı etkili olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Fucoidanın böbreklerde taş oluşumu ve membran hasarını önleyerek antioksidan özellik gösterip idrarın aşırı doyunluğuna bağlı kristal oluşumunun ilerlemesini önlediği bildirilmiştir (Veena et al., 2006). Ayrıca adenine bağlı kronik böbrek yetersizliği oluşturulan ratlarda epitelmezankimal geçiş ve böbrek fibrozisinde iyileşme meydana getirdiği gösterilmiştir (Liu et al., 2008). Fucoidanın aktif heyman böbreklerde koruyucu etkiye sahip olduğu ve nefrit için terapötik bir madde olduğu rapor edilmiştir (Zhang et al., 2005).

Fucoidanın yara tedavi edici etkisi genellikle *in vitro* hücre kültürü modelleri ile, çok az sayıda da *in vivo* modellerde ortaya konmuştur. *In vitro* çalışmalarda fucoidanın kollajen jel konsantasyonunu hızlandırdığı, fibroblast gücünü önemli miktarda artırdığı, fibroblast popülasyonunda hızlı bir çoğalmaya neden olduğu ayrıca yara iyileşmesi için gerekli olan integrin  $\alpha 2\beta 1$  ekspresyonunu hızlandırdığı belirlenmiştir (Fujimura et al., 2000). *In vivo* çalışmada ise; ikinci derece yanık oluşturulan tavşanlarda fucoidanın yara iyileştici etkisi araştırılmış ve sonuç olarak fucoidanın yara iyileşme sürecini kısıtladığı, rejenerasyon ve re-epitelizasyonu

artırarak hızlı ve etkili bir iyileşme sağladığı görülmüş ve fucoidanın yanık tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Sezer et al., 2007).

Fucoidanın potansiyel mide koruyucu özelliğe sahip oldukça güvenli bir madde olduğu belirtilmektedir. Oral yolla alınan fucoidan mide duvarını koruyarak ülser gelişimini azaltmaktadır. *Helicobacter pylori* bakterisinin mideye tutunması azalır ve bu bakterinin enfeksiyonlarına karşı antiülser etki göstererek önemli bir madde olduğu vurgulanmaktadır (Itsuko et al., 1995). Fucoidanın insan mide hücre kültüründe anti kanser etkisinin araştırıldığı çalışmada; normal hücrelere herhangi olumsuz bir etkisi olmaksızın kanserli hücrelerin büyümesini engellediği gösterilmiştir (Kawamoto et al., 2006).

## 1.2. Fucoidanın Antioksidan Özellikleri

Hidroksil radikalleri, süperoksit radikalleri, peroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) hücrelerde başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotikler ve özellikle çevresel kirleticilerin metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve yıkım tepkimelerinde oluşmaktadır. Hücrelerde bu prooksidanlara karşı oluşturulan antioksidan sistem arasındaki dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile DNA, lipidler, proteinler gibi önemli biyomoleküllere zarar vermektedir (Cooke et al., 2003). Oksidatif stresin, Alzheimer, parkinson, amiyotrofik lateral skleroz ve huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ile kanser, ateroskleroz ve romatoid artrit dahil olmak üzere çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Lin & Beal, 2006).

**Antioksidanlar hücrelerde** serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen moleküllerdir. Hücrelerde antioksidan sistem mekanizmalarına göre, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) gibi enzimleri içerir ve serbest radikaller ile reaksiyona girerek daha az zararlı hale dönüşmesini sağlarlar. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise serbest radikalleri yakalayarak radikal zincir reaksiyonlarını kırarak biyomoleküllere zarar vermesini engellerler. Enzimatik olmayan antioksidanlar; endojen kaynaklı glutatyon (GSH), ubikinon, bilirubin ve ekzojen kaynaklı askorbat (C vitamini), tokoferol (E vitamini) ve beta karoteni kaspamaktadır (Özcan et al., 2015).

Kahverengi makroalglerden elde edilen sülfatlanmış polisakaritlerin canlı organizmalarda oksidatif hasarın önlenmesinde, serbest radikal temizleyiciler olarak önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Patel, 2012). Sülfatlanmış polisakarit olan fucoidanın serbest radikal aracılı hastalıkları önlemede doğal bir antioksidan olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu da bildirilmektedir (Sanjeewa et al., 2018). Fucoidanın antioksidan özelliğe sahip olduğu *in vitro* ve *in vivo* farklı çalışmalarla belirlenmiştir.

Xue ve ark., tarafından yapılan çalışmada düşük ve yüksek molekül ağırlıklı fucoidanın antioksidan etkisi karşılaştırılmıştır. İnsan kan plazmasından elde edilen lipidler (LDL) 2,2-Azobis dihidroklorür (AAPH) ve Cu<sup>2+</sup> kullanılarak oksidasyona uğratılmış ve düşük molekül ağırlıklı fucoidanın TBARS miktarını yüksek molekül ağırlıklı fucoidana göre önemli düzeyde azalttığı ve güçlü antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Xue et al., 2001).

De Souza ve ark., tarafından yapılan çalışmada kahverengi makroalg türlerinden elde edilen fucoidan ile ve kırmızı makroalg türlerinden elde edilen sülfatlanmış polisakaritler olan karregenaların antioksidan etkisi süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit temizleme kapasiteleri değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. Fucoidanın karregenalara göre radikal temizleme kapasitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (de Souza et al., 2007).

Park ve ark., iki farklı hücre kültüründe (PS-12 ve MC-IXC) fucoidanın hidrojen peroksit indüklü nörotoksisteye karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak fucoidanın hidrojen peroksit indüklü oksidatif strese karşı güçlü antioksidan etki göstererek mitokondrial fonksiyonların ve AChE inhibisyon etkisinin regülasyonu ile nörotoksisteyi engellediği belirlenmiştir (Park et al., 2018). *In vitro* çalışmalarda fucoidanın lipoksijenaz inhibisyonu, DDPH (2,2-difenil-1-pikril hidrozil) temizleyici etkisi, nitrojen oksit inhibisyon etkisi, hidroksil radikali temizleyici etkisi, demir şelatlayıcı etkisi ve indirgeyici gücü değerlendirilmiş ve sonuç olarak güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Paul, 2014).

Fucoidanın diyabetik ratlarda serum karaciğer ve dalakta lipid peroksit (LPO) artışını engelleyerek antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir (Zhang, 2003).

Meenakshi ve ark., tarafından ratlarda etanol intoksikasyonunda antioksidan olarak hepatotoksisteye karşı fucoidanın koruyucu etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak karaciğer dokusunda fucoidanın lipid peroksidasyonunu azalttığı ve enzimatik antioksidanları artırdığı böylece oksidatif stresi engelleyerek etanol intoksikasyonunda koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Meenakshi et al., 2014).

Heeba ve Morsy tarafından fucoidanın ratlarda deneysel oluşturulan alkole bağlı olamayan yağlı karaciğer hastalığında (NAFLD) terapötik etkisi farklı parametreler analiz edilerek araştırılmıştır. Sonuç olarak fucoidanın karaciğer indeksi, serum karaciğer enzim aktiviteleri, serum total kolesterol ve trigliserid düzeylerini azalttığı ayrıca hepatik MDA (malondialdehid), nirtik oksit düzeylerini azalttığı ve hepatik GSH (glutatyon) düzeyini artırdığı belirlenmiş ve güçlü antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Heeba & Morsy, 2015).

Meenakshi ve ark., tarafından farelerde Parkinsonu indükleyen MPTP intoksikasyonunda fucoidanın nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak fucoidanın ROS (reaktif oksijen türleri) indüklü oksidatif stresi engelleyerek güçlü antioksidan etki ile beyin farklı bölgelerinde nöronları koruduğu belirlenmiştir (Meenakshi et al., 2016).

## Sonuç

Vücutta normal metabolizma ve ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında oluşan serbest radikal türlerinin başta kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kalp-damar hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın oluşumunda rol alması fucoidan gibi doğal antioksidanların etkileri ile ilgili çalışmaların önemini artırmıştır. Fucoidanın serbest radikal temizleme kapasitesi ile güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile ortaya konmuştur. Antioksidan kapasitenin düşük moleküler ağırlıklı ve sülfat içeriği yüksek olan türlerde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Genel olarak suda çözünüyor olması, diğer biyoaktif özellikleri ile birlikte antioksidan kapasitesinin yüksek olması, doğadan fazla miktarlarda ve kolay elde edilebiliyor olması nedeniyle fucoidan son yıllarda Biyoteknolojik ve Farmakolojik araştırmalarda araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli bir bileşik olmuştur.

## KAYNAKLAR

- Ahmad TBS, 2015. *Methods for quantification and extraction of fucoidan, and quantification of the release of total carbohydrate and fucoidan from the brown algae Laminaria hyperborea*: NTNU.
- Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, et al., 2005. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *American journal of hematology* **78**, 7-14.
- Atashrazm F, Lowenthal R, Woods G, Holloway A, Dickinson J, 2015. Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine drugs* **13**, 2327-46.
- Berteau O, Mulloy B, 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **13**, 29R-40R.
- Cecere E, Petrocelli A, Saracino OD, 2000. *Undaria pinnatifida* (Fucophyceae, Laminariales) spread in the central Mediterranean: its occurrence in the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea, southern Italy). *Cryptogamie Algologie* **21**, 305-9.
- Chandía NP, Matsuhiro B, 2008. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules* **42**, 235-40.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* **17**, 1195-214.
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, et al., 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **17**, 541-52.
- De Souza MCR, Marques CT, Dore CMG, Da Silva FRF, Rocha HaO, Leite EL, 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *Journal of Applied Phycology* **19**, 153-60.
- Dobashi K, Nishino T, Fujihara M, Nagumo T, 1989. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydrate research* **194**, 315-20.
- Doh-Ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, Iha M, 2007. Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**, 2274-7.
- Fujimura T, Shibuya Y, Moriwaki S, et al., 2000. Fucoidan is the active component of *Fucus vesiculosus* that promotes contraction of fibroblast-populated collagen gels. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **23**, 1180-4.
- Han Y-S, Lee JH, Lee SH, 2015. Antitumor effects of fucoidan on human colon cancer cells via activation of Akt signaling. *Biomolecules & therapeutics* **23**, 225.

- Heeba GH, Morsy MA, 2015. Fucoïdan ameliorates steatohepatitis and insulin resistance by suppressing oxidative stress and inflammatory cytokines in experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Environmental toxicology and pharmacology* **40**, 907-14.
- Itsuko K, Hideyuki S, Masato N, Shusuke H, Haruji S, Teruo Y, 1995. Antiulcer agent and adhesion inhibitor for Helicobacter pylori. *Eur. Pat. EP0645143*.
- Kawamoto H, Miki Y, Kimura T, *et al.*, 2006. Effects of fucoïdan from Mozuku on human stomach cell lines. *Food science and technology research* **12**, 218-22.
- Kylin H, 1913. Zur Biochemie der Meeresalgen. *Hoppe-Seyler s Zeitschrift für physiologische Chemie* **83**, 171-97.
- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R, 2008. Fucoïdan: structure and bioactivity. *Molecules* **13**, 1671-95.
- Li F, Tian T, Shi Y, Liu Y, Zhang S, 1995. Study on anti-virus effect of fucoïdan in vitro. *Baiqiuen Yike Daxue Xuebao* **21**, 255-7.
- Lin MT, Beal MF, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787.
- Liu J, Zheng F, Liu Y, 2008. Effect of fucoïdan on renal interstitial fibrosis in adenine-induced chronic renal failure in rats: 158. *Nephrology* **13**.
- Mandal P, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B, 2007. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **18**, 153-62.
- Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T, 2005. Suppression of Th2 immune responses by mekabu fucoïdan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. *International archives of allergy and immunology* **137**, 289-94.
- Meenakshi S, Umayaparvathi S, Saravanan R, Manivasagam T, Balasubramanian T, 2014. Hepatoprotective effect of fucoïdan isolated from the seaweed *Turbinaria decurrens* in ethanol intoxicated rats. *International Journal of Biological Macromolecules* **67**, 367-72.
- Meenakshi S, Umayaparvathi S, Saravanan R, Manivasagam T, Balasubramanian T, 2016. Neuroprotective effect of fucoïdan from *Turbinaria decurrens* in MPTP intoxicated Parkinsonic mice. *International Journal of Biological Macromolecules* **86**, 425-33.
- Nagamine T, Hayakawa K, Kusakabe T, *et al.*, 2009. Inhibitory effect of fucoïdan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. *Nutrition and cancer* **61**, 340-7.
- Nishino T, Aizu Y, Nagumo T, 1991. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis research* **64**, 723-31.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z, 2015. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Invest* **6**, 331-6.
- Park SK, Kang JY, Kim JM, *et al.*, 2018. Protective effect of fucoïdan extract from *Ecklonia cava* on hydrogen peroxide-induced neurotoxicity. *J. Microbiol. Biotechnol* **28**, 40-9.
- Patel S, 2012. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *3 Biotech* **2**, 171-85.
- Paul JJP, 2014. In Vitro anti-oxidant activity of fucoïdan extracted from *Padina distromatica* Hauck (brown seaweed) from Hare Island, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *American Journal of Biological and Pharmaceutical Research* **1**, 151-5.
- Percival E, McDowell RH, 1967. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.
- Sanjeewa KA, Kang N, Ahn G, Jee Y, Kim Y-T, Jeon Y-J, 2018. Bioactive potentials of sulfated polysaccharides isolated from brown seaweed *Sargassum* spp in related to human health applications: A review. *Food hydrocolloids* **81**, 200-8.
- Schaeffer DJ, Krylov VS, 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety* **45**, 208-27.
- Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, Kim S-K, 2013. Brown seaweed fucoïdan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules* **60**, 366-74.
- Sezer AD, Hatipoglu F, Cevher E, Oğurtan Z, Bas AL, Akbuğa J, 2007. Chitosan film containing fucoïdan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Aaps Pharmscitech* **8**, E94-E101.
- Veena CK, Josephine A, Preetha SP, Varalakshmi P, Sundarapandiyam R, 2006. Renal peroxidative changes mediated by oxalate: the protective role of fucoïdan. *Life sciences* **79**, 1789-95.

- Xue C-H, Fang Y, Lin H, *et al.*, 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* **13**, 67-70.
- Yamasaki-Miyamoto Y, Yamasaki M, Tachibana H, Yamada K, 2009. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 8677-82.
- Zhang Q-B, 2003. Studies on antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*. *Chin Tradit Herbal Drugs* **34**, 824-6.
- Zhang Q, Li N, Zhao T, Qi H, Xu Z, Li Z, 2005. Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active Heymann nephritis. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **19**, 50-3.

DRAFT



## Manyetik, fotokatalitik polimer mikrokürelerle sentetik reaktif yeşil 19 boyar maddesinin sulu çözeltilerden uzaklaştırılması ve fizikokimyasal parametrelerin incelenmesi

Şahin Özel, Ali Kara

<sup>1</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

[sahinozel@uludag.edu.tr](mailto:sahinozel@uludag.edu.tr)

### Özet

Bu çalışmanın amacı, yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip manyetik polimerik mikroküreleri sentezlemektir. Bu kompozit malzemeler sentezlendiğinde, boyarmaddelerin sulu çözeltilerden adsorpsiyon yoluyla uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Tekstil endüstrisinde salınan atık suyun çoğunluğunu azo grupları içeren reaktif boyarmaddeler oluşturmaktadır. Klasik arıtma yöntemleri, boyarmaddelerin atık sudan çıkarılması için yetersizdir. Bu amaçla, adsorpsiyon işlemi ile boyarmaddenin çıkarılması amaçlanmaktadır. Optimum adsorpsiyon koşullarını belirlemek için başlangıç pH değeri, boya konsantrasyonu, adsorban konsantrasyonu gibi farklı parametreler belirlenmiştir.

pH 2-12 çalışmasında pH 3'te maksimum adsorpsiyon gözlemlendi. Optimum konsantrasyon olarak belirlenen 50 ppm boyarmadde solüsyonunun adsorpsiyon miktarı, pH 3'te 37,50 mg/g'dır. Adsorpsiyon dengesinin süresi 120 olarak belirlendi. dakika.

Adsorpsiyonun uyumlu olduğu izotermi belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri kullanılmış ve adsorpsiyonun her iki izoterm modeline de uygun olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Reaktif yeşil 19, Adsorpsiyon, Manyetik polimer

### Removal of textile dyestuffs and physicochemical parameters by magnetic polymers with photocatalytic properties

#### Abstract

The aim of this study is to synthesize polymorphic spheres in magnetic form with high adsorption capacity. With these composite materials synthesized, it is intended to remove the dyestuffs from the aqueous medium by selective adsorption. The majority of the wastewater released in the textile industry is composed of dyes containing azo groups. Classical treatment methods are insufficient to remove dyestuffs from waste water. For this purpose, it is aimed to remove dyestuff with adsorption process.

Different parameters such as initial pH value, dye concentration, adsorbent concentration were determined to determine optimum adsorption conditions.

In the study of pH 2-12 maximum adsorption was observed at pH 3. The adsorption amount of 50 ppm dyestuff solution determined as the optimum concentration was 37,50 mg / g at pH 3. The time to equilibrium of adsorption was determined as 120 minutes.

To determine the isotherm where adsorption is compatible, Langmuir and Freundlich adsorption isotherm models were used and adsorption was observed to be suitable for Langmuir isotherm model.

**Keywords:** Reactive Green 19, Adsorption, Magnetic polymer.

### GİRİŞ

Tekstil boyarmaddelerin dünyada yıllık üretimi 700.000 ton civarında olup bunların % 50'sini azo grubu (–N=N–) içeren boyarmaddeler oluşturmaktadır (Mahmoodia, N.M. ve ark., 2005) . Atık sulardaki reaktif boyarmaddeler toksik ve biyodegradasyonları zor olduğundan, fiziksel yöntemlerle kolayca giderilemezler (Aissani-Benissada F., Soualab A., 2009).

Renkli boyarmaddelerin çevreye salınması, estetik kirliliğin yanında deniz ve göllerde birikerek canlı organizmalar için kanserojenik etki göstermektedirler (Bahnmann W. ve ark. 2007).

Atık sularda bulunan boyarmaddeler hidrolizle, oksidasyonla, veya diğer kimyasal maddelerle reaksiyona girerek tehlikeli yan ürün oluşturmaktadır. Günümüzde ise atık su uygulamalarında etkili bir şekilde kullanılan ve geleneksel yöntemlere alternatif bir yol olan ileri oksidasyon teknolojileri vardır. İleri oksidasyon teknolojilerinin temeli, çok aktif tanecikler olan •OH radikalleri üretmeye dayanır. •OH radikalleri, birçok

organik kirleticiyi seçimsiz ve hızlı bir şekilde oksitleyebilen, elektrofilik, aktif oksijen parçacıklarıdır (Gurkan, Y.Y. ve ark., 2012)

Bu yöntem, fazla enerji gerektirmeyen, ortam koşullarında gerçekleşen, birçok organik kirleticiyi mineralize edebilen ve ilave kimyasal olarak sadece atmosferik oksijeni kullanan etkili bir yöntemdir. Bu yüzden diğer yöntemler arasında boya gideriminde tercih edilen bir yöntemdir (Pichat P, 1997).

Bu çalışmada, fotokatalitik aktivitesi yüksek olan manyetik özelliğe sahip polimer kompozitlerin sentezlenmesi hedeflenmektedir.

## **MATERYAL VE METOT DENEYSEL**

Fotokatalitik manyetik mikroküreleri, süspansiyon polimerizasyonu ile elde edildi. Çapraz bağlı, gözenekli mikrokürelerin sentezinde kullanılan bu yöntemde bir dispersiyon fazı, bir de organik faz yer almaktadır. Dispersiyon fazı; 50 ml saf suda PVA stabilizöründen 0.2 gramının karıştırıcı ısıtıcıda çözünmesiyle oluşturulmuştur. Organik faz ise; 0,1 g başlatıcı Benzoil peroksit 10 mL gözenek yapıcı toluende 5 dakika karıştırılarak çözünmesi sağlanıp 5,0 mL çapraz bağlayıcı ve monomeri eklenip homojen faz elde edilinceye kadar karıştırılarak hazırlanmıştır. 65°C sabit sıcaklıkta, kapalı silindirik pyrex camdan yapılmış polimerizasyon reaktöründe (Electromantle Ceketli Isıtıcı, İngiltere) manyetik karıştırıcı yardımıyla sistem karıştırılarak sırasıyla dispersiyon fazı, 1,0 g manyetik, organik faz eklenerek karıştırılmıştır.

Polimerizasyon, 65°C sıcaklıkta 4 saat, 75°C sıcaklıkta 2 saat 600 rpm karıştırma hızında sürdürüldü. Belirtilen süre sonrasında dispersiyon fazı dekante edildi. Elde edilen polimer mikroküreler, su ve etil alkol karışımında bir gün bekletildi. Sıvı karışım dekante edildi. Tepkimeye girmeyen monomer veya çözücünün uzaklaştırılması amacıyla polimer mikroküreler su ve etil alkolle yıkandı. Yıkama işleminden sonra da polimer mikroküreler süzülüp vakum etüvünde 70°C sıcaklıkta 48 saat süre ile kurutuldu.

Fotokatalitik, manyetik mikrokürelerin yüzey yapısı, yüksek büyütme sağlaması nedeniyle taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Carl Zeiss Evo 40, Cambridge, İngiltere) ile incelendi. İlk adımda mikroküreler, iletken bir yapıştırıcı yardımıyla SEM plakası üzerine tutturuldu. Sonra, mikrokürelerin yüzeyi vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak iletken hale gelmesi sağlandı ve örnek SEM örnek yuvasına yerleştirilerek fotoğrafları çekildi.

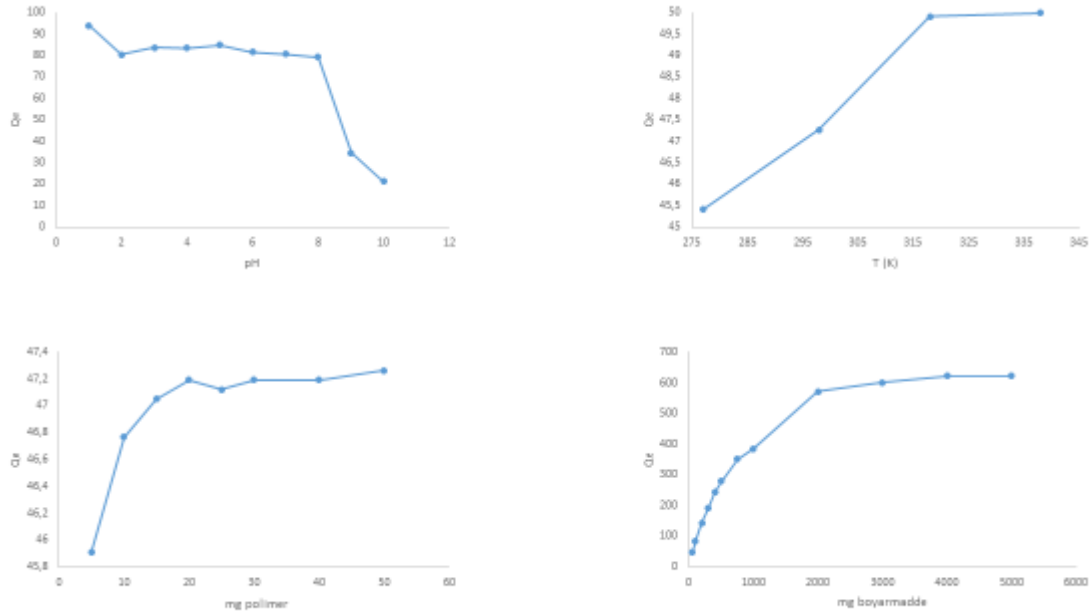
Fotokatalitik dekolorezasyon çalışmaları RG19 boyarmaddesinin sulu çözeltisi hazırlanarak yapılmıştır. Optimum pH belirlenmiş İzoterm çalışmaları için farklı konsantrasyonlarda adsorpsiyon miktarları belirlenmiştir.

## **DENEYSEL SONUÇLAR/TARTIŞMA**

Fotokatalitik, manyetik mikrokürelerin yüzey morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülendi. Sentezlenen bu mikrokürelerin geniş yüzey alanına sahip olması, adsorpsiyon için son derece önemli bir etkidir.

Maksimum adsorpsiyon miktarı pH 2-10 arasında pH 3'de elde edildi. Başlangıç konsantrasyonu 50 ppm iken adsorpsiyon miktarı pH 3'de 41,65 mg/g olarak elde edildi. Adsorpsiyon dengeye 90 dakikada gelmiştir. Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri uygulandı. Adsorpsiyonun her iki izoterm modeline uygun olduğu görüldü.

## Tablolar ve Şekiller



Şekil 1. Adsorpsiyona etki eden parametreler

## GENEL SONUÇLAR

Fotokatalitik manyetik mikroküreleri; etilen glikol dimetakrilat (EG), Vinil imidazol (VIM), Benzoil peroksit ve stabilizör poli(vinil alkol) (PVA) kullanılarak süspansiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. RG19'un polimer kompozitlere adsorpsiyonunun Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin her ikisine de uygun olması, adsorbanın kısmen heterojen yüzey alanına sahip olduğunu göstermektedir.

## SONUÇ

Yüzey alanı geniş fotokatalitik, manyetik formdaki polimer kompozitlerle atık sulardan boya giderimi ve dekolizasyonu yüksek verimle gerçekleştirilmiştir. Polimer adsorbanlar istenilen fonksiyonel gruplarla kolayca modifiye edildiğinden spesifik ayırma için büyük önem arz etmektedir. Çapraz bağlı, gözenekli kompozit malzemelere fotokatalizör doplanmasıyla adsorpsiyona ilaveten fotokatalitik etkiyle bu süreç daha hızlı ve kolay bir şekilde yapılmaktadır.

## TEŞEKKÜR

This work was partly supported by the Research Fund of The University of Uludag Project Number: OUAP(F)-2019/9.

## KAYNAKLAR

- Aissani-Benissada F, Soualahb A 2009. Removal of basic yellow dye from aqueous solutions by sorption onto reed as an adsorbent, *Desalination and Water Treatment*, 54:6, 1727-1734
- Bahnemann W, Muneer M, Haque MM, 2007. Titanium dioxide-mediated photocatalysed degradation of few selected organic pollutants in aqueous suspensions, *Catalysis Today*, 124:133–148.
- Gurkan YY, Turkten N, Hatipoglu A, Cinar Z, 2012. Photocatalytic degradation of cefazolin over N-doped TiO<sub>2</sub> under UV and sunlight irradiation: Prediction of the reaction paths via conceptual DFT, *Chemical Engineering Journal*, 184:113– 124.

Mahmoodia NM, Arami M, Limaee NY, Tabrizi NS, 2005. Decolorization and aromatic ring degradation kinetics of Direct Red 80 by UV oxidation in the presence of hydrogen peroxide utilizing TiO<sub>2</sub> as a photocatalyst, *Chemical Engineering Journal*, 112:191–196.

Pichat P, 1997). Photocatalytic degradation of aromatic and alicyclic pollutants in water: By-products, pathways and mechanisms, *Wat. Sci. Tech.*, 35:73-78.

DRAFT

## Hünnap Ağacı (*Zizyphus zizyphus*) Yaprak ve Meyve Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özellikleri

Gamze Yılmaz<sup>1</sup>, Neşe Özdiç<sup>1\*</sup>, Kadir Gürbüz Güner<sup>2</sup>, Hasan Murat Velioglu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

<sup>2</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: mvelioglu@nku.edu.tr

### Özet

Son yıllarda doğal antioksidan ve antimikrobiyal maddelere olan ilgi artmıştır. Bunun en önemli sebebi gıda endüstrisinde kullanılan katkı maddeleridir. Gıda ürünlerinde meydana gelen bozulmaları önlemek amacıyla katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda gıda ürünlerinde kullanılan bazı katkıların insan sağlığı üzerine olumsuz etki gösterebileceği belirlenmiştir. Bu durum insanları doğal antioksidan ve antimikrobiyal madde kullanımına yönlendirmiştir. Bu çalışma kapsamında iki farklı çözücü (su ve metanol) kullanılarak elde edilen *Zizyphus* türünün ham meyve, olgun meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal olarak *Aspergillus parasiticus* (DMS 5771), *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28253 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkileri değerlendirildiğinde en yüksek etkiyi ham meyveden elde edilen ekstrakt göstermiştir. Bu ekstraktın küf üzerine 14,12 mm'lik zon çapı, maya üzerine 10,33 mm'lik zon çapı ve bakteri üzerine 13,76 mm'lik zon çapı oluşturacak şekilde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma sonuçları hünnap ağacı ürünlerinin doğal antimikrobiyal madde olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Hünnap, Ekstrakt, Antimikrobiyal

### Antimicrobial Properties of Jujube Tree (*Zizyphus zizyphus*) Leaf and Fruit Extracts

#### Abstract

In recent years, interest in natural antioxidants and antimicrobial substances has increased. The most important reason for this is the additives used in the food industry. Additives are used to prevent spoilage in food products. However, as a result of the researches, it has been determined that some additives used in food products may have negative effects on human health. This has led people to use natural antioxidants and antimicrobial agents. In this study, the effects of extracts from raw fruits, mature fruits and leaves of *Zizyphus* species obtained by using two different solvents (water and methanol) as antimicrobial on *Aspergillus parasiticus* (DMS 5771), *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28253 and *Escherichia coli* ATCC 25922 strain were investigated. When the antimicrobial effects were evaluated, the extract obtained from raw fruit had the highest effect. It was determined that this extract had an antimicrobial effect on mold, forming a zone diameter of 14,12 mm, a zone diameter of 10,33 mm on yeast and a zone diameter of 13,76 mm on bacteria. The results of the study show that jujube tree products have the potential to be used as natural antimicrobial agent.

**Keywords:** Jujube, Extract, Antimicrobial

#### GİRİŞ

Son yıllarda antimikrobiyal maddelere olan ilgi artmıştır. Bunun en önemli sebebi gıda endüstrisinde kullanılan katkı maddeleridir. Gıda ürünlerinde meydana gelen bozulmaları önlemek amacıyla katkı maddeleri kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda gıda ürünlerinde kullanılan bazı katkıların insan sağlığı üzerine olumsuz etki gösterebileceği belirlenmiştir. Bu durum insanları antimikrobiyal madde kullanımına yönlendirmiştir.

İlk çağlardan itibaren antimikrobiyal madde kaynağı olarak bitkiler kullanılmaktadır. Doğada kendiliğinden yetişen bitkiler zengin antioksidan ve antimikrobiyal bileşiklere sahiptirler. Yapılan araştırmalar ve çalışmalar sonucunda bitkilerin sahip olduğu bu özellikler bakımından birçok alanda yarar sağlayabileceği belirlenmiştir. Dünya üzerinde yetişen yerel ve endemik bitki türleri bu amaç doğrultusunda kullanılmaktadır.

Ülkemiz bitki türleri açısından zengin bir flora sahiptir. Ülkemizde yerel ve endemik olarak yetişen birçok bitki türü bulunmaktadır. Hünnap bitkisi ülkemizde yetişen yerel bir bitki türüdür. Hünnap meyvesi ve yaprakları antioksidan ve antimikrobiyal bileşenlere içermesinden dolayı birçok alanda yararlanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı Hayrabolu İlçesi Karabürçek Mahallesi sınırları içinde doğal olarak yetişen *Rhamceae* familyasına ait *Zizyphus* türünün olgunlaşmamış meyve, olgun meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemektir. Çalışma kapsamında aynı bitki türünün üç materyali (olgunlaşmamış meyve, olgun meyve ve yaprakları) kullanılmıştır.

*Zizyphus* türünün olgunlaşmamış meyve, olgun meyve ve yapraklarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkileri *Aspergillus parasiticus* (DMS 5771), *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28253 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkileri araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmada kullanılan materyal Hayrabolu ilçesinin Karabürçek Mahallesi'nden toplanmıştır. 41, 234° kuzey enlemi 26,994° doğu boylamında yer almaktadır. Karabürçek Mahallesi 164 metre rakıma sahiptir. Karabürçek Mahallesi'nden geleneksel tarım ve hayvancılık yapılmaktadır.

Doğal olarak yetişen 5 adet ağaçtan olgunlaşmamış meyveleri Temmuz 2017 – Ağustos 2017 ayları arasında; olgunlaşan meyveler ise Eylül 2017 - Ekim 2017 ayları arasında toplanmıştır. Yaprak örnekleri ise Mayıs 2017 – Haziran 2017 ayları arasında toplanmıştır. Sürdürülebilirlik ilkesine göz önünde tutularak toplama işlemi yapılmıştır. 5 farklı ağaçtan toplanan olgunlaşmamış meyve numuneleri her biri 500 – 600 g arasında; olgun meyve numuneleri 400 – 500 g arasında; yaprak numuneleri 150 – 250 g arasındadır. Toplanan yaprak numuneleri temiz bir zemin üzerinde oda sıcaklığı koşullarında 7 gün boyunca kurutulmuştur. Toplanan olgunlaşmamış ve olgun meyve numuneleri çekirdekleri ayıklandıktan sonra 55°C'de inkübatör de kurutulmuştur. Ağaçlar numaralandırılarak (1, 2, 3, 4 ve 5) kodlanmıştır.

Bu çalışmada *Escherichia coli* ATCC 25922, *Aspergillus parasiticus* DMS 5771 ve *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28253 suşları örneklerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amacıyla test mikroorganizmaları olarak kullanılmıştır. Kullanılan standart *Escherichia coli* ATCC 25922 Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nden; *Aspergillus parasiticus* DMS 5771 ve *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC28253 suşları Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki kültür koleksiyonunda temin edilmiştir.

Çalışmada iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır, bunlar su ve metanol ekstraksiyon yöntemidir.

### 1.Su Ekstraksiyon Yöntemi

Toplanan taze meyvelerin çekirdekleri ayıklandıktan sonra küçük parçalara kesilmiştir. Numunelerin her birinden 10 g hünnap meyvesi alınarak 10 mL ultra saf su (1/1 w/w oranında) eklenerek olgunlaşmamış meyve numunelerini 5 dakika; olgun meyve numuneleri 3 dakika boyunca stomacher ile ezilerek homojen hale getirilmiştir. Oluşan ezmeden 10 g alınarak 50 mL ultra saf su eklenerek bir karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışım 25°C'de 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş, elde edilen ekstrakt filtre kağıdından süzülmuştür. Süzülen ekstrakt falkon tüplerine aktararak ağızları parafilmle etrafı alimünyum folyo ile sarılarak analiz edilinceye kadar - 18 °C'de muhafaza edilmiştir (Yaşa 2016). Toplanan yapraklar 25°C'de gölgede kurutulduktan sonra değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen yaprak numunelerinden 10 g alınarak 100 mL kaynanmış su eklenerek 30 dakika boyunca ısıtıcıda kaynatılmıştır. Elde edilen ekstrakt soğuduktan sonra filtre kağıdından süzülmuştür. Süzülen ekstrakt falkon tüplerine aktararak ağızları parafilmle etrafı alimünyum folyo ile sarılarak analiz edilinceye kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir (Bektaş 2011).

### 2.Metanol Ekstraksiyon Yöntemi

Toplanan meyvelerin çekirdekleri ayıklandıktan sonra küçük parçalara kesilerek 55°C'de inkübatörde kurutulmuştur. Kurutulan meyve numunelerinin her birinden 10 g alınarak 100 mL sulu metanol (metanol: su 80:20 v/v) eklenmiştir. Orbital çalkalayıcı da 30°C'de 6 saat 100 rpm'de ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar filtre kağıdından süzülmuştür. Süzülen ekstrakttan metanolü uzaklaştırmak için ekstraktlar evaporatörde vakum altında 40°C'de tutulmuştur. Evaporasyondan sonra falkon tüplerine aktararak ağızlarına parafilmle etrafı alüminyum folyo ile sarılarak analiz edilinceye kadar +4°C'de saklanmıştır (Uçkaya 2011). Toplanan yapraklar 25°C'de gölgede kurutulduktan sonra değirmende öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen yaprak numunelerinden 10 g alınarak 100 mL sulu metanol (metanol: su 80:20 v/v) eklenmiştir. Orbital çalkalayıcı da oda sıcaklığında 24 saat 100 rpm'de tutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar filtre kağıdından süzülmuştür. Süzülen ekstrakttan metanolü uzaklaştırmak için ekstraktlar evaporatörde vakum altında 40°C'de tutulmuştur. Evaporasyondan sonra falkon tüplerine aktararak ağızlarına parafilmle etrafı alimünyum folyo ile sarılarak analiz edilinceye kadar +4°C'de saklanmıştır (Naz ve ark. 2012).

### 3.Hünnap Meyvesi ve Yapraklarından Elde Edilen Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.1 Küf - Maya - Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Küf (*Aspergillus parasiticus* DSM 5771 ) ve maya (*Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28253) süspansiyonu için örnekleri öze yardımı ile alarak steril kabinde bek alevinin altında yatık agar olarak hazırlanan PDA besiyerine ekimi yapılan kültürler 25°C’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında yatık agarda gelişen kültürlerin üzerine 10 ml % 0.01 Tween 80 içeren serum fizyolojik ilave edilerek 1 dakika boyunca tüp vortekslenerek süspansiyon hazırlanmıştır (Güner 2014). Deney tüplerinde 10 mL olacak şekilde aseptik koşullarda hazırlanan Nutrient Broth besiyerlerinin soğumasının ardından *E.coli* ATCC 25922 suşu 24 saat 37°C’de aşılama yapılarak inkübe edilmiştir (Benli ve Yiğit 2005).

#### 3.2 Hünnap Meyvesi ve Yapraklarının *In Vitro* Antimikrobiyal Etki Kapasitesi Ölçümü

Petri kaplarına yaklaşık 15 mL olacak şekilde aseptik koşullarda dökülen PDA besiyerlerinin katılaşması ve soğumasının ardından önceden hazırlanan maya ve küf süspansiyonlarından 100 µL mikropipet yardımı ile alınarak PDA besiyeri üzerine yüzeye yayma yoluyla ekimi gerçekleştirilmiştir. Besiyerinin inokulumu emmesi için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Daha önceden steril edilmiş diskler üzerine 15 - 20 - 25 µL ekstrakt emdirilmiştir. Ekstrakt emdirilen diskler petri kaplarının ortasına yerleştirilerek 26.5°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra meyve ve yaprak ekstraktlarının küf - maya gelişimi üzerine etkisi kumpas ile ölçümü yapılmıştır. *E.coli* bakterisi 24 saat 37°C’de aşılama yapılarak inkübe edilmiştir. 10<sup>-1</sup> dilüsyon yapılan aktif bakteri kültürlerinden 100 µL mikropipet yardımı ile alınarak Nutrient agar besiyeri üzerine yüzeye yayma yoluyla ekimi gerçekleştirilmiştir. Besiyerinin bakteri inokulumu emmesi için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Daha önceden steril edilmiş diskler üzerine 15 - 20 - 25 µL ekstrakt emdirilmiştir. Ekstrakt emdirilen diskler petri kaplarının ortasına yerleştirilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Benli ve Yiğit 2005). 24 saat sonra meyve ve yaprak ekstraktlarının bakteri gelişimi üzerine etkisi kumpas ile ölçümü yapılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 1.Hünnap Meyvesi ve Yapraklarının *In Vitro* Ortamda Antimikrobiyal Etki Kapasitesinin Sonuçları

Numune (Ekstrakt Oranları)	15 µL	20 µL	25 µL
Olgun Meyve (Metanol)	8,51±0,19 <sup>b</sup>	12,28±0,45 <sup>a</sup>	13,30±0,70 <sup>a</sup>
Olgunlaşmamış Meyve (Metanol)	12,09±0,98	13,19±0,28	14,81±0,41
Yaprak (Metanol)	9,69±0,66 <sup>b</sup>	10,48±0,75 <sup>ab</sup>	13,05±0,01 <sup>a</sup>
Olgun Meyve (Su)	12,87±1,06	12,00±0,96	12,04±0,30
Olgunlaşmamış Meyve (Su)	14,12±0,57	11,93±0,77	11,55±0,52
Yaprak (Su)	12,80±0,29	12,56±0,05	12,42±0,46

\*Elde edilen sonuçlar ortalama değer ± standart hata olarak verilmiştir. Farklı üst indis harflerle gösterilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır (P < 0,05).

Laboratuvar şartlarında elde edilen hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin metanol ve su ekstraktlarından 15µL– 20µL– 25µL’lik miktarlar kullanılarak *Aspergillus parasiticus* DSM 5771küf suşu üzerine etkilerinin inhibisyon çapları verilmiştir. *A. parasiticus* üzerine etkileri incelendiğinde; en yüksek etkiyi olgunlaşmamış meyve metanol ekstraktı ile olgunlaşmamış meyve su ekstraktı olduğu tespit edilmiştir. 25 µL’lik olgunlaşmamış meyve metanol ekstraktının zon çapı 14,81 mm; 15 µL’lik olgunlaşmamış meyve su ekstraktının zon çapı 14,12 mm olduğu görülmektedir. Çizelgeler incelendiğinde olgunlaşmamış meyve örneklerinden elde edilen hem metanol hem de su ekstraktlarının *A. parasiticus* küfüne üzerine en yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca yaprak örneklerinin su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın 15µL - 20µL - 25µL’lik miktarları *A. parasiticus* küfüne üzerine etkisi eşit olduğu görülmektedir.

Laboratuvar ortamında elde edilen hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin hem metanol ekstraksiyonu hem de su ekstraksiyonu ile elde ekstraktlarının *Aspergillus parasiticus* DSM 5771küf suşu üzerine etkisinin orta düzeyde olduğu görülmektedir. Kekik, biberiye ve altın çiçek gibi bitkiler olması *Aspergillus parasiticus* küfüne üzerine etkileri yüksek oranda etki etmesi tıbbi aromatik bitki grubun yer aldığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kekik, biberiye ve altınçiçek bitkilerinin inhibe etkisinin

yüksek olması *Aspergillus parasiticus* küfünün farklı suşlarının kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

## 2.Hünnap Meyvesi ve Yapraklarından Elde Edilen Ekstraktların Maya Gelişimi Üzerine Etkileri Zon Çapları

Numune (Ekstrakt Oranları)	15 µL	20 µL	25 µL
Olgun Meyve (Metanol)	9,12±0,41	9,12±0,46	9,50±0,10
Olgunlaşmamış Meyve (Metanol)	9,80±0,64	10,02±0,16	9,97±0,54
Yaprak (Metanol)	8,88±0,42 <sup>b</sup>	9,59±0,19 <sup>ab</sup>	10,33±0,24 <sup>a</sup>
Olgun Meyve (Su)	7,13±0,05 <sup>c</sup>	8,34±0,22 <sup>b</sup>	9,62±0,09 <sup>a</sup>
Olgunlaşmamış Meyve (Su)	8,07±0,04 <sup>b</sup>	8,54±0,29 <sup>b</sup>	9,62±0,10 <sup>a</sup>
Yaprak (Su)	7,11±0,05 <sup>b</sup>	7,39±0,17 <sup>ab</sup>	7,88±0,07 <sup>a</sup>

\*Elde edilen sonuçlar ortalama değer ± standart hata olarak verilmiştir. Farklı üst indis harflerle gösterilen değerler istatistik olarak birbirinden farklıdır (P < 0,05).

Laboratuvar şartlarında elde edilen hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin metanol ve su ekstraktlarından 15µL– 20µL– 25µL'lik miktarlar kullanılarak *Zygosaccharomyces rouxii* mayası üzerine etkilerinin inhibisyon çapları verilmiştir. *Z. rouxii* üzerine etkileri incelendiğinde; en yüksek etkiyi olgunlaşmamış meyve metanol ile yaprak metanol ekstraktı olduğu tespit edilmiştir. 25µL'lik yaprak metanol ekstraktının zon çapı 10,33 mm; 20 µL'lik olgunlaşmamış meyve metanol ekstraktının zon çapı 10,02 mm olduğu görülmektedir. Çizelgeler incelendiğinde olgunlaşmamış meyve metanol ekstraktının (15µL - 20µL - 25µL'lik) *Z. rouxii* üzerine etkisinin eşit olduğu görülmektedir.

Hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin metanol ekstraktlarının *Z. rouxii* ATCC 28253 mayası üzerine daha etkili olduğu görülmektedir. *Z. rouxii* ATCC 28253 mayası ile ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde laboratuvar şartlarında elde edilen hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin metanol ve su ekstraktların düşük etki gösterdiği belirtilmektedir. Bunun nedenin *Z. rouxii* mayasının hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin yapısında bulunan bileşiklere karşı etkilenmediği düşünülmektedir.

## 3.Hünnap Meyvesi ve Yapraklarından Elde Edilen Ekstraktların Bakteri Gelişimi Üzerine Etkileri Zon Çapları

Numune (Ekstrakt Oranları)	15 µL	20 µL	25 µL
Olgun Meyve (Metanol)	9,07±0,63 <sup>b</sup>	14,22±0,44 <sup>a</sup>	13,70±1,15 <sup>a</sup>
Olgunlaşmamış Meyve (Metanol)	13,76±0,33 <sup>a</sup>	13,63±0,09 <sup>a</sup>	11,36±0,71 <sup>b</sup>
Yaprak (Metanol)	12,77±0,52	12,70±0,04	12,45±0,25
Olgun Meyve (Su)	12,10±0,18 <sup>a</sup>	10,72±0,28 <sup>b</sup>	10,40±0,40 <sup>b</sup>
Olgunlaşmamış Meyve (Su)	11,16±0,13	11,58±0,91	9,84±0,18
Yaprak (Su)	7,72±0,01 <sup>c</sup>	8,84±0,27 <sup>b</sup>	10,04±0,00 <sup>a</sup>

\*Elde edilen sonuçlar ortalama değer ± standart hata olarak verilmiştir. Farklı üst indis harflerle gösterilen değerler istatistik olarak birbirinden farklıdır (P < 0,05).

Laboratuvar şartlarında elde edilen hünnap ağacı olgun meyve, olgunlaşmamış meyve ve yaprak örneklerinin metanol ve su ekstraktlarından 15µL– 20µL– 25µL'lik miktarlar kullanılarak *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkilerinin inhibisyon çapları verilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkileri incelendiğinde; en yüksek etkiyi olgun meyve metanol ekstraktı, olgunlaşmamış meyve metanol ekstraktı ve yaprak metanol ekstraktı olduğu tespit edilmiştir. 20 µL'lik olgun meyve metanol ekstraktının zon çapı 14,22 mm, 15 µL'lik olgunlaşmamış metanol meyve ekstraktının zon çapı 13,76 mm ve 15µL'lik yaprak metanol ekstraktının zon çapı 12,77 mm olduğu görülmektedir.



Laboratuvar ortamında üretilen hünnap ağacı yaprak örneklerinden elde edilen ekstraktın farklı meyve ağacı türlerinin yaprak örneklerinden elde edilen ekstraktlar ile karşılaştırıldığında *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerine daha fazla etki göstermesi yaprak örneklerinin yapısında bulunan bileşenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hünnap ağacı olgun meyve ve olgunlaşmamış meyve örneklerinden elde edilen ekstraktların *Escherichia coli* bakterisi üzerine etkileri belirlenmiştir. Litaratür çalışmaları incelendiği farklı meyve ağacı türleri ile karşılaştırıldığında laboratuvar ortamında üretilen hünnap ağacı olgun meyve ve olgunlaşmamış meyve örneklerinden elde edilen ekstraktların *E.coli* bakterisi üzerine etkisi değişkenlik göstermektedir. Bunun nedeni farklı tür meyveler olması, *E. coli* farklı suşu kullanılması, meyve farklı işlemler uygulanması (kayısı için taze ve islimli olması), yetiştirilen bölge ve yetiştirme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

## SONUÇ

Çalışmada hünnap ağacı meyve ve yaprak ekstraktlarının antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması yapılmıştır. Tekirdağ İli Hayrabolu İlçesi Karabürçek Mahallesi'nden temin edilen meyve ve yaprak örneklerinin hem metanol ekstraksiyonu hem de su ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların antimikrobiyal kapasiteleri belirlenmiştir. Her iki yöntemde de elde edilen ekstraktların üç farklı tür mikroorganizma (küf, maya ve bakteri) üzerine etkileri belirlenmiştir. Her iki yöntemde de elde edilen ekstraktların antimikrobiyal kapasite değerleri literatür verileri ile yakın olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda meyve ve yapraklarda elde edilen ekstraktlar antifungal, antimikotik ve antibakteriyal özelliğinin bulunması koruyuculuk etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Bu konu ile ilgili daha fazla araştırma yapılması ve yatırım olanaklarının artırılması meyve ve yaprakların ilaç, baharat ve gıda sanayinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanım olanağı sağlayacaktır. Hünnap bitkisinin yetiştiriciliğinin yapılması tarım alanında yeni bir iş sahasına olanak sağlayacaktır. Aynı zamanda ihtiyaç fazlası ürünlerin dış pazara satılması ekonomimize de katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Bektaş E (2011). *Cotinus coggygria* (Scop.) Bitkisinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.
- Benli M ve Yiğit N (2005). Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3 (8): 1-8.
- Güner K (2014). Çeşitli Aromatik Bitkilerin, Meyve Kurutmada Küf – Maya Gelişimi, Fonksiyonel ve Duyusal Özelliklere Etkileri. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Naz S, Sultana B, Shahid M and Rehman K (2012). Alteration In Antioxidant And Antimicrobial Attributes Of Leaves Of *Zizyphus* Species In Response To Maturation. Journal Of Medicinal Plants Research 7(2): 61-70.
- Uçkaya F (2011). Antalya'da Yetişen *Zizyphus zizyphus*'un Antioksidan Aktivitesi ve Biyokimyasal Bileşiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Konya.
- Yaşa F (2016). Türkiye'de Yetiştirilen Hünnap Meyvesinin Bileşimi ve Meyvenin Kurutulması Sırasında Bileşiminde Meydana Gelen Değişimler. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Denizli.

## Removal of carcinogenic azo dyes from wastewater using calix[8]arene derivative

Ömer Güngör

University of Kocaeli, Advanced Vocational School of Hereke Omer Ismet Uzunyol, Department of Chemistry Technology, Kocaeli, Turkey

Corresponding author e-mail: omer.gungor@kocaeli.edu.tr

### Abstract

This paper presents a study on the removal of azo dyes [Reactive Black 5 (RB5), Trapaeolin 000 (TP), Chicago Sky Blue (CSB), and Evans Blue (EB)] from aqueous solution using new pyrazine-2-carboxylate derivative of calix[8]arene (**3**). The sorption of carcinogenic azo dyes by calix[8]arene derivative **3** indicates that amino group play the important role for the formation of electrostatic interactions and hydrogen bond.

**Keywords:** Calix[8]arenes, Azo dyes, Solid-liquid extraction

### INTRODUCTION

When they are classified according to the chemical structure of dyestuffs, azo dyes are the most important ones. Because azo dyes are equal in number to the total number of other dyestuffs used in industry. In this regard, azo dyestuff class constitutes the largest organic dyestuff class. The use of such a high amount brings many problems (Banafa et al., 2011). In the factory, Filtration systems were very inadequate in the treatment of azo dyes and were given to the environment. These synthetic dyes, which are released to the environment by waste water, constitute approximately 50% of the dyes used. Azo dyes are highly soluble in water due to their chemical structure and can absorb light by chromoform groups. Due to these properties, microorganisms in nature are transformed into aromatic amines by enzymatic reactions in living cells. In addition to, studies in exposed workers have demonstrated that the azoreduction of benzidine-based dyes occurs in human body (Boeninger, 1980). These aromatic amines have toxic, carcinogenic and genotoxicity (mutagenicity) effects (Golka et al., 2004). Recent studies have shown that some azo dyes are bound to the DNA molecule by biochemical activation, sulphate, esterification or acetylation and cause genotoxide (mutagenicity) (Chung, 2000). With the increased awareness of the potential risk for consumers, the European Parliament accepted the 19th amendment of the Council Directive 76/769/EEC and issued the European Directive 2002/61/EC (European Commission, 2002). This directive particularly restricts the marketing and use of azo dyes, which may form any of 22 listed harmful aromatic amines in textile and leather articles after reductive cleavage, and may come into direct and prolonged contact with oral cavity or human skin.

Calixarenes are an important member of supramolecular chemistry. Their rigid conformation enables calixarenes to act as host molecules because of their preformed hydrophobic cavities. Due to this ability to form host-guest type complexes with a variety of organic and inorganic compounds the calixarenes have received increasing attention during the last three decades (Delval et al., 2002).

### MATERIALS AND METHODS

Deionized water passed from Millipore milli Q Plus water purification system was used for the preparation of aqueous solutions. The pH of the solution was adjusted by mixing appropriate amount of HCl and/or NaOH (0.1 M). Salts (NaCl) and azo dyes (Fig. 1) including Reactive Black 5 (RB5), Trapaeolin 000 (TP), Chicago Sky Blue (CSB), and Evans Blue (EB) were purchased from Aldrich or Merck and used without further purification. Pyrazine-2-carbonyl chloride was purchased from Alfa Aesar

#### Synthesis of Compound 3

A mixture of compound **2** (2.0 g, 1.48 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.81 g, 5.90 mmol) and pyrazine-2-carbonyl chloride (0.84 g, 5.90 mmol) were mixture in dry acetone (100 mL). This mixture was refluxed for 48 h under nitrogen atmosphere. After evaporation of solvent, solid residue washed with water. The solid was purified by column chromatography (silica gel, acetone / hexane (1/4)) Yield: 1.97 g (%75). IR: 3071(aromatic. C-H), 2935-2873 (aliph. C-H), 1759 cm<sup>-1</sup>(C=O). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95 (s, 36H, t-Bu), 1.15 (s, 36H, t-Bu), 3.01(s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.23 (d, J = 10,8 Hz, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.21 (d, J = 9,30 Hz, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.89 (s, 8H, ArH), 7.05 (s, 8H, ArH), 8.38 (d, J= 6.5 Hz, 8H, PyzH), 9.11 (s, 4H, PyzH). Cal. for: C<sub>112</sub>H<sub>128</sub>O<sub>12</sub>N<sub>8</sub>: C, 75.65; H, 7.25%; N,

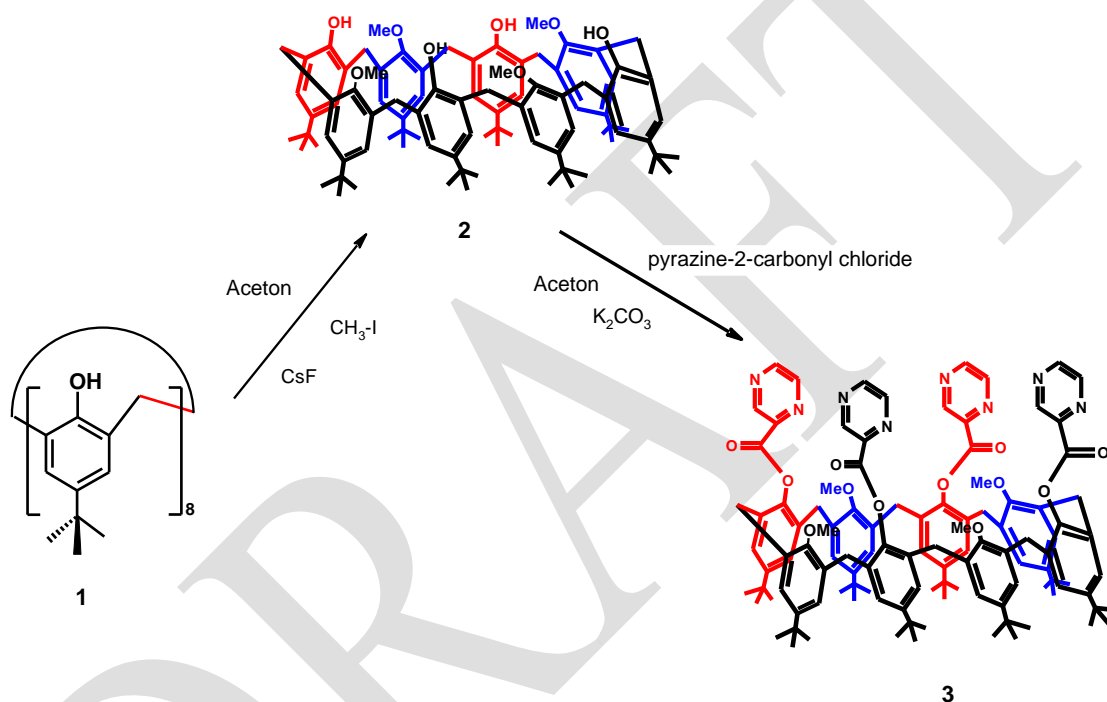
6.30 % Found: C, 77.09; H, 8.36%; N, 6.26. MS (ES<sup>+</sup>), (m/z): Cal. for: C<sub>56</sub>H<sub>64</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>, 1778.26; Found: 1780.03 [M+1]<sup>+</sup>.

### Sorption studies of azo dyes

The first approach was a batch method. 25 mg of the calix[8]arene derivative (as sorbent) was mixed with 10 mL of NaCl (0.2 mol L<sup>-1</sup>) and an aqueous solution of the azo dyes (2 × 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) in a stopped flask at 25 °C that was stirred on a horizontal shaker operating at a constant agitation speed of 170 rpm until equilibrium for 1 h. All solutions were centrifuged before measurements. The residual concentration of the azo dyes in water was determined by means UV-Vis spectrophotometry. Absorbance values were recorded at λ<sub>max</sub> for each solution: at 620 nm for Chicago Sky Blue (CSB), 590 nm for Reactive Black 5 (RB5), 484 nm for Tropaeolin 000 (TP) and 596 nm for Evans Blue (EB) (see Fig. 1 for the structure formula). The sorption percentage was calculated using the following equation,

$$\text{Sorption \%} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

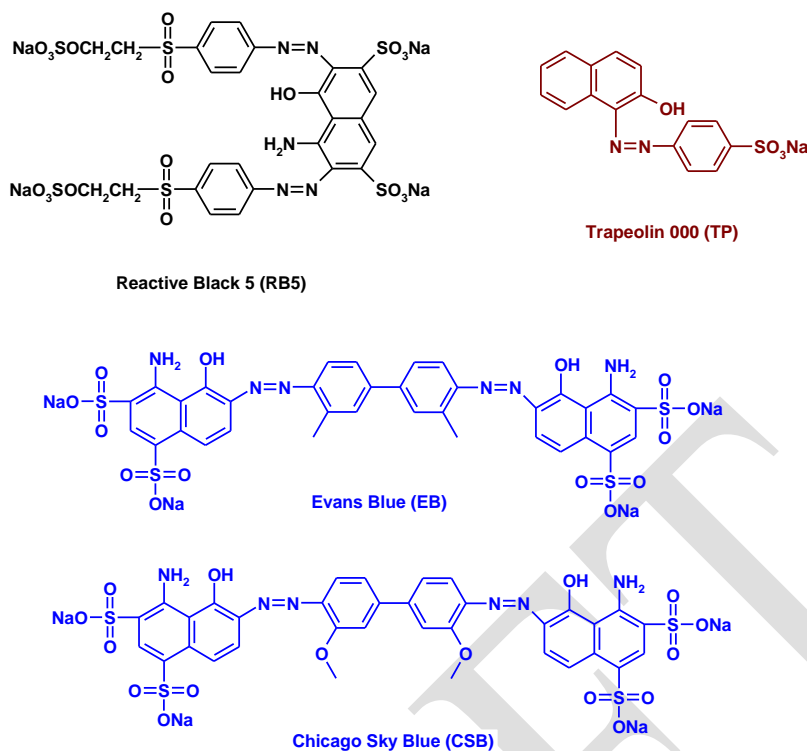
where, the initial concentration of C<sub>0</sub> azo dyes and C is the final concentration of azo dyes in aqua solution.



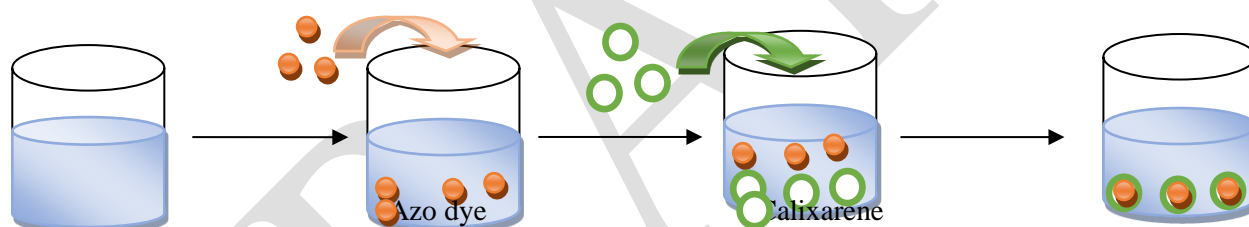
Scheme 1. Synthesis of calix[8]arene derivatives

## RESULTS and DISCUSSION

In this study, solid-liquid extraction studies were carried out in order to clear the carcinogenic azo dyes from wastewater by pyrazine substituted calixarene. Compounds 1 and 2 were prepared according to the literature procedures (Neri et al., 1995). The newly synthesized compound 3 was characterized by <sup>1</sup>H NMR, mass, FTIR and elemental analysis as well. It was found that the OH vibration peak at 3312 cm<sup>-1</sup> was lost in the FTIR spectrum of compound 3 and that a new vibration peak of C = O functional groups was observed at 1759 cm<sup>-1</sup>. The aromatic C–H vibration was observed at 3071 cm<sup>-1</sup> and the aliphatic C–H vibrations were also observed at around 2935–2873 cm<sup>-1</sup>. The synthesized compound (3) showed characteristic <sup>1</sup>H NMR spectra in deuterated chloroform. The aliphatic protons of t-butyl groups for compound 3 were observed in two different regions. While thirty-six protons were observed 0.95ppm, other thirty-six protons were observed at 1.15ppm. The resonance of the bridged methylene protons were observed at 3.23ppm and 4.21ppm. The mass spectra of compound 3 also confirmed the proposed structures and molecular ion peaks were observed at m/z 1780.03 as [M+1]<sup>+</sup>.



**Figure 1.** The chemical structures of selected azo dyes



**Schema 2.** Schematic illustration of sorption studies of azo dyes from aqueous solution

In order to evaluate the azo dye removal efficiency of compound **3**, solid–liquid-phase sorption experiments were conducted. One of the most important factors in solid–liquid-phase sorption experiments is pH. Therefore, experiments were carried out at different pH (i.e. 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0). The results indicate that the maximum azo dye adsorption capacity of new compounds was observed at pH 3. The results are shown in Table 1. Results indicate that the p-tert-butyl-calix[8]arene (**1**) and compound **2** showed less sorption capacities for all azo dyes. The higher level of dye removal by compound **3** compared with the compound **1** and **2** suggest that a Coulomb interaction exist between the amino groups of calix[8]arene and the sulfonate groups of azo dyes.

**Table 1.** Percentage extraction of azo dyes compound **3**

Azo Dye	pH				
	3	5	7	9	11
TP	96	94	92	86	55
RB5	96	94	93	87	68
EB	97	95	94	89	61
CSB	98	95	95	89	65

Aqueous phase, [azo dye]=  $2.0 \times 10^{-5}$  M, 0.2g NaCl organic phase (dichloromethane), [ligand]:  $1.0 \times 10^{-3}$  M, at 25 °C, for 1h.

The protonated of nitrogen in the calixarene pyrazine group and became positively charged at lower pH. Significantly, a strong electrostatic interaction occurred between the positively charged calix [8] arene derivative and the azo dye molecules negatively charged on the sulfonate groups, creating maximum extraction. When the pH increased, the percentage of sorption decreased as the intermolecular electrostatic interaction decreased (Gungor O, 2018).

## CONCLUSION

In the presented work, the synthesis of new pyrazine-2-carboxylate derivative of calix[8]arene (**3**) were described and this compound was fully characterized by standard spectral data such as FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, mass spectra and elemental analysis as well. This compound **3** was utilized to extract selected carcinogenic water-soluble azo dyes from aqueous solution. It was observed that compound **3** show high affinity towards azo dyes.

## REFERENCES

- Banafa A, Saravana S, Chakrabarti T 2011. Azo dyes: Past, present and the future. *Environmental Reviews*, 19: 350–370.
- Boeninger M 1980. The carcinogenicity and metabolism of azo dyes, especially those derived from benzidine. Publication No. 80-119. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute for Occupational Safety and Health.
- Chung KT 2000 Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. *Environ. Carcinogen. Ecotoxicol. Rev. C*, 18: 51-71
- Delval F, Crini G, Morin N, Vebrel J, Bertini S, Torri G 2002. The sorption of several types of dye on crosslinked polysaccharides derivatives. *Dyes Pigments*, 53: 79-92.
- European Commission. 2002/61/EC. Office Journal European Communicable, 15 (2002): L243.
- Golka K, Kopps S, Myslak ZW 2004. Carcinogenicity of azo colorants: Influence of solubility and bioavailability. *Toxicological Letters*, 151: 203–210.
- Gungor O 2018. Liquid phase extraction of azo dyes by novel calixarenes bearing phthalonitrile and diiminoisoindoline groups. *Separation science and technology*, 53: 896–902.
- Neri P, Geraci C, Piattelli M 1995. “Alternate alkylation” of p-tert-butylcalix[8]arene in the presence of weak bases. *J. Org. Chem*, 60:4126-4135.

## İmidacloprid'in zebra balığı (*Danio rerio*) ince bağırsak dokuları üzerine histopatolojik etkileri

Cansu Akbulut, Kevser Yaşar\* ve Nazan Deniz Yön

<sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü, SAKARYA, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: kevseryasar34@hotmail.com

### Özet

Pestisitler tarımda yüksek verim elde etme imkanı verse de yanlış ve bilinçsiz kullanımları yer altı sularını ve doğayı kirletmekte, dolayısıyla sucul canlılar için büyük tehlike oluşturmaktadır. Bu çalışmada son yıllarda sıklıkla kullanılan bir pestisit olan İmidacloprid'in zebra balığı ince bağırsak dokusundaki histopatolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında 3 deney (9,5 mg/L, 19mg/L, 38mg/L) ve 1 kontrol grubu oluşturulmuştur. 5 gün boyunca İmidacloprid'e maruz bırakılan zebra balıklarının bağırsak dokuları disekte edilmiş ve hemen ardından Bouin fiksatif ile tespit işlemi yapılmıştır. Rutin histolojik işlemlerin ardından dokular Hematoksilen-Eozin ve PAS ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. İmidacloprid uygulaması sonucunda ince bağırsak dokusunda epitel hücrelerinde ödem, goblet hücrelerinde hiperplazi, villuslarda total füzyon, muskularis eksternada hipertrofi, lamina propia ve submukozada ayrılmalar ve dejenerasyonlar tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** imidacloprid, zebra balığı, ince bağırsak, histopatoloji

### Histopathological effects of imidacloprid on intestine tissue of zebrafish (*Danio rerio*)

#### Abstract

Although pesticides provide high efficiency in agriculture, their wrong and unconscious use pollutes groundwater and nature and therefore pose great danger to aquatic life. In this study, we aimed to investigate the histopathological effects of Imidacloprid which is a frequently used pesticide, in intestine tissue of zebrafish. 3 experiments (9.5 mg / L, 19 mg / L, 38 mg / L) and 1 control group were formed in this study. The intestinal tissues of the zebrafish which exposed to Imidacloprid for 5 days were dissected and then fixed with Bouin's fixative. After routine histological procedures, the tissues were visualized under light microscope after staining with Hematoxylin-Eosin and PAS. As a result of the Imidacloprid exposure, necrosis, edema, total fusion in the villi, and hypertrophy in the muscularis externa, separation and degeneration in the lamina propia and submucosa, hyperplasia in the goblet cell were observed in experimental groups.

**Keywords:** imidacloprid, zebrafish, intestine, histopathology

### GİRİŞ

Pestisitler günümüzde zararlılarla mücadelede ve üründe tam verim elde etmek için kullanılmaktadır. Fakat pestisitlerin uzun yıllar kullanımı istenmeyen parazitlerin direncini artırmakta ve bu da daha çok pestisit kullanımına sebep olmaktadır. İdeal bir pestisit yalnızca hedefi etkileyen, kalıcılık sağlamayan ve çevresel zararı olmayan kimyasal madde olarak tanımlanabilir (Conway ve Pretty, 1991). Bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda toprak, hava ve suda pestisit birikimi söz konusudur. Dolayısıyla bu durum, pestisitlerin yer altı suyuna karışmasına neden olmaktadır. Özellikle uzmanlar tarafından önerilen dozların aşımı nedeni ile besin zincirindeki canlılar da mağdur olmaktadır (Akan, 2012).

Neonikotinoidler, yaygın olarak mahsüllerdeki emici böcekler, kedi ve köpeklerdeki pire kontrolü için oldukça etkilidirler (Schenker ve ark., 2003). Neonikotinoid tipi pestisitler, kimyasal yapıları nikotinlere oldukça benzerlik gösterdikleri için, böceklerin merkezi sinir sistemine etki ederek nörotoksin gibi çalışırlar (Abou-Donia ve ark. 2008; El-Gendy ve ark., 2010). Böceklerin nöron reseptörlerine memelilere kıyasla daha hızlı ve etkili bağlanmaları için böcekler daha toksiktirler (Tomizawa and Casida 2003). Neonikotinoid grubunda yer alan pestisitlere imidacloprid, acetamiprid, tiakloprid, dinotefuran, tiametoksam, ve klotianidin örnek verilebilir (Gupta ve Milatovic, 2014).

Bu çalışmada kapsamında sıklıkla kullanılan bir insektisit olan imidacloprid'in zebra balığı ince bağırsak dokusundaki histopatolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Ortam koşulları

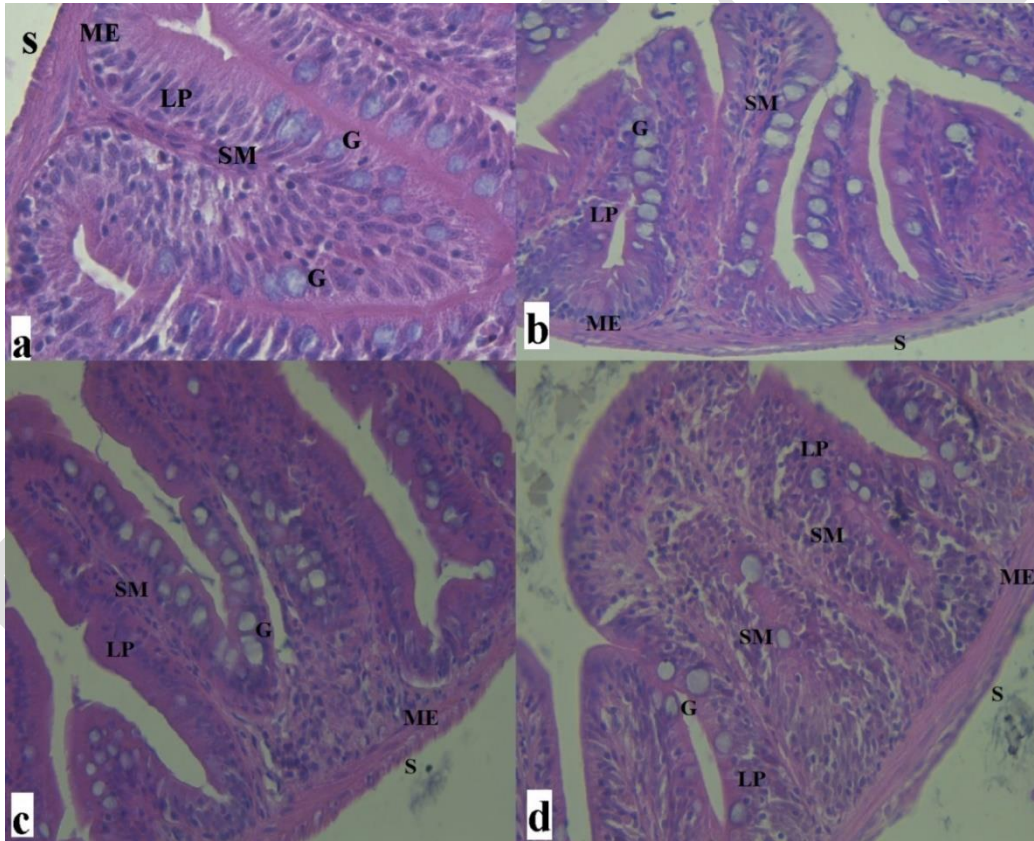
Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisinde akvaryum sistemi kuruldu. Akvaryumlara dinlendirilmiş su konulup, içerisine temizleyici filtreler ve ısıtıcılar yerleştirildi. Sıcaklık suları yaklaşık olarak 26–28 °C ayarlandı. 1 haftalık adaptasyon sürecinden sonra balıklar 1 kontrol 3 deney grubu olmak üzere toplamda 4 gruba ayrıldı. Her gruba ait akvaryuma 10 adet zebra balığı yerleştirildi. Deney gruplarına sırasıyla 9,5 mg/L, 19 mg/L, 38 mg/L oranında imidakloprid eklendi. 5 gün sonunda ince bağırsak dokuları disekte edilerek çıkartıldı.

### Histolojik İşlemler

İnce bağırsak dokuları 24 saat boyunca Bouin fiksatif ile fikse edilmiştir. Dokular dehidrasyon işlemleri için yükselen alkol serilerinden geçirilmiş ve ksilen kullanılarak şeffaflaştırma işlemi yapıldı. Dokular parafin içerisine kesit düzlemine göre gömüldükten sonra Leica marka mikrotom kullanılarak 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilin-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boya ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi.

### BULGULAR

Kontrol grubuna ait örneklerde normal ince barsak histolojisi gözlenmiştir. Goblet hücreleri, submukoza, lamina propria, muscularis externa, seroza tabakaları net bir şekilde görüntülenmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1:** a) Kontrol grubu, 40x., b) 9,5 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grup, 40x., c) 19 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grup, 40x., d) 38 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grup, 40x. SM; submukoza, G; goblet hücreleri, ME; muskularis eksterna, S; seroza, LP; lamina propia, H&E.

9,5 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında goblet hücrelerinde hiperplazi submukozada, lamina propiada, muskularis eksternada ve villus yapılarında dejenerasyon gözlemlendi.

19 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında goblet hücrelerinde hiperplazi, muskularis eksternada hipertrofi, villuslarda total füzyon ve dejenerasyon gözlemlendi.

38 mg/L imidakloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında villuslarda total füzyon, muskularis eksternada hipertrofi, villus yapılarında atrofi gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Neonicotinoidların su vb. alanlarda ve bazı türlerde araştırılması bugün ve gelecekte bilimsel araştırmalar için gereklidir. Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda birçok canlı türü olumsuz etkilenmektedir. İmidacloprid yapısında nikotin bulunduran bir böcek öldürücüdür.

Zebra balığı bağırsak dokularının çalışmalarında farklı pestisit kullanımına rağmen benzer sonuçlar gözlemlenmiştir.

Ertuğ ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbisitini zebra balığı bağırsak dokularında histolojik olarak incelemişlerdir. Üç deney grubu kurmuşlar (0,1 ppm, 0,5 ppm and 1 ppm) ve 5 gün maruz bırakıp balıkları incelemişlerdir. Epitel hücrelerinde ödem, nekroz ve atrofi gözlemlenmiştir. Benzer bulgular bu çalışmada da gözlemlenmiştir.

Zhang ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada zebra balığı karaciğer, solungaç ve ince bağırsak dokusunda mikroplastiklerin birikimi ve kadmiyumun kronik toksik etkilerini incelemişlerdir. İnce bağırsak sonuçlarına bakıldığında villuslarda dejenerasyon tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar olup ek olarak submukoza da ödem, muskularis eksternada dejenerasyon gözlemlenmiştir.

Ahmed ve ark., (2015) yaptıkları çalışmada Fenitrotiyon pestisitinin zebra balığı bağırsak dokusu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda villus yapılarında ve submukoza da dejenerasyon gözlemlenmiştir. Bu bulgular bizim çalışmamızın bulgularıyla benzemektedir.

## SONUÇ

Deney sonucunda her 3 grupta da epitel hücrelerinde ödem, villuslarda total füzyon ve dejenerasyon, muskularis eksterna da hipertrofi, lamina propia ve submukozada ayrılmalar, ödem ve dejenerasyonlar gözlemlenmiştir. Uygulanan bu dozların sindirim sistemini olumsuz şekilde etkileyebileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışma başka çalışmalarla desteklenerek daha kapsamlı bilgi elde edilmesine olanak sunacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abou-Donia, M.B., Goldstein, L.B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M. and Abdel-Rahman, A.A., 2008. Imidacloprid Induces Neurobehavioral Deficits and Increases Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein in The Motor Cortex and Hippocampus in Offspring Rats Following in Utero Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 71 (2), 119-130.
- Ahmed, Sk., Ahmmed, M., Ghosh, S., Islam, Md., Shahjahan Md., "Histo-Architectural Changes Of Intestinal Morphology In Zebra Fish (*Danio Rerio*) Exposed To Sumithion", *Research İn Agriculture, Livestock And Fisheries*, 2, (2015), s.499-506.
- Akan T, Organofosforlu Pestisitlerin Arpa Bitkisi (*Hordeum Vulgare* L.) Ve Zebra Balığı (*Danio Rerio*) Üzerindeki İn Vitro Genotoksik Etkilerinin Comet Testi İle Araştırılması, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012, s.1.
- Conway, G.R and Pretty , J.N. 1991. Unwelcome Harvest: Agriculture and Pollution. Earthscan, London.
- effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*)", *Chemosphere*, 202, (2018), s. 514-520.
- El-Gendy, K.S., Aly, N.M., Mahmoud, F.H., Kenawy, A., El-Sebae, A.H., 2010. The Role of Vitamin C As Antioxidant in Protection of Oxidative Stress Induced By İmidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48:215-221. doi: 1016/j.fct.2009.10.003.
- Gupta, RC & Milatovic D (2014). *Biomarkers in Toxicology*, Academic Press.
- Lu, K., Qiao, R., An H., Zhang, Y., "Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic
- Schenker R, Tinembart O, HumbertDroz E, Cavaliero T, Yerly B. Comparative speed of kill between nitenpyram, fibpronil, imidacloprid, selamectin, and cythioate against adult *Ctenocephalides felis* (Bouche) on cats and dogs. *Vet Parasitai* 2003;112:249–54.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable Tospecificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Ann. Rev. Entomol.* 48, 339-364.
- Yon Ertug Nazan Deniz, Akbulut Cansu, Abar Merve, Günes Selda, "The Histopathological Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Intestine Tissue of Zebrafish (*Danio rerio*)", *Elixir International Journal*, S;74 (2014), s.27021-27024.



## Acid blue 193 adsorption on the effect of pH and poly(divinylbenzene-vinylimidazol) investigated

Gurbet Bal, Şahin Özel, Ali Kara

Department of Chemistry, University of Bursa Uludag, Bursa Turkey

Corresponding author: e-mail: gurbetball.21@gmail.com

### Abstract

Colored dyes are important water pollutants which are generally present in the effluents of the textile and other industries. The high level of production and extensive use of dyes generates colored wastewater which produces toxicological and technical problems and environmental pollution. Some dyes, for instance, are reported to cause allergy, dermatitis, skin irritation, cancer and mutation in human. Thus, the removal of color dyes from wastewater before they are contacted with unpolluted natural water bodies is important. These dyes are of great importance for the sake of their application properties, low cost and shades which are difficult to obtain in acid group of dyes. Adsorption is one of the effective methods to remove colored textile contaminants from wastewater. Therefore, pH effects of removal of an acid dye, acid blue 193, from aqueous solutions were studied by adsorption on poly(divinylbenzene-vinylimidazole) [poly(DVB-VIM)]. The absorbance of acid blue 193 (at 580nm) is measured. In this study, linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in details [between pH:2 and pH:12]. In addition, the interactions between the polymer and the pH range were investigated.

**Keywords:** Acid dye, acid blue 193, poly(DVB-VIM), pH

### 1. Introduction

Dyes are one of the organic contaminants found in wastewater. They are generated by the paint, textile, cosmetic, paper and food industries. At present, over 100.000 colors are used for commercial purposes. Their annual production is estimated at more than  $7 \times 10^5$  Mg. 10–15% of dyes used in the coloring processes penetrate the water environment. They pose a threat because even low amounts of dyes cause water coloration and hinder the photosynthesis processes taking place in the aquatic organisms. Dyes can also have a negative impact on the human health. They can cause skin and eye irritation. Some of them are toxic and carcinogenic. In the textile industry, reactive, direct, acidic and alkaline dyes (whose character is cationic or anionic) are used to dye cellulose, protein and polyamide fibers.

Acid dyes are highly water soluble, and have better light fastness than basic dyes. The textile acid dyes are effective for protein fibers such as silk, wool, nylon and modified acrylics. They contain sulphonic acid groups, which are usually present as sodium sulphonate salts. These increase solubility in water, and give the dye molecules a negative charge. In an acidic solution, the  $\text{NH}_2$  functionalities of the fibres are protonated to give a positive charge:  $-\text{NH}_3^+$ . This charge interacts with the negative dye charge, allowing the formation of ionic interactions. As well as this, Van der Waals bonds, dipolar bonds and hydrogen bonds are formed between dye and fibre. Acid dyes are commonly classified according to their dyeing behaviour, especially in relation to the dyeing pH, their migration ability during dyeing and their washing fastness. The molecular weight and the degree of sulphonation of the dye molecule determine these dyeing characteristics. Molecular weights of acid dyes range from 200 to 900.

Synthetic dyes are being gradually used in the textile, paper, cosmetics, pharmaceutical and food industries. The removal of color from textile effluents, which are toxic, to pollute water and to cause severe damage to human beings, is a major problem because of the difficulty in treating such wastewaters by conventional waste treatment methods, such as coagulation, chemical oxidation, membrane filtration, solvent extraction, chemical precipitation, osmosis, etc. These methods have not been very successful since dyes are stable to light, oxidizing agents, high capital cost and operational costs or secondary sludge disposal problem and aerobic digestion. Adsorption has been proved to be an excellent way to treat textile waste effluents, offering significant advantages like the cheapest, easy availability, most profitable, easy of operation and most efficient, over many conventional methods especially from an economical and environmental point of view.

During researches on synthesis of metal-complex dyes it was stated, that processes of azo dyes metallizing often goes with formation of mixture of dyes. This is clearly seen on the basis of such dyes as Acid Blue 193. These dyes are synthesized in many countries, among others in Poland too. These dyes are of great importance for the sake of their application properties, low cost and shades which are difficult to obtain in acid group of

dyes. Despite of their common application and production, from the beginning of the 20th century, their structure are not precisely known.

In this study, the adsorption analysis of acid blue 193 dyestuff and the parameters affecting the adsorption pH, the amount of adsorbent were investigated.

### Effect of pH on dye

In the case of acid dyeing, a low pH helps to form the hydrogen bonds that attach acid dyes to protein fibers, such as silk and wool, as well as nylon. Acid dyes do not work on cellulose fibers such as cotton. Optimal pHs vary according to the specific type of acid dye. Some require only a very mild acid; others a more significantly low pH.

Silk can be dyed at low pH (acidic) or high pH as with cellulose fibers; wool can only be dyed at low pH because it is damage by high pHs. Cellulose fibers, such as cotton, linen, rayon, etc., cannot be dyed at all at low pHs.

<u>dye class</u>	<u>pH range</u>
Leveling acid / Kiton / Strong acid	2.5 to 3.5
Milling acid / Weak acid	5.2 to 6.2
Super Milling / Fast Acid	5.5 to 7.0
Lanaset	4.5 or 5.0
Procion MX used as acid dyes	2.5 to 3.5

Sources: for the first four dyes in the table, the optimal pH ranges are found in various palces within the book *Wool Dyeing*, edited by David M Lewis. I am trying to track down where I obtained the figure for Procion MX dyes used as acid dyes, which is not found in the same book; certainly, ProChem's recipes call for more acid than their other acid dye recipes do, but they do not mention the optimal pH range.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemical

A commercial textile dye AB193 (Isolan Dark Blue 2- SGL) was obtained from Dystar, Turkey, and used without further purification. The chemical structure of AB193 is depicted in **Fig. 1**.

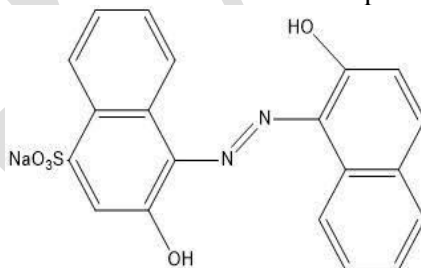


Fig. 1. The chemical structure of AB193.

Acid blue 193 AB193 (chemical formula:  $C_{20}H_{13}N_2NaO_5S$ ; molecular weight: 416.38g/mol; maximum wavelength: 580 nm)

Different concentration of dye solution were prepared from a stock of 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150 mg/L solution. The various concentrations were prepared from the stock solution, pH of the solutions was adjusted using 0.1 M HCl and 1 M NaOH.

### 2.2. Prepare of the solution

200 ppm stock solution for Acid Blue 193 dyestuff used in the experiment it was prepared. To determine the optimum pH, solutions were prepared at different pH and optimum pH = 4.7 and 10 were determined. UV-vis spectrophotometer in the range of 200-800 nm absorbance maximum by wavelength scanning,  $\lambda_{max} = 580$  nm it was measured. All spectroscopic studies were performed at this wavelength. Stock dilutions from the solution (60-70-80-90-100-125-150 ppm) at concentrations The solutions were prepared and the calibration graph was prepared and the regression value was calculated. Dilutions were made with the solvent at the pH of each solution.

### 2.3. Calibration of AB193 dyestuff

The pH of the dyestuff can be studied by measuring for each pH at pH 2-12 and the concentration range was determined. At pH = 4.7 and 10,  $R^2$  values were close to 1 and studies were performed in this range.

## 3. Result and Discussion

### 3.1. pH Effect on Adsorption of AB193 Dyestuff

pH is one of the most important parameters in dye removal. Changes of solution pH can change the chemical behaviour of surface functional group, surface charge of sorbent, and the degree of ionization of adsorbate. At low pH, the functional groups on the adsorbent surface are protonated. The decrease of pH causes a decrease in the surface charges, and likely more interactions due to electrostatic attraction between negatively charged dye anions and positively charged adsorption sites.

### 3.2. Adsorbent dose effective on adsorption Acid Blue 193

Variation in adsorbent dose is an important factor because it explains the removal capabilities of adsorbent for a meticulous dye concentration. The concentration of adsorbate is also an important variable affecting the adsorption process. In general, an increase in the adsorption of dyes with increase in dye concentration is observed.

In this study, 100 ppm stock solutions were prepared for each pH. The amount of polymer was determined as 30 mg. Solutions were prepared using 10 ml sample and 30 mg polymer and adsorbance measurements were taken.

## 4. Conclusion

pH is very important factor affecting the adsorption process. In this study, the linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in detail in pH (2-12). To determine the optimum pH and pH was changed in the range of (2-12). The maximum adsorption pH was calculated. The maximum adsorption amount was found to be at pH 4.7 and 10. For Acid Blue 193 (AB193), the amount of adsorbent on which the dyestuff and polymer [poly(divinylbenzene-vinylimidazol)] interact with other was calculated to be 30 mg.

## References

1. Kyzioł-Komosiński, J., Rosik-Dulewska, C., Pajak, M., Krzyżewska, I., Dzieniszewska, A. (2014). Adsorption of anionic dyes onto natural, thermally and chemically modified smectite clays. Polish Journal of Chemical Technology, 16, 4, 33-40, 10.2478./pjt-2014-0066
2. Özcan, Safa A., Erdem, B., Özcan, A., (2005). Adsorption of Acid Blue 193 from aqueous solutions onto BTMA-bentonite. Science Direct, 266; 73-81
3. Markandeya, S.P. Shukla and D. Mohan., (2017). Toxicity of Disperse Dyes and its Removal from Wastewater Using Various Adsorbents: A Review. Research Journal of Environmental Toxicology
4. J.Shore "Colorant and Auxiliaries. Organic Chemistry and Application Properties", wyd. Society of Dyes and Colourists 1999, t.I, str.196
5. Boumediene, M., Benaïssa, B., George, B., St. Molina, Merlin, A., (2018). Effects of pH and ionic strength on methylene blue removal from synthetic aqueous solutions by sorption onto orange peel and desorption study. Journal of Materials and Environmental Sciences, Volume 9, Issue 6, Page1700-1711
6. Ahmadi, M., Ardakani, Hamed M., Zinatizadeh, Akbar Z., (2015). Optimization and kinetic evaluation of acid blue 193 degradation by UV/peroxydisulfate oxidation using response surface methodology. Advances in Environmental Technology 2 ,page 59-68.
7. B.E. Kaplan, A. Kara and H.A. Eren, (2019). Linear regression analysis of pH effects on reactive black 5 adsorption of poly(divinylbenzene-N-vinyl imidazol) microbeads. International conference on applied analysis and mathematical modeling proceedings book, page 97-103.

## Farklı derişim ve kimyasal nitelikli polimerik nanofiberlerin polimetilmetakrilat bazlı dental biyomalzemelerde kullanım etkinliğinin değerlendirilmesi

Tansel Uyar<sup>1\*</sup>, Dilek Çökeliler Serdaroğlu<sup>1</sup>, Mustafa Doğan<sup>2</sup>, İsmail Cengiz Koçum<sup>1</sup>, Okan Karatay<sup>3</sup>, Ezgi Özdemir<sup>1</sup>, Ürün Tunç<sup>1</sup>, Emir Baki Denkbaş<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği, Ankara, Türkiye.

<sup>2</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Kontrol ve Otomasyon Mühendisliği, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Aselsan, Savunma ve Uzay, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: tuyar@baskent.edu.tr

### Özet

Restoratif diş malzemelerinde mekanik performansın iyileştirilmesi ile ilgili çalışmalarda çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Yıllar içerisinde geliştirilen destek malzemeleri arasında, nanofiber doldurucular gelecek vaat eden katkılardır. Polimetilmetakrilat protez kaide malzemelerinde kullanılmaya başlanan yenilikçi yaklaşımlardan biri olan nanofiber doldurucular, mekanik performansta oldukça iyi sonuçlar göstermiştir. Ara-yüzey bağlantılarında nano seviyede iyileştirmelerle, protez kaide malzemelerinde elde edilen mekanik geliştirmeler çok farklı düzeylere taşınmıştır. Sunulan çalışma, iki ana bölümde incelenmiştir. İlk bölümde kompozit üretimi esnasında farklı desenlere sahip polivinilalkol nanofiberlerin Katkılamada ağırlıkça yüzde değiminin, mekanik performansa etkisi tanımlanmıştır. İkinci bölümde ise farklı kimyasal nitelikteki, polistiren ve polimetilmetakrilat nanofiberlerin, katkılama yüzdelерinin değiminin, mekanik performansa etkisi tanımlanmıştır. Ayrıca her iki grupta, elektrostatik eğirme yöntemi kullanılmış ve polimer derişimlerinin etkileri de özetlenmiştir. . Elde edilen bulgularla, kimyasal özellikleri farklı bu nanofiber doldurucuların karşılaştırması yapılmıştır ve kompozit mekanik dayanımında önemli iyileştirmeler yapılabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Polimetilmetakrilat, polistiren, polivinilalkol, elektrostatik eğirme, düzenlenme, diş kompozitleri

### Evaluation of the efficiency of polymeric nanofibers with different concentration and chemical properties in polymethylmethacrylate based dental biomaterials

#### Abstract

There are several approaches to improving mechanical performance in restorative dental materials. Among the support materials developed over the years, nanofiber fillers are promising materials. The nanofiber fillers, one of the innovative approaches to be used in polymethylmethacrylate prosthetic base materials, yielded very good results in mechanical performance. By means of nano-level improvements in the inter-surface connections, the mechanical improvements obtained in the prosthetic base materials have been elevated to different levels. The presented study is examined in two main sections. In the first section, the contribution of physical alignment in polyvinylalcohol nanofiber fillers to mechanical performance was investigated. In the second section, the effects of different chemical structures of polyvinylalcohol, polystyrene and polymethylmethacrylate nanofibers on composite material were investigated. Based on the findings, it was determined that there are promising effects of nanofiber fillers.

**Keywords:** Polymethylmethacrylate, polystyrene, polyvinylalcohol, electrospinning, alignment, dental composites

## 1. GİRİŞ

Biyouyumlu, uzun ömürlü, ağız içi ortamda direkt kullanıma elverişli ve dayanıklı dental materyallerin seçimi ve geliştirilmesi oldukça popüler bir araştırma konusudur (K.J. ve Phillips, 2003). 40 yıl öncesine dayanan bu araştırmalarda tercih edilen materyaller, daha sağlıklı ve estetik malzemelerdir. Bu tercihlerle geliştirilen çalışmalarda kullanılan polimerik restoratif materyaller, geleneksel uygulama olarak tanımlanabilecek dental amalgamların yerini almaya başlamıştır. Polimer matriks kompozitlerinin kuvvetlendirilmesi için kullanılan materyallerden biri de inorganik dolduruculardır. Makro ölçekli cam, polietilen fiber, silika ya da cam partiküller gibi inorganik doldurucularla gerçekleştirilen çalışmalardaki kompozit matrikslerde düşük sertlik ve düzensiz yerleşmeler oluşabilmektedir. Bunun sonucunda, matriks boyunca stresin yoğunlaştığı noktalar

oluşmakta ve doldurucunun kırılması ya da partikül etrafında birikmeler nedeniyle materyallerde çatlaklar ortaya çıkmaktadır (Cramer vd., 2011; Karthick vd., 2014). Bu olumsuzlukların aşılmasında, geniş ara yüzeylere sahip doldurucu olarak matriksle üst seviyede etkileşime girebilen polimerik nanofiberlerin kullanımı önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Son on yıl içerisinde gerçekleştirilen nanofiber kullanımını içeren kompozit çalışmaları artış göstermiştir. Nylon-6, polivinilalkol (PVA) ve poli-L-laktik asit gibi polimerlerle Bis fenol A-glisidil dimetakrilat temelli kompozit üretimlerinin mekanik performansının incelenmesi dikkat çeken çalışmalardan biridir (Dodiuk-Kenig vd., 2008; Fong, 2004). Literatürde yer alan çalışmalarda, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, nano elmas ve gümüş nanopartikül katkıların kullanıldığı mekanik performansların kısmen arttığı ya da daha da kötüleştiği yaklaşımlar bulunsa da polimetilmetakrilat (PMMA) için nanofiber katkılı kompozit malzeme üretilen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Acosta-Torres vd., 2011; PROTOPAPA vd., 2011; Sodagar vd., 2012).

Sunulan çalışmada, PVA polimeri kullanılarak üretilen düzensiz ve düzenli nanofiber katkı malzemeli PMMA kompozitlerinin mekanik performansları incelenmiştir. Çalışma grubumuz tarafından üretilmiş elektrostatik eğirme cihazı ile üretilen düzensiz ve düzenli nanofiber katkılar farklı ağırlık yüzdeleri ile kullanılarak PMMA-PVA nanofiber kompozitleri elde edilmiştir. Bu matrikslerde kullanılan nanofiber doldurucular, fiziksel olarak taramalı elektron mikroskopuyla (SEM) yapısal olarak incelenmiştir. Daha sonra, üretilen bu kompozit yapılar üç noktalı eğme testi ile mekanik performans açısından değerlendirilmiştir (Uyar vd., 2016). Sunulan çalışmanın ikinci kısmında ise polistiren (PS) ve polimetilmetakrilat polimerlerinin nanofiber doldurucular olarak kullanıldığında mekanik performans etkileri incelenmiştir. Sonuç bölümünde ise çalışma grubu tarafından gerçekleştirilen devam çalışmaları da kısaca detaylandırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Polimer seçimi

Düzenli ve düzensiz nanofiber doldurucuların karşılaştırılmasında polivinilalkol (PVA) yapısı kullanılmıştır. Biyouyumluluğu ve sudaki yüksek çözünürlüğü sebebiyle PVA (Mw=30000 g/mol, Merck Chemicals) polimer yapısı tercih edilmiştir. Distile su kullanılarak çözündürülen, 80°C sıcaklıkta 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılan PVA çözeltisi, üç ayrı konsantrasyonda (%w/w 22,5, 25, 27,5) üretilerek optimal çözelti yüzdesi %w/w 25 olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında iki ayrı biyouyumlu polimer yapısı olan Polistiren (PS, Mw=250000 g/mol, Acros Organics) kullanılarak üç ayrı konsantrasyonda (%w/w 17,5, 20, 22,5) ve Polimetilmetakrilat (PMMA, Mw=35000 g/mol, Acros Organics) kullanılarak üç ayrı konsantrasyonda (%w/w 32,5, 35, 37,5) üretilerek optimal çözelti yüzdeleri sırasıyla %w/w 17,5 ve 32,5 olarak belirlenmiştir. Bu polimerlerin çözücüsü olarak Dimetilformamid (DMF, %99 saflıkta, JT Baker) kullanılmış, oda sıcaklığında 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile çözeltiler hazırlanmıştır.

### 2.2. Elektrostatik eğirme cihazı

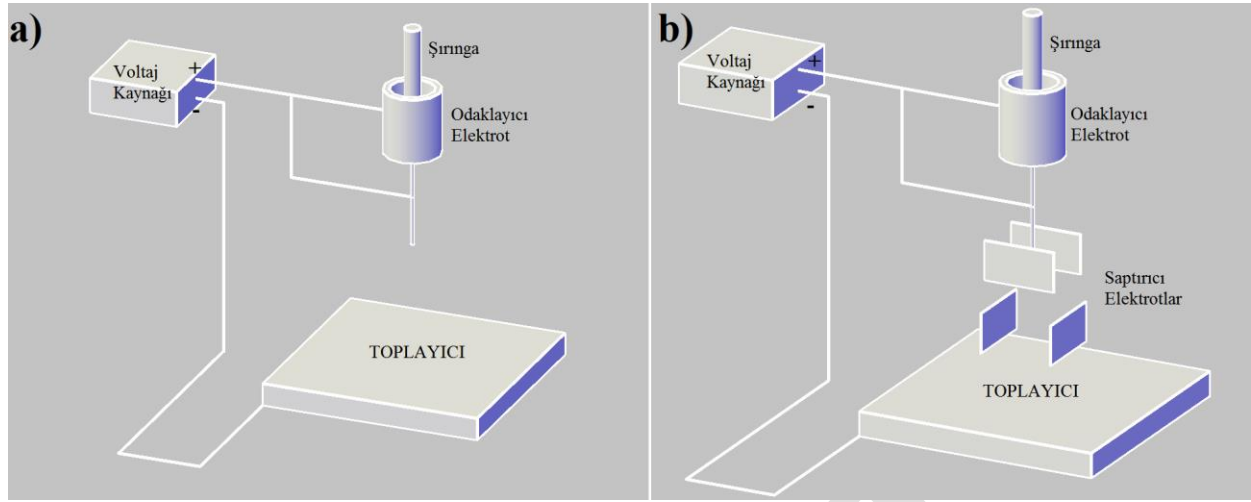
Çalışma grubumuz tarafından üretimi gerçekleştirilmiş elektrostatik eğirme cihazı iki ana bölümden oluşmaktadır (Karatay 2009). Bu bölümler, mekanik ve elektriksel olarak adlandırılmakta ayrıca kendi içlerinde de farklı bileşenleri barındırmaktadırlar.

#### 2.2.1. Mekanik bölüm

Bir şırınga içerisine alınan PVA çözeltisi, şırınga pompası (New Era NE 300, New Era Pump Systems, Inc., ABD) yardımıyla infüzyon seti (Bıçakçılar A.Ş.) kullanılarak 22-gauge şırınga iğnesine (Mehode Electronics, İngiltere) aktarılır. 10x10 cm alana sahip sabit bir toplayıcının (kollektör) kullanıldığı sistemde, 8x8x0,3 cm cam kaidelere sarılı alüminyum folyolar üzerinde fiber katkıları oluşturulmuştur.

#### 2.2.2. Elektriksel bölüm

Elektriksel bölüm iki parçadan oluşmaktadır. İlk parçada geleneksel bir elektrostatik eğirme cihazında bulunan ana parçalar mevcuttur. Voltaj kaynağı, doğrultma bölümü ve kontrol bölümü ilk parçanın ana bileşenleridir (Dogan vd., 2009). İkinci parça ise düzenli fiberlerin üretilmesini sağlayan elektrik alan manipülasyonu için üretilmiş saptırıcı voltaj kaynakları ve plakalardır (Karatay vd., 2014; Uyar vd., 2016). Elektrik manipülasyon sistemi iki parçadan oluşmaktadır. İlk kısımda, odaklayıcı silindirik bir plaka ile polimer jetinin kaotik hareketi sınırlandırılmıştır. İkinci kısımda ise iki ayrı düzlemde yer alan saptırıcı plakalar kullanılarak bir adet sinyal jeneratörünün rampa fonksiyonu ile kontrol edilebilen voltaj kaynağı bulunmaktadır (Uyar vd., 2016). Voltaj kaynağı temelde, osiloskop cihazlarındaki saptırma mantığı ile çalışmaktadır (Koçum, 2011). Nanofiber düzenliliğinin incelenmesinde Tasarım 1'de sadece odaklayıcı plakalar bulunurken, Tasarım 2'de hem odaklayıcı plakalar hem de voltaj kaynağı ile birlikte saptırıcı plakalar bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Nanofiber düzenliliğinin incelenmesinde kullanılan elektrostatik eğirme sistemi ve yardımcı elektrotlar, a) Tasarım 1, b) Tasarım 2

Çalışmanın ikinci kısmında yer alan farklı polimer performansının incelenmesi aşamasında sadece düzensiz fiberler üretilmiş ve bu ikinci sistem kullanılmamıştır.

### 2.3. Deneysel gruplar

#### 2.3.1. Düzensiz ve düzenli PVA nanofiber: Grup1

Çalışmanın ilk bölümünde nanofiberlerde düzenliliğin etkisi incelenmiştir. Bu sebeple öncelikle PVA polimeri için çözelti optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimal çözelti yüzdesi %w/w 25 olarak belirlendikten sonra üç ayrı yaklaşımla fiberler üretilmiştir. Düzensiz, Tasarım 1 ve Tasarım 2 olacak şekilde üç ayrı PVA nanofiber yapıları üretilmiştir. Tüm üretim aşamaları gerçekleştirilirken elektrostatik eğirme sisteminde kullanılan voltaj 12kV, şırınga ucu ile toplayıcı arası mesafe 12cm ve şırınga pompasının akış hızı 2ml/saat olarak belirlenmiştir.

#### 2.3.2. Düzensiz PS ve PMMA nanofiber: Grup2

Çalışmanın ikinci bölümünde farklı tipteki polimerlerin etkinliğinin incelenmesi için düzensiz PS ve PMMA nanofiberleri üretilmiştir. Üretim sırasında elektrostatik eğirme sisteminde kullanılan voltaj 20kV, şırınga ucu ile toplayıcı arası mesafe 12cm ve şırınga pompasının akış hızı 2ml/saat olarak belirlenmiştir.

### 2.4. Nanofiberlerin fiziksel karakterizasyonu

Nanofiberlerin fiziksel karakterizasyonu ve nanofiber çaplarının belirlenmesinde Taramalı Elektron Mikroskopisi (ESEM, Quanta FEI 200 FEG, Bilkent UNAM) kullanılmıştır. Mikroskop görüntüleriyle Image J yazılımı kullanılarak çap karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

### 2.5. Kompozit üretimi ve kompozitlerin mekanik performansının karakterizasyonu

Nanofiber doldurucuların etkinliğinin belirlenebilmesi için ASTM standartlarında yer alan üç nokta eğme testi gerçekleştirilmiştir. Bu testin gerçekleştirilebilmesi için test numuneleri hazırlanmış ve bu numuneler ASTM standartları uyarınca 64mm uzunluk, 8mm genişlik ve 3,3mm kalınlıkta sırasıyla PMMA-Nanofiber-PMMA katmanlarına sahip olacak şekilde üretilmiştir. Üretim aşamasında PMMA protez kaide malzemesi için monomer likit ve polimer toz içeren bir karışım (Vertex, Zeist, Hollanda) hazırlanmıştır. Bu karışımdan elde edilen hamur malzeme alçı kalıplara yerleştirilerek bir yüzeye nanofiber doldurucu ile kaplanıp kalıplar kapatılmış ve 100°C kaynar suda 20dk bekletilerek sertleştirilmiştir. Kompozit içerisinde yerleştirilen nanofiber doldurucular PVA için %w/w 0,05, 0,25, 0,1, 1,25 oranlarında kullanılırken PS ve PMMA için %w/w 0,5, 1,1, 2,3, 5,4 oranlarında kullanılmıştır. Kompozit üretiminden sonra üç nokta eğme testi (Instron 8874, Boston, ABD) kullanılarak üretilen kompozitlerin mekanik performansları karakterize edilmiştir. Karakterizasyon süresince test cihazına ait kafa hızı 1mm/dk olarak belirlenmiş olup her test grubunda sekiz adet numune bulunmaktadır.

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. Nanofiber: Grup1 karakterizasyonları ve kompozit üretiminde katkılama miktar değişiminin etkisi

PVA polimeri kullanılarak gerçekleştirilen nanofiber üretimlerinin ilk aşamasında çözelti optimizasyonu, ikinci aşamasında ise düzensiz ve düzenli nanofiber tasarımlarının üretimleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalara ait çap karakterizasyonları ImageJ ile analiz edilmiş ve sonuçları Tablo 1’de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** PVA nanofiber dolduruculara ait fiziksel karakterizasyon sonuçları

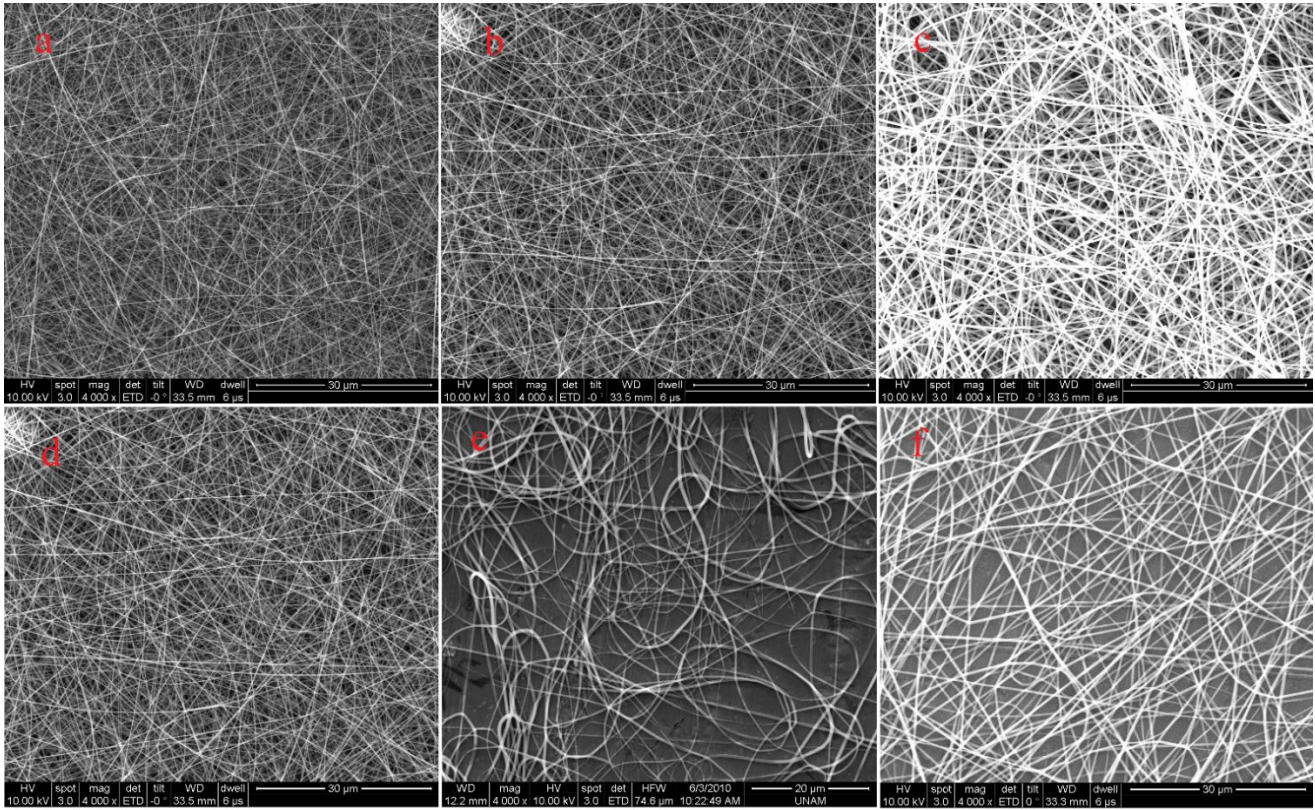
<b>Çözelti Konsantrasyonu (%w/w)</b>	<b>Tasarım Tipi</b>	<b>Çap Aralıkları (nm)</b>
%22,5	Optimizasyon	174 – 220
%25	Optimizasyon	138 – 220
%27,5	Optimizasyon	320 – 420
%25	Düzensiz	138 – 220
%25	Tasarım 1	135 – 175
%25	Tasarım 2	250 – 380

Çözelti optimizasyonundan sonra elde edilen nanofiberlerde en küçük çap aralığına sahip olan %25’lik değer seçilerek tasarımlara ait üretimler gerçekleştirilmiştir. Düzensiz nanofiberlerden tasarım 1’e geçildiğinde odaklayıcı plakalar sayesinde daha küçük bir alanda yüksek dönme hareketi sebebiyle tasarım 1’e ait çap aralıkları daha küçük boyutta elde edilmiştir. Buna karşın, tasarım 2 ile üretilen nanofiberlerin saptırıcı plakalar sebebiyle çapları büyümüştür. Toplayıcı plaka ile şırınga ucu arasında yer alan saptırıcı plakalar, toplayıcı plaka etkisi yaratmış ancak bunun elektrik alan temelli gerçekleşmesi sebebi ile fiberlerin geçişlerine engel olmamıştır. Bu fiziksel yavaşlama etkisi fiberlerde çapların büyümesine neden olmuştur. Ancak sapma hareketi sebebiyle de daha düzenli fiberler elde edilmiştir. Tasarımların fiber düzenlenmelerine olan etkileri Tablo 2’de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** PVA nanofiberlerin düzenlenme yüzdeleri ve açısal sapma değerleri

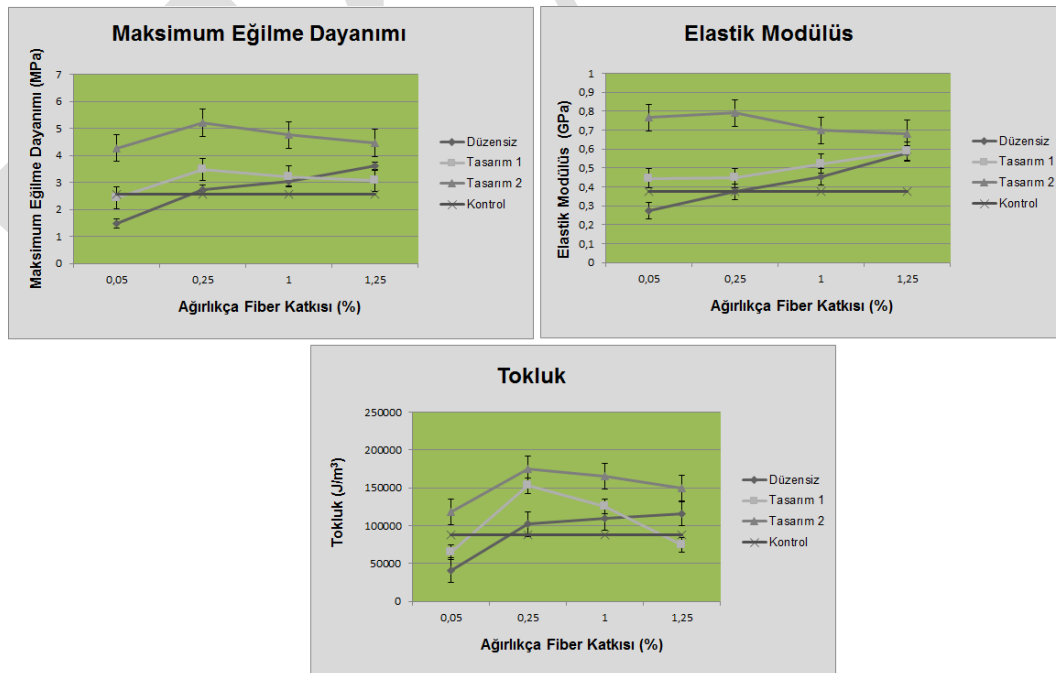
<b>Deney grubu</b>	<b>Ortalama düzenlenme yüzdesi (%)</b>	<b>Açısal sapma ortalaması (°)</b>
<b>Düzensiz</b>	3,3 ± 1,2	10 ± 2,7
<b>Tasarım 1</b>	10,7 ± 3,8	7,4 ± 1,5
<b>Tasarım 2</b>	40,8 ± 2,6	5,7 ± 1,2

Üretilen nanofiber yapılarına ait SEM görüntüleri Şekil 2’de ayrıca detaylandırılmıştır.



**Şekil 2.** PVA nanofiberlere ait 4000x büyütmedeki SEM görüntüleri, a) %22,5, b) %25, c) %27,5, d) Düzensiz (%25), e) Tasarım 1 (%25), f) Tasarım 2 (%25)

Fiziksel karakterizasyon aşamasından sonra ise mekanik testler gerçekleştirilerek tasarımlara ait performanslar değerlendirilmiştir. Üretilen numunelerin farklı ağırlık katkılarına bağlı olarak gerilim, elastik modülüs ve tokluk değişim grafikleri Şekil 3'te detaylandırılmıştır.



**Şekil 3.** Mekanik performanslara ait değişim grafikleri



Mekanik test sonuçlarına göre kontrol grubu referans alındığında en fazla iyileşme tasarım 2’de %w/w0.25’lik fiber katkısı ile elde edilmiştir (Tablo 3). Bu tasarımda elde edilen fiziksel yapının diğer tasarımlara göre daha düzenli olması mekanik performansı pozitif bir yönde etkilemiştir. Literatürde de yer alan, homojen olmayan durumların mekanik performansı olumsuz yönde etkilediği düzenlilik arttıkça performansın iyileştiği sunulan çalışmada görülmüştür. Ayrıca doldurucu malzemenin katkı miktarının da optimal bir değere sahip olduğu ve bu değer altında kalan katkı miktarlarında da mekanik performansın olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür.

**Tablo 3.** Deneysel gruplarda mekanik performanslara ait değişim yüzdeleri

DeneySEL Grup	Ağırlık yüzdesi	Gerilim (MPa)	Elastik modülüs (GPa)	Tokluk (kJ/m <sup>2</sup> )
Düzensiz	0,05%	- %42	- %28	- %54
	0,25%	%7	- %1	%16
	1%	%19	%20	%25
	1,25%	%41	%53	%31
Tasarım 1	0,05%	- %5	%18	- %27
	0,25%	%35	%18	%73
	1%	%26	%38	%42
	1,25%	%20	%56	- %16
Tasarım 2	0,05%	%67	%103	%34
	<b>0,25%</b>	<b>%104</b>	<b>%109</b>	<b>%98</b>
	1%	%86	%85	%76
	1,25%	%74	%80	%70

### 3.2. İkinci gruba ait deneysel bulgular

Sunulan çalışmanın ikinci bölümünde farklı polimerik nanofiberlerin kompozit üretimindeki etkisi araştırılmıştır. Bu etki, yine mekanik performans perspektifinden ve yine üç nokta eğme testi kullanılarak incelenmiştir. İki ayrı polimer yapısı PS ve PMMA kullanılarak bölüm 2.1’de bahsedilen yüzdelerle çözeltilere ait optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmasında elde edilen çap aralıkları Tablo 4’te özetlenmiştir.

**Tablo 4.** PS ve PMMA polimerleri kullanılarak belirlenen optimal çözelti yüzdeleri

Polimer	Çözelti Yüzdesi (%w/w)	Çap Aralıkları (nm)
PS	%17.5	<b>375 – 745</b>
	%20	648 – 1505
	%22.5	2011 – 3028
PMMA	%32,5	<b>210 – 535</b>
	%35	667 – 1309
	%37,5	1311 – 1829

Optimal çözelti yüzdeleri, en küçük değerlere sahip çap aralığına sahip değer olarak seçilmiş olup, PS için %17,5 ve PMMA için %32,5’tir. Bu değerlerden daha küçük yüzdelerde ise boncuk yapıları oluştuğu için tercih edilmemişlerdir. Çözelti yüzdesi optimizasyonu sonrasında PVA için gerçekleştirilen mekanik performans karakterizasyonu PS ve PMMA polimerleri için de gerçekleştirilmiştir. Her ağırlık yüzdesi için sekiz ayrı numune üç nokta eğme testi ile karakterize edilerek kontrol grubu referans alınarak Tablo 5’te yer alan değişim yüzdeleri hesaplanmıştır.

**Tablo 5.** Ağırlık yüzdelerine bağlı mekanik performans değişim yüzdeleri

DeneySEL Grup	Ağırlık yüzdesi	Gerilim (MPa)	Elastik modülüs (GPa)	Tokluk (kJ/m <sup>2</sup> )
PS	0,5%	%56	%55	%192
	1,1%	%164	%73	%248
	2,3%	%173	%121	%314
	5,4%	<b>%243</b>	<b>%195</b>	<b>%416</b>
PMMA	0,5%	%54	%93	%67
	1,1%	%172	%95	%177
	2,3%	%187	%132	%205
	5,4%	<b>%246</b>	<b>%210</b>	<b>%390</b>

Protez kaide malzemesi olarak kullanılan malzeme (PMMA) ile seçilen polimerler arasında gerçekleşen ara yüzey etkileşimleri değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda PVA gibi daha düşük mekanik dayanımlara sahip polimer yapısına göre mekanik dayanımı daha iyi polimer nanofiber yapılarla mekanik performansta çok daha iyi sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu bağlamda mekanik dayanımı daha iyi polimerlerin düzenliliğinin artırılması ile bu iyileştirmenin yüzde olarak artacağı çalışmanın beklenen bir durumdur.

#### 4. SONUÇ

Literatürde yer alan dental kompozit çalışmalarında kompozitlerin ağız içi mekanik performanslarının iyileştirilmesi açısından birçok yöntem geliştirilmiştir. İnorganik dolduruculardan, makro fiber yapılara kadar pek çok farklı yöntem ile iyileştirilen mekanik performanslar yeni yöntemlerin ortaya çıkması dental kompozitlerde yeni bir döneme girmiştir. Makro seviyede elde edilen iyileştirmeler yüzey alanının artırıldığı mikro düzey katkılarla yeni bir noktaya taşınmıştır. Teknolojinin gelişmesi ile nano seviyede üretilen yeni malzemelerle mekanik performanslarda elde edilen iyileştirmeler çok daha iyi seviyelerde sonuçlar elde etmiştir. Sunulan çalışmada, makro seviyeden nano seviyeye indirgenen doldurucu malzeme yaklaşımları ile mekanik performanslarda çok daha iyi sonuçlar elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu doldurucu malzemelerin homojenitesinin artırılması ile mekanik iyileştirmenin daha geliştirildiği ortaya konmuştur. Gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda, mekanik dayanımı açısından başarımlar gösteren nanomalzemelerin kompozit malzeme üretiminde kullanılması ile çok daha iyi materyallerin üretilmesi beklenmektedir. Bu çalışma, katkılama esnasında kullanılan nanofiber miktarının artırılmasının, kompozit dayanımlarda önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Diğer taraftan, kullanılan nanofiber tipine göre belli bir katkılama eşik değeri sonrasında ise tam tersi olarak mekanik dayanımda kayıplar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca, PS ve PMMA nanofiberler, PVA'ya göre daha belirgin tokluk değeri artışları ile mekanik performans açısından tercih edilebilir niteliktedir.

#### 5. TEŞEKKÜR

Çalışmamızın bir kısmını oluşturan, "Tekstil endüstrisinde kullanılan polimerik yapılarla kompozit üretimi ve karakterizasyonu" ile "Akrilik içerikli diş kompozit materyallerinin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi" isimli projelerimize verdikleri maddi desteklerden ötürü TÜBİTAK BİDEB 2209 programına teşekkürlerimizi sunarız.

#### 6. KAYNAKLAR

- Acosta-Torres, L. S., López-Marín, L. M., Núñez-Anita, R. E., Hernández-Padrón, G., Castaño, V. M. 2011. "Biocompatible Metal-Oxide Nanoparticles: Nanotechnology Improvement of Conventional Prosthetic Acrylic Resins". *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1–8.
- Cramer, N. B., Stansbury, J. W., Bowman, C. N. 2011. "Recent advances and developments in composite dental restorative materials". *Journal of Dental Research*, 90(4), 402–416.
- Dodiuk-Kenig, H., Lizenboim, K., Roth, S., Zalsman, B., McHale, W. A., Jaffe, M., Griswold, K. 2008. "Performance Enhancement of Dental Composites Using Electrospun Nanofibers". *Journal of Nanomaterials*, 2008(1), 1–6.

- Dogan, M., Karatay, O., Cokeliler, D., Kocum, I. C. 2009. "Design and Implementation of Electrospinning System". İçinde *2009 14th National Biomedical Engineering Meeting* (ss. 1–4). IEEE.
- Fong, H. 2004. "Electrospun nylon 6 nanofiber reinforced BIS-GMA/TEGDMA dental restorative composite resins". *Polymer*, 45(7), 2427–2432.
- K.J., A., Phillips, R. W. 2003. "*Phillips' Science of Dental Materials*". Elsevier, St. Louis. Tarihinde adresinden erişildi <https://www.elsevier.com/books/phillips-science-of-dental-materials/anusavice/978-1-4377-2418-9>
- Karatay, O., Dogan, M., Uyar, T., Cokeliler, D., Kocum, I. C. 2014. "An Alternative Electrospinning Approach With Varying Electric Field for 2-D-Aligned Nanofibers". *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 13(1), 101–108.
- Karthick, R., Sirisha, P., Sankar, M. R. 2014. "Mechanical and Tribological Properties of PMMA-Sea Shell based Biocomposite for Dental application". *Procedia Materials Science*, 6(Icmpec), 1989–2000.
- Koçum, C. 2011. "Digitally gain controlled linear high voltage amplifier for laboratory applications". *Review of Scientific Instruments*, 82(8), 084702.
- PROTOPAPA, P., KONTONASAKI, E., BIKIARIS, D., PARASKEVOPOULOS, K. M., KOIDIS, P. 2011. "Reinforcement of a PMMA resin for fixed interim prostheses with nanodiamonds". *Dental Materials Journal*, 30(2), 222–231.
- Sodagar, A., Kassae, M. Z., Akhavan, A., Javadi, N., Arab, S., Kharazifard, M. J. 2012. "Effect of silver nano particles on flexural strength of acrylic resins". *Journal of Prosthodontic Research*, 56(2), 120–124.
- Uyar, T., Çökeliler, D., Doğan, M., Koçum, I. C., Karatay, O., Denkbaş, E. B. 2016. "Electrospun nanofiber reinforcement of dental composites with electromagnetic alignment approach". *Materials Science and Engineering: C*, 62, 762–770.

## The synthesis, characterization and spectroscopic study of new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes

Ahmet Kilic<sup>1\*</sup>, Levent Beyazsakal<sup>2</sup>, Rahime Yavuz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, Turkey.

<sup>2</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, Turkey..

<sup>3</sup>Harran University, Science and Art Faculty, Chemistry Department, Saniurfa, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: leventbeyazsakal@gmail.com

### Abstract

Since the boron center can be readily converted from neutral trigonal planar  $sp^2$  to tetrahedral  $sp^3$  hybridization under suitable conditions, it is possible to synthesize three and four-coordinated boron compounds with unique properties and different chemical structures. Also, three-coordinated boron compounds are strong Lewis acids because boron has an empty p-orbital which allows them to form four-coordination bonds with various nucleophiles as well as covalent B-O and coordinated covalent B-N bonds make the structure stable in air. In this context, the various salen ligand containing boron structures and related molecules have become an important part of today's fine chemical industry and laboratory studies for the preparation of functionalized molecules. On the other hand, recent studies have revealed fascinating new roles for boron compounds due to their unique electronic and physicochemical properties and the wide range of application fields in the chemistry and other science fields. In view of the promising results, a new amine bis(phenolate) ligand with the corresponding neutral boron complexes have been successfully synthesized and characterized at ambient conditions. All the newly synthesized amine bis(phenolate) ligand with the corresponding neutral boron complexes were characterized by NMR ( $^1H$  and  $^{13}C$ ) spectroscopy, FT-IR spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, LC-MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis. Following a full characterization, the study of spectroscopic properties of amine bis(phenolate) ligand with the corresponding neutral boron complexes was done in detail.

**Keywords:** amine bis(phenolate) ligand, boronic acid, boron complexes, Spectroscopy, Synthesis

### INTRODUCTION

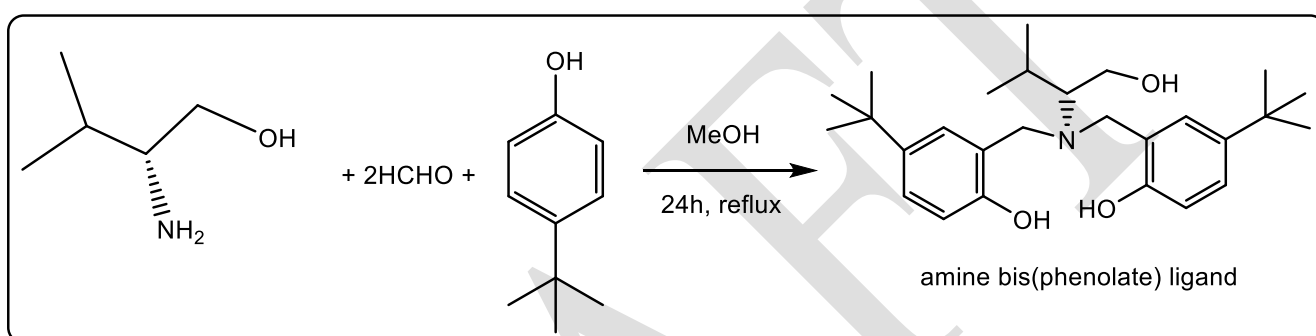
The design of new ligands for many applications is very important still. The development of various tetradentate amino-bis(phenolate) ( $O_2ND$ , with D = extra donor such as N, O, S. . .) ligands and the study of their coordination chemistry gain increasing attention since the seminal work of Spence and coworkers in 1989 (Hinshaw and et al., 1989). The use of diamino-bis(phenolate) late transition metal complexes in catalysis is more recent and limited to reactions such as cross-couplings (Bowser and et al., 2016; Hasan and et al., 2011) and the conversion of  $CO_2$  and epoxides to cyclic carbonates and/or polycarbonates (Taherimehr and et al., 2015; Saunders and et al., 2012). However, recently introduced the amine bis(phenolate) family of ligands to group IV metal chemistry (Tshuva and et al., 2001). To the best of our knowledge, the use of boron compounds and, in general, the use amino-bis(phenolate) of boron complexes for different applications fields. So we focused on this issue in our work. Boron compounds are usually found in two different coordination structures. Three-coordinated boron compounds are strong Lewis acids because boron has an empty p-orbital which allows them to form four-coordination bonds with various nucleophiles as well as covalent B-O and coordinated covalent B-N bonds make the structure stable in air. In this context, the various salen ligand containing boron structures and related molecules have become an important part of today's fine chemical industry and laboratory studies for the preparation of functionalized molecules. On the other hand, recent studies have revealed fascinating new roles for boron compounds due to their unique electronic and physicochemical properties and the wide range of application fields in the chemistry and other science fields. Also, industry and academia are paying increasing attention to boron compounds in order to develop novel molecules for use in the various application areas such as catalysis, toxicology, cosmetic, pharmacology, textiles, ceramic, glass, industry, agriculture, energy, construction, industry, and communication tools, detergent (Kotali and et al., 2015; Kilic and et al., 2014).

In the light of this information given about amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes, we report on a series of amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes for synthesis detail spectroscopic studies. For this purpose, the amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes successfully were prepared and

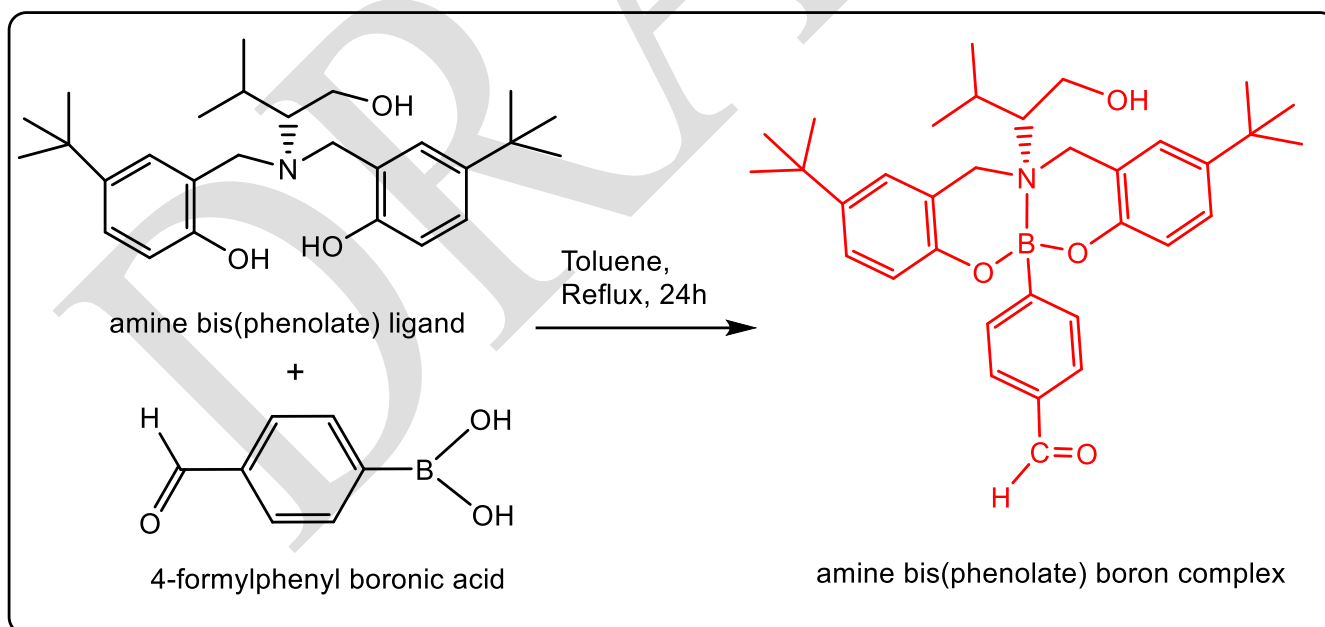
characterized by various spectroscopic techniques including NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), FT-IR, UV-Vis, LC-MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques.

## MATERIALS AND METHODS

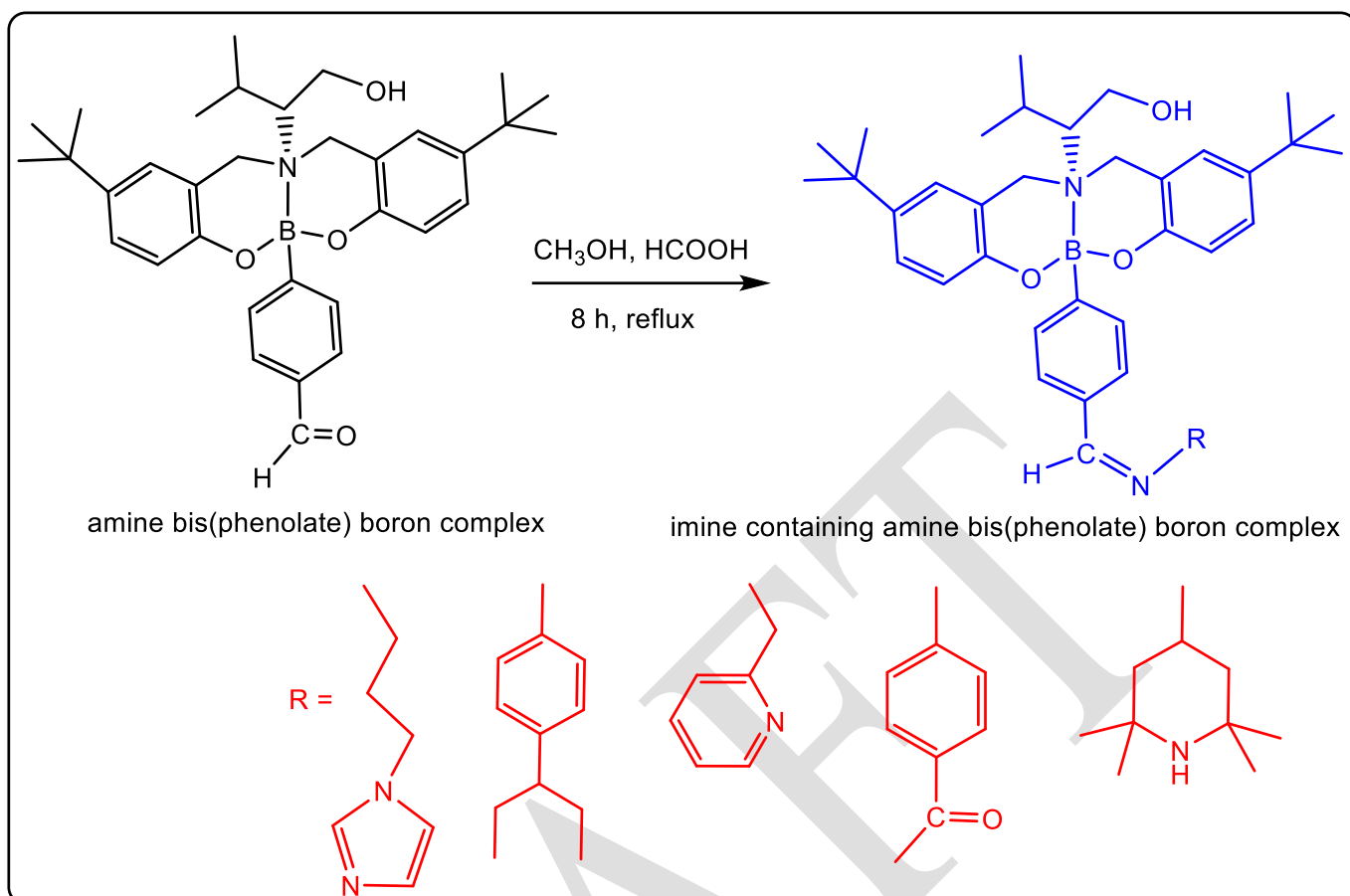
All organic solvents and starting materials used for the amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were commercially available, and used without any additional purification and any additional chemical process. FT-IR spectra were obtained in the range of 4000-400 cm<sup>-1</sup> using the ATR accessory using a Perkin-Elmer Two UATR-FT spectrophotometer. UV-Vis measurements were acquired on a Perkin-Elmer model Lambda 25 spectrophotometer in the range of 200 to 1100 nm and CHCl<sub>3</sub> with C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH have been selected as solvents. <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on an Agilent Technologies and on a Bruker Avance III (<sup>1</sup>H: 400 MHz, and <sup>13</sup>C: 100 MHz) in CDCl<sub>3</sub> or DMSO-d<sub>6</sub> using TMS as internal standard. The mass spectra (LC-MS/MS) were obtained through using an **Agilent** LC-MS/MS spectrometer by ESI technique. Elemental analyses for C, H and N were performed on a LECO CHNS 932 model elemental analyzer. Melting points of all complexes have been determined in open capillary tubes on an Electrothermal 9100 melting point apparatus and are uncorrected.



*Scheme 1. Synthesis of amine bis(phenolate) ligand*

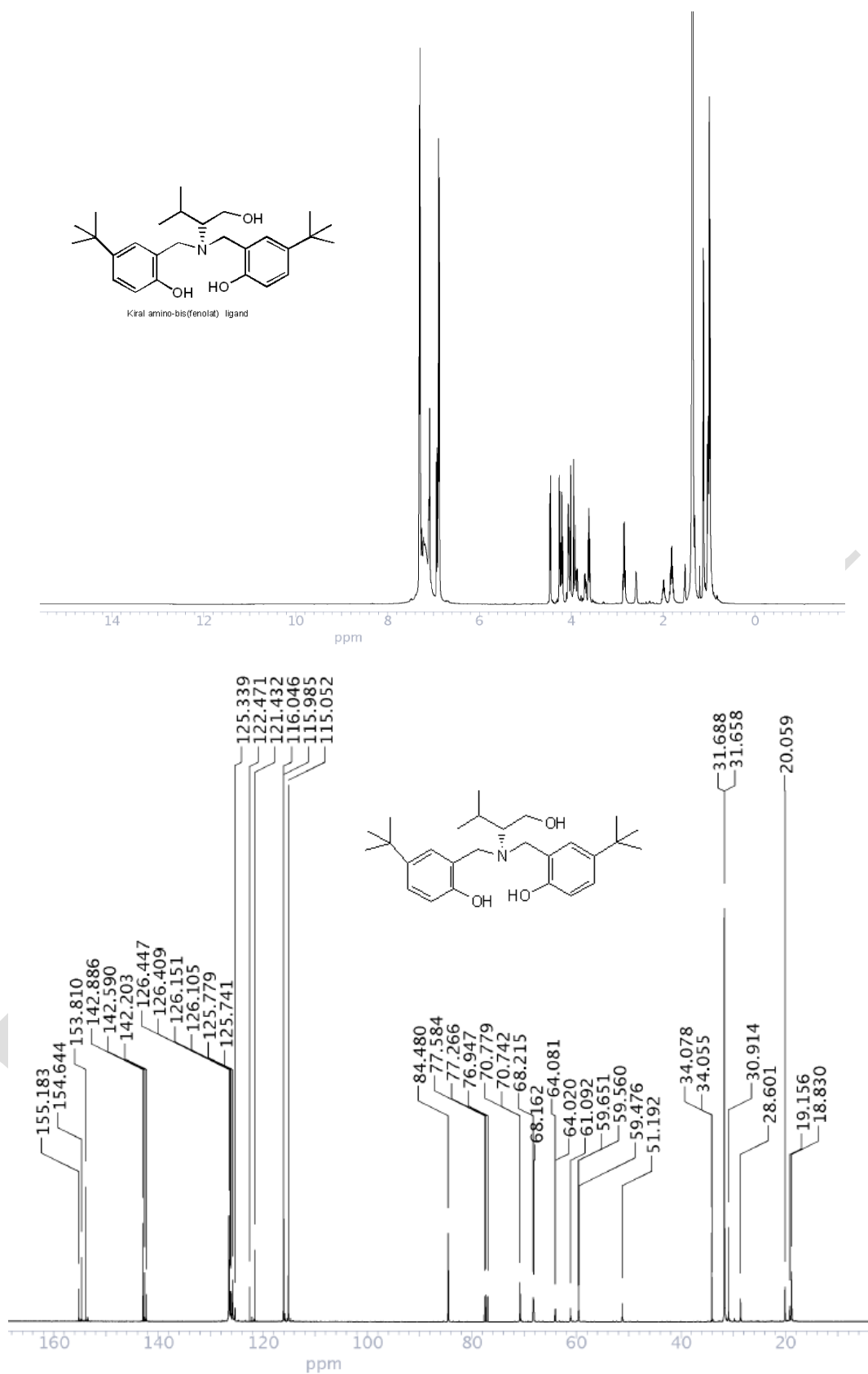


*Scheme 2. Synthesis of amine bis(phenolate) boron complex*



**Scheme 3. Synthesis of imine containing amine bis(phenolate) boron complexes**

The formation of the new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were fully corroborated through a combination of NMR (<sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C), FT-IR, UV-Vis, LC-MS/MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques. Attempts at growing crystals of the new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes suitable for single-crystal XRD were not successful. However, the obtained spectroscopic and analytical results of the new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes are consistent with the proposed structure. The new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were isolated as a powder that is air stable in the solid state and all compounds were followed by TLC technique. TLC analysis revealed that the compounds were sufficiently pure and also their purity was evaluated from CHN elemental analysis. All spectroscopic evidence also confirms the [ONO] nature of the coordination of the imine nitrogen and phenolic oxygen coordinated to the boron center.



**Figure 1.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectrum of amine bis(phenolate) ligand

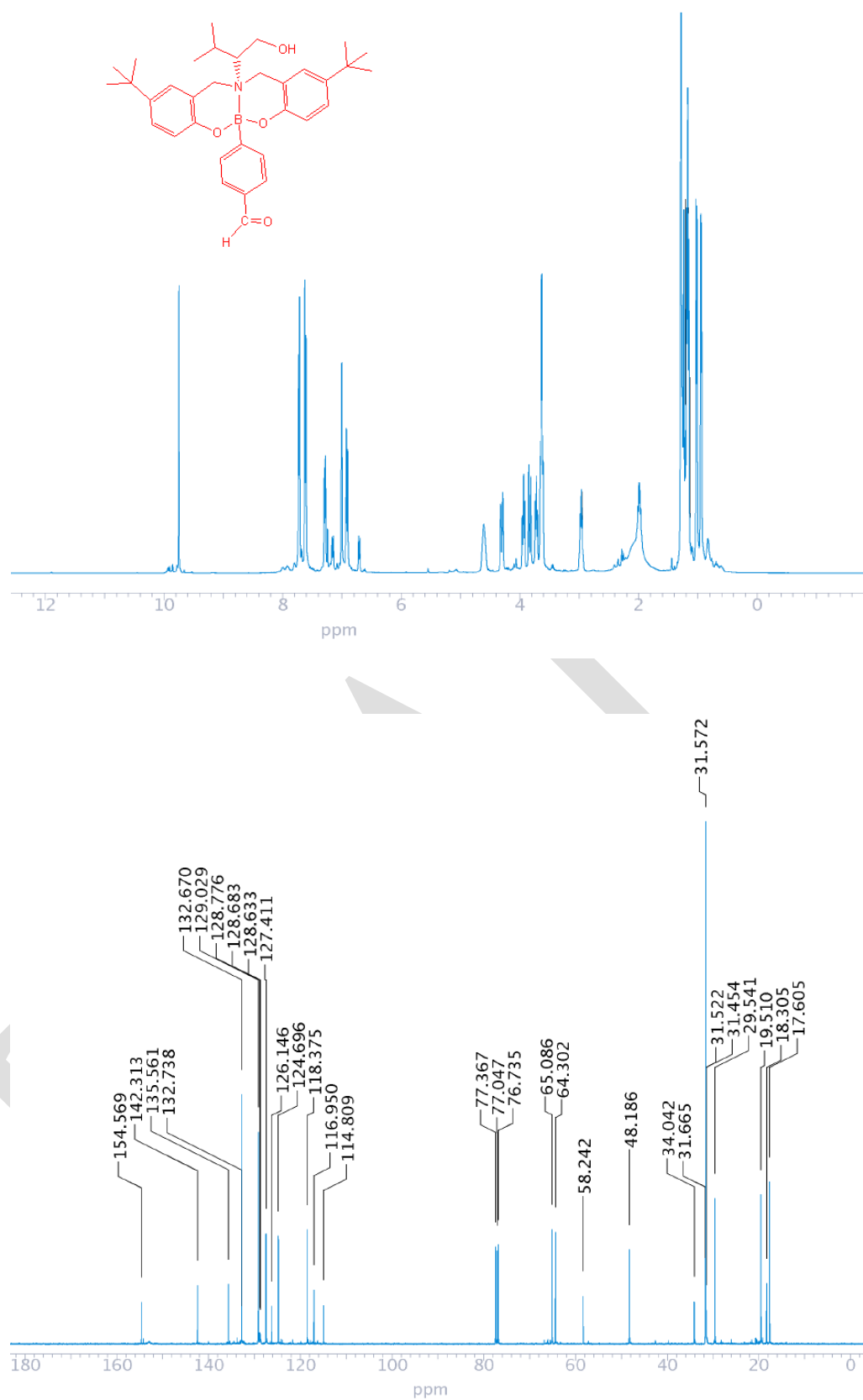
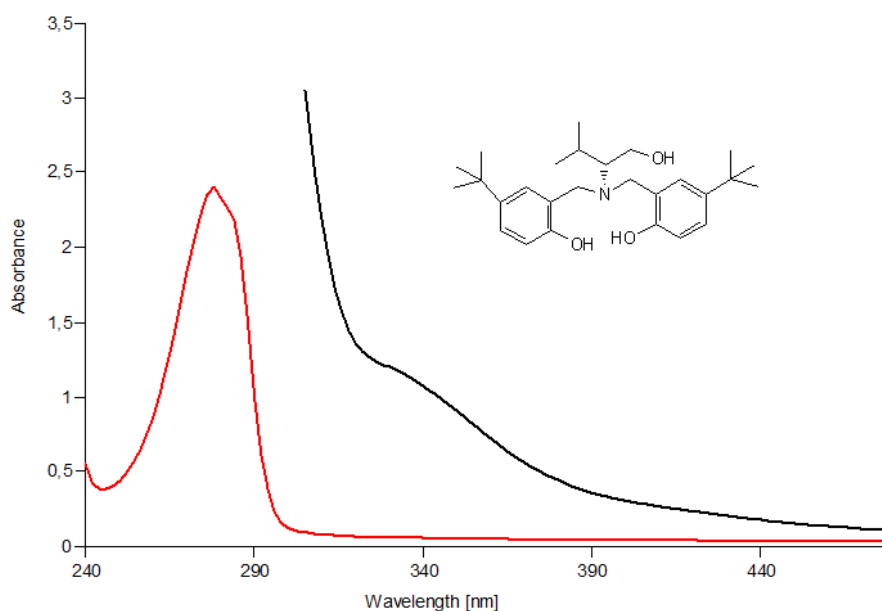
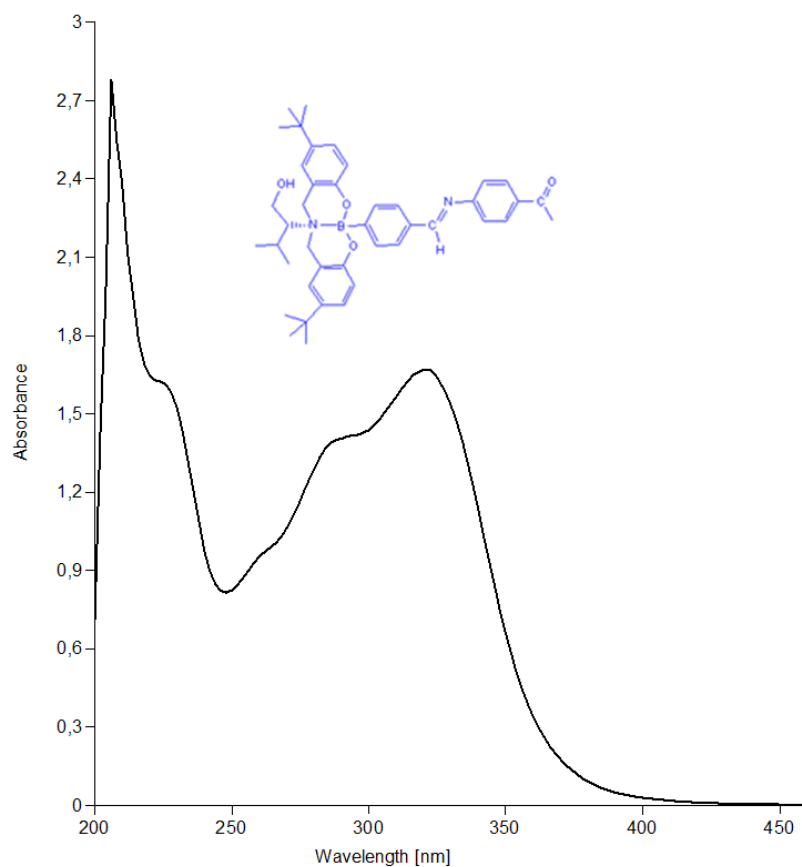


Figure 2. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectrum of amine bis(phenolate) boron complex





**Figure 3.** UV-Vis spectrum of amine bis(phenolate) ligand in EtOH solvent



**Figure 4.** UV-Vis spectrum of imine containing amine bis(phenolate) boron complex in EtOH solvent

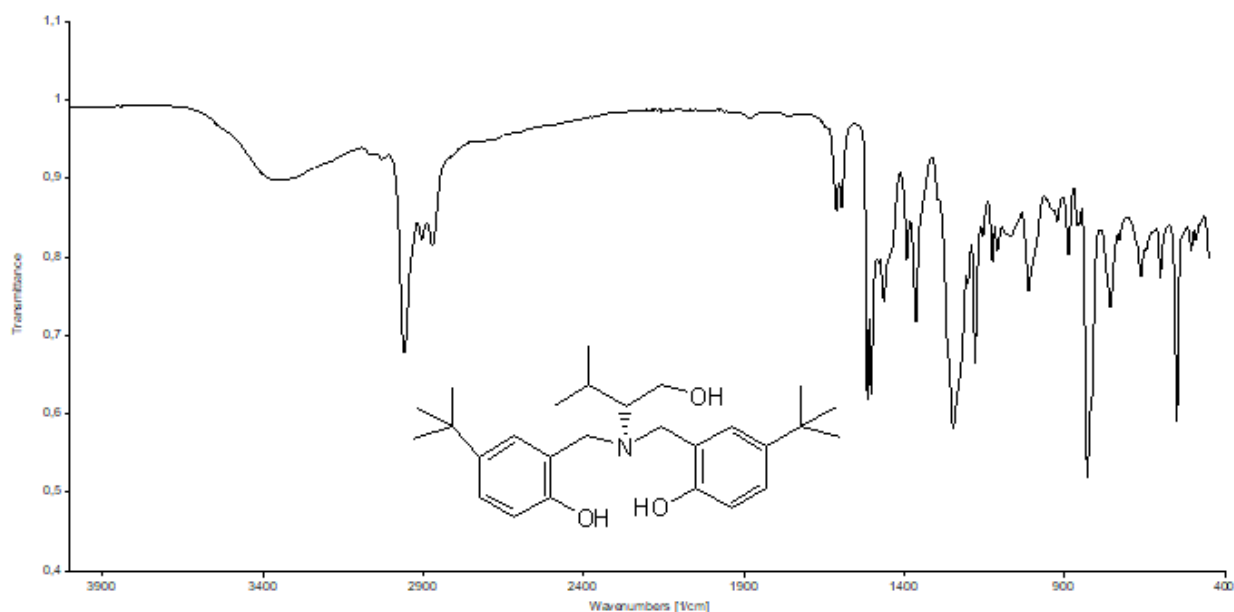


Figure 5. FT-IR spectrum of amine bis(phenolate) ligand

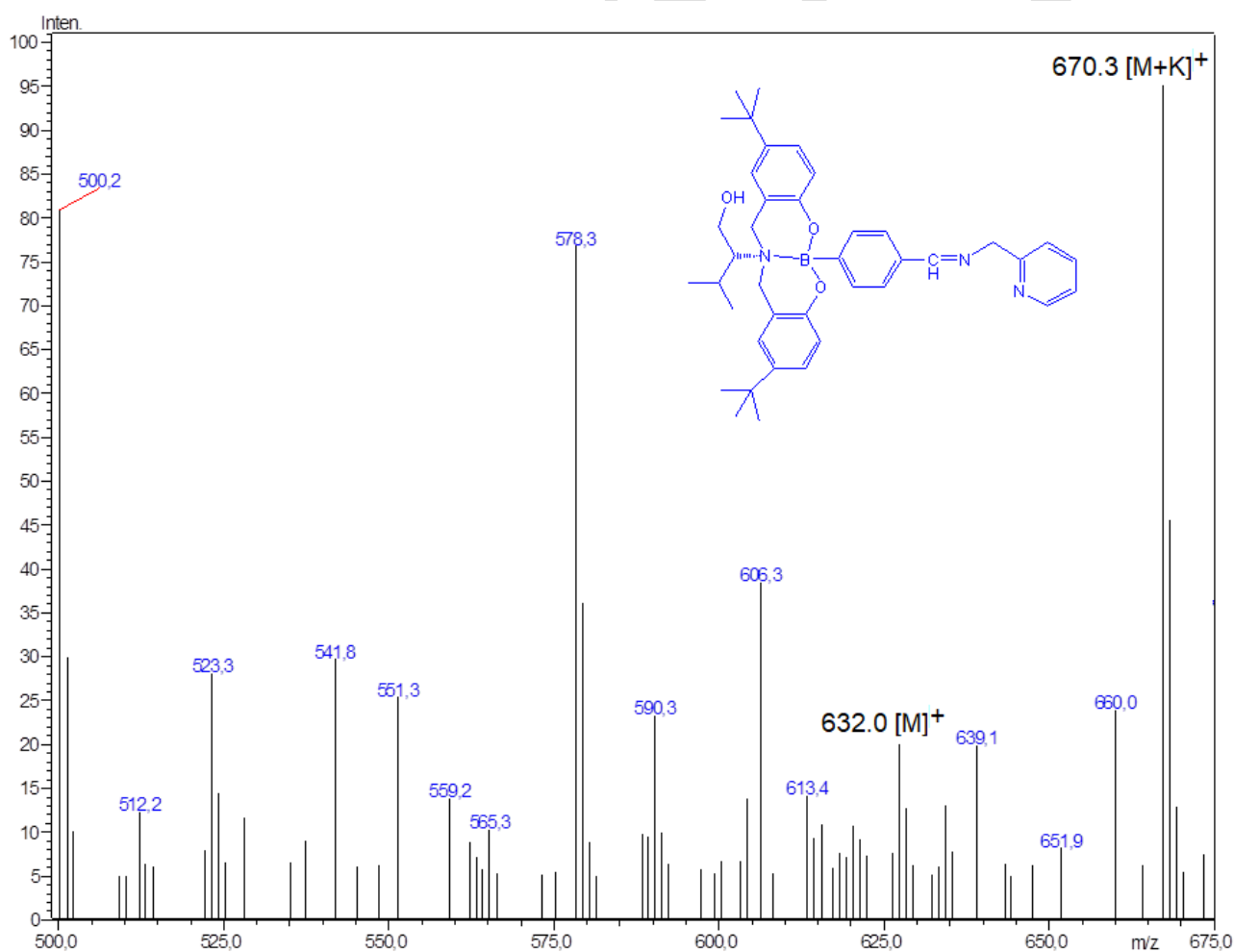


Figure 6. LC-MS/MS spectrum of imine containing amine bis(phenolate) boron complex

## RESULTS and DISCUSSION

In this study, Initially a new amine bis(phenolate) ligand were obtained from (R)-(-)-2-Amino-3-methyl-1-butanol and 4-tert-butylphenol presence of formaldehyde in methanol at reflux temperature with a 80%, as

shown in Scheme 1. After purification and full characterization of the a new amine bis(phenolate) ligand, as shown in Scheme 2, amine bis(phenolate) boron complex were obtained from the a new amine bis(phenolate) ligand and 4-formylphenyl boronic acid in toluene at reflux temperature over 24 h with a good 75%, and are soluble in most polar organic solvents. Subsequently, as shown in Scheme 3, imine containing amine bis(phenolate) boron complexes were obtained from the amine bis(phenolate) boron complex and different primary amines presence of HCOOH as catalyst in EtOH at reflux temperature over 8h. A new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes have been characterized by NMR (<sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C), FT-IR, UV-Vis, LC-MS/MS spectroscopy, melting point, and elemental analysis techniques (Figure 1-6). Attempts at growing crystals of the all compounds suitable for single-crystal XRD were not successful. However, the obtained spectroscopic and analytical results of all compounds are consistent with the proposed structure. The FT-IR data of all imine containing amine bis(phenolate) boron complexes show very similar stretching vibrations probably due to similar chemical environment of the boron center, as expected. The very broad bands in the range 3555-3109 cm<sup>-1</sup> correspond to the stretching vibrations of intermolecular H-bond  $\nu(\text{O}-\text{H}\cdots\text{H})$  vibrations in amine bis(phenolate) ligand, in which intermolecular H-bond  $\nu(\text{O}-\text{H}\cdots\text{H})$  vibrations disappeared in the FT-IR spectra of all boron complexes, as expected. Furthermore, the other stretching vibrations in the FT-IR spectra of all compounds also support the formation of the proposed compounds. Further evidence for the formation of a new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were obtained from the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra. The most characteristic <sup>1</sup>H NMR peaks that confirm the formation the a new amine bis(phenolate) ligand were observed and identified one singlet resonances at range 6.87 ppm attributed to intramolecular D<sub>2</sub>O exchangeable *ortho* ( $\text{O}-\underline{\text{H}}$ ) resonance, in which *ortho*  $\nu(\text{O}-\underline{\text{H}})$  vibrations disappeared in the <sup>1</sup>H NMR spectra of all boron complexes, as expected. Moreover, the NMR data show that the chemical shift of <sup>13</sup>C peaks supports the formation of the amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes. Regarding the UV-Vis absorption spectroscopy, the a new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were obtained in C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH and CHCl<sub>3</sub> (2.10<sup>-6</sup>-2.10<sup>-8</sup> M) at room temperature. Further confirmation of the formation of the proposed new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes was also provided by LC-MS/MS spectrometry. The LC-MS/MS spectral results showed the expected molecular and fragmentation ions, with appropriate isotope distribution and the isotopic distribution of parent ions in the spectra demonstrated the presence of one atom of boron in the boron compounds.

## CONCLUSION

In this study, the new amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes were successfully synthesized and characterized by means of NMR spectroscopy (<sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C), FT-IR, UV-Vis, LC-MS, melting point as well as elemental analysis. Following a full characterization, the study of spectroscopic properties of these novels boronate esters was done in detail. Ongoing investigations are focused on the synthesis of the amine bis(phenolate) ligand and their boron complexes for the different applications fields.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge gratefully the financial support from Research Fund of Harran University, Sanliurfa, Turkey.

## REFERENCES

- Bowser AK, Anderson-Wile AM, Johnston DH, Wile BM 2016. Appl. Organomet.Chem. 30: 32-39
- Hasan K, Dawe LN, Kozak CM 2011. Eur. J. Inorg. Chem. 2011: 4610-4621.
- Hinshaw CJ, Peng G, Singh R, Spence JT, Enemark JH, Bruck M, Kristofzski J, Merbs SL, Ortega RB, P.A. Wexler PA 1989. Inorg. Chem. 28: 4483-4491.
- Kilic A, Aydemir M, Durgun D, Meric N, Ocak YS, Keles A, Temel H 2014. J. Fluorine Chem. 162: 9-16 and references therein.
- Kotali A, Dimoulaki F, Kotali E, Maniadaki A, Harris PA, Sokolowska ER, Balczewski P, Joule JA 2015. Tetrahedron 71: 7245-7249 and references therein.
- Saunders LN, Ikpo N, Petten CF, Das UK, Dawe LN, Kozak CM, Kerton FM 2012. Catal. Commun. 18: 165-167.
- Taherimehr M, Serta JP, Kleij AW, Whiteoak CJ, Pescarmona PP 2015. ChemSusChem 8: 1034-1042.
- Tshuva EY, Goldberg I, Kol M, Goldschmidt Z 2001. Organometallics 14:3017-3028.

## Keçi Sütüne Uygulanan Farklı Isıl İşlemlerin Peynir Özelliklerine Etkileri

Sabriye Bükre Oral<sup>\*1</sup>, Serap Duraklı Velioğlu<sup>2</sup>, Hasan Murat Velioğlu<sup>1</sup>

<sup>\*1</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

<sup>2</sup>Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: mvelioglu@nku.edu.tr

### Özet

İnek sütünün bazı tüketicilerde alerjiye yol açması ve sindiriminin bazı durumlarda zor olması sebebiyle Paleo, düşük karbonhidrat veya ketosis diyeti gibi özel diyetler yapan kişilerin keçi sütü ve ürünlerine olan ilgisi son yıllarda önemli artış göstermiştir. Birçok kaynakta anne sütüne oldukça yakın besleyicilik özelliklerine sahip olduğu vurgulanan keçi sütünün bebek gıdalarında da kullanımı artmıştır. Diğer taraftan geleneksel bir ürün olan keçi peynirinin hem gastronomik açıdan hem de sağlık açısından daha fazla talep görmeye başladığı anlaşılmaktadır. Çiğ sütün sebep olabileceği mikrobiyolojik risklerin dikkate alınmadığı durumlarda, keçi peyniri geleneksel olarak çiğ sütün hayvandan sağıldıktan sonra doğrudan peynir mayası ile mayalanması şeklinde üretilmektedir. Bu üretim metodunun taşıdığı riskler hakkında farkındalık arttıkça, pastörizasyon sıcaklığına kadar ısıl işlem uygulama veya kaynatma sonrasında mayalamanın da uygulanmaya başladığı görülmektedir. Ancak tüketici algısında çiğ süttten üretilen peynirin yapısal ve duyuşal özellikler açısından daha iyi olduğu şeklinde bir inanış olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, Kırklareli ilinden temin edilen çiğ süt (i) sadece 40°C'ye ısıtılarak, (ii) 63°C'de pastörize edilerek, (iii) 72°C'de pastörize edilerek ve (iv) kaynatılarak peynire işlenmiştir. Elde edilen peynirler elektron mikroskopunda incelenmiş, ayrıca tekstür, kuru madde ve kül analizleri yapılmıştır. Elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde, sadece ısıtma uygulanan peynir örneklerinde peynir yapısını oluşturan partiküller arası boşlukların daha fazla olduğu, pastörizasyon sıcaklığı arttıkça yapının daha homojen hale gelmeye başladığı anlaşılmaktadır. Diğer taraftan kaynatma işleminin protein denatürasyonunu aşırı miktarda arttırması dolayısıyla yapının yine boşluklu bir hale geldiği görülmüştür. Tekstürel açıdan incelendiğinde ise sadece 40°C'ye ısıtılma işlemi uygulanan peynir örneğinin daha yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik değerlerine ulaştığı görülmüş; bununla birlikte bu değerlerdeki farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı ( $P>0,05$ ) belirlenmiştir. Kuru madde içerikleri açısından en yüksek değer kaynatılmış süttten üretilen peynirlerde bulunmuştur. Sonuç olarak, yapısal olarak önemli bir fark gözlenmemesi yanında mikrobiyolojik riskler göz önüne alındığında peynire işlenecek sütün pastörize edilerek kullanılmasının daha doğru bir yol olacağı açıktır.

**Anahtar Kelimeler:** Keçi peyniri, Pastörizasyon, Kaynatma, Çiğ süt

### GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin sağlıklı gıdalara olan ilgisinin artmasıyla keçi sütü ve ürünlerinin giderek önemli bir hale geldiği söylenebilir. Keçi sütü laktoz oranı bakımından yüksek proteinlere sahip olup, değerli besin elementlerini de içermektedir. Keçi sütü, iyi bir kalsiyum kaynağı olduğu gibi organizmada iltihaplanmayı da engellemektedir. Keçi sütünün taşıdığı besinsel öğeler açısından anne sütüne en yakın süt olduğu ve doğal homojenize bir yapıya sahip olduğu da savunulmaktadır [1]. Keçi sütünün yapısında bulunan serum proteinlerinin alerjiye yol açmamasından dolayı bazı cilt hastalıklarında ve sindirim sistemi problemlerinde tedavi edici özellikte olduğu da belirtilmektedir[2]. Türkiye'de küçük işletmeler tarafından elde edilen keçi sütleri peynir, yoğurt, tereyağı yapımında kullanılmaktadır. Bazı firmalar tarafından keçi sütü son yıllarda marketlerde satışa sunulmaktadır [3]. Keçi sütünün sindirim kolaylığı ve bulundurduğu besinsel öğelerin zenginliğinden dolayı sadece süt şeklinde değil aynı zamanda süt ve süt ürünleri şeklinde tüketiciye sunulmaktadır. Ülkemizde peynir üretiminin büyük bir bölümü, yeterli donanımdan yoksun küçük işletmelerde ve starter kültür kullanmaksızın yapılmaktadır [4]. Peynir yapım aşamaları işletmelerde çalışan ustaların bilgi ve becerisine bağlı kalmakta, bu durum bileşimleri farklı ve hijyenik kaliteden yoksun peynirlerin üretilmesine neden olmaktadır [5]. Çiğ süttten elde edilen peynirler içeriğinde hastalık yapıcı birçok patojen mikroorganizma taşıyabilir. Bu nedenle peynirde kullanılacak süttteki mikroorganizmaların etkilerinin süttten uzaklaştırılması, yok edilmesi ya da öldürülmesi gerekmektedir. Süttteki mikroorganizmaların yok edilmesinde kullanılan en yaygın yöntem, süte ısıl işlem uygulanmasıdır [6,7]. Pastörizasyon yöntemiyle sütte bulunan saprofitlerin çok büyük bir kısmı, patojenlerin ise tamamı ortadan kaldırılmaktadır. Böylelikle peynir verimi artar. Bu artış, tekstürel yönden peynir kalitesini de arttırmaktadır[8].

Bu çalışmada, peynirde kullanılacak süte uygulanan farklı ısıl işlemlerin peynir bileşimine etkisi ve taşınan mikrobiyolojik risklerin göz önüne alınarak pastörizasyon işleminin insan sağlığı açısından önemini belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada peynir üretimi için kullanılan keçi sütü Kırklareli ilinde bulunan bir keçi ağılından temin edilmiştir. Peynir yapında farklı ısıl işlem uygulamaları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji laboratuvarında bulunan su banyosu ve manyetik karıştırıcı kullanılarak yapılmıştır. Tekstür analizi ve elektron mikroskobu görüntüleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi bünyesinde bulunan NABİLTEM laboratuvarlarında yapılmıştır. Kül ve kuru madde analizleri de Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarlarında bulunan kül fırını, desikatör, teraziler ve etüv yardımı ile yapılmıştır.

### Metot

Temin edilen çiğ süt sadece 40°C'ye ısıtılarak, 63°C'de pastörize edilerek, 72°C'de pastörize edilerek ve kaynatılarak peynire işlenmek için 4 gruba ayrılmıştır. Birinci grup 72°C'ye kadar su banyosunda ısıtılmıştır. İstenilen dereceye gelen süt 15 saniye bekletildikten sonra kontrollü koşullarda 45°C'ye düşürülerek 0.25 gr kültür eklenerek 15 dakika beklenmiştir. Sütün ısıyı yeniden kontrollü koşullarda 40°C'ye düşürülerek 0.4ml enzim+0.25 gr CaCl<sub>2</sub> eklenmiştir. Pıhtılaşma işlemine bırakılan peynirin kontrollü koşullarda pH'sının 6.1'e gelmesi beklenmiş ve mayalanma işlemine son verilmiştir. Mayalanmaya son verildikten sonra peynir beze alınarak süzme işlemine bırakılmıştır. Bir gece süzme işleminde bırakılan peynire daha sonrasında baskı işlemi uygulanmıştır. Diğer üç grup süte de istenilen ısılar kontrollü koşullar sağlanarak uygulanmış ve gerekli bekleme süreleri uygulandıktan sonra peynirler elde edilmiştir. Baskıdan alınan peynirler 3x3x3 ebatlarında kesilerek %15'lik tuz çözeltisi eklenerek salamura haline getirilmiştir.

Üretilen peynirlerin tekstür, kuru madde ve kül analizleri belirlenen prosedürler göz önüne alınarak yapılmıştır. Tekstürel analiz sonucunda elastikiyet, çiğnenebilirlik ve sertlik belirlenmiştir. Elektron mikroskobundan elde edilen görüntüler ile peynirlerin yapısı incelenmiştir, uygulanan sıcaklıkların peynirin yapısında bulunan proteinlerin denatürasyonuna olan etkisine bakılmıştır. Sıcaklığın peynir partikülleri arasındaki boşluğa ve homojenizasyona etkisi incelenmiştir. Kül tayini için ön yakma işlemi uygulanmış ve numuneler kuruması için kül fırınına bırakılmıştır. Örneklerin tam olarak kuruması 9 gün sürmüştür. Kuru madde analizi için belirli miktardaki örnek sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmaya bırakılmıştır.

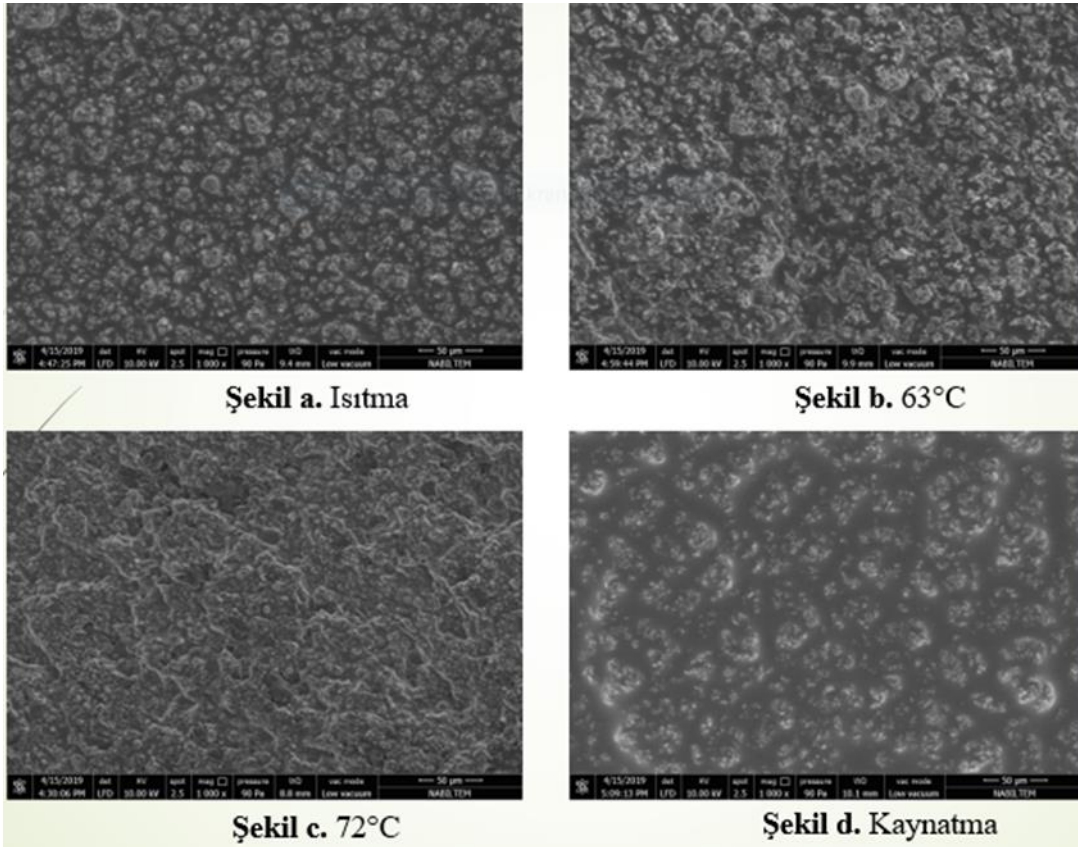
## BULGULAR

**Tablo1. Tekstür Analizi Sonuçları**

Isıl işlem	Sertlik (g)	Elastikiyet (s)	Çiğnenebilirlik (g.s)
Isıtma (40°C)	10790	6264	5365
Pastörizasyon (63°C)	5487	2632	1999
Pastörizasyon (72°C)	4745	1601	1040
Kaynatma	4645	2195	1769

Tekstürel analiz sonucunda elde edilmiş olan tablo 1 incelendiğinde 40°C ısıtılarak elde edilen peynir örneklerinde daha yüksek sertlik ve çiğnenebilirlik değerlerine ulaşıldığı görülmüş; bununla birlikte bu değerlerdeki farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı (P>0.05) anlaşılmıştır. Gıdalarda ölçülen sertlik değeri, gıda maddesinin yapısında belli bir deformasyon sağlamak amacıyla uygulanması gereken kuvvet şeklinde tanımlanmaktadır. Birimi gram, kilogram veya Newton şeklinde verilebilir. Peynir örneklerinde sayısal değer olarak en yüksek kuvvet ihtiyacı tablo 1'e bakıldığında sadece ısıtılarak elde edilen peynirlerde gözlemlenmiştir. İstatistiki olarak bir fark olmasa dahi diğer metotlarla üretilen peynirlere göre daha sert yapılı olduğu ve ağızda parçalanabilmesi için daha fazla kuvvet gerektirdiği anlaşılmaktadır. Bunun yanı sıra analizi yapılan tüm peynir örneklerinin sıkı ve sert yapılı olduğu yorumu yapılabilir. Gıdalarda ölçülen elastikiyet değeri, gıda maddesinin üzerindeki deforme edici kuvvet ortadan kaldırıldıktan sonra gıdanın ilk haline dönme hızı şeklinde tanımlanabilir. Birimi saniyedir. Daha yüksek elastikiyet skoruna sahip örneklerin daha az elastik

olduğu yorumu yapılabilir. Peynir örneklerinde sayısal değer olarak en yüksek elastikiyet tablo 1'deki verilere bakıldığında 40°C'ye kadar ısıtılarak üretilmiş peynirde gözlemlenmiştir. İstatistiki olarak bir fark olmasa dahi, pastörizasyon veya kaynatma işlemi uygulanmayan süttten üretilen keçi peynirinin daha az elastik olduğu söylenebilir. Gıdalarda ölçülen çiğnenebilirlik değeri, katı özellikteki bir gıda maddesinin yutmaya hazır hale gelene kadar parçalanması için gerekli enerji olarak tanımlanmaktadır. Bu değer sertlik, yapışkanlık ve elastikiyet değerlerinin çarpımı ile bulunur. Birimi gram/saniye olarak verilir. Peynir örneklerinde sayısal değer olarak en yüksek çiğnenebilirlik tablo 1'e bakıldığında sadece 40°'ye ısıtılarak üretilen peynirlerde gözlemlenmiştir. İstatistiki olarak bir fark olmasa dahi, pastörizasyon veya kaynatma işlemi uygulanmayan süttten üretilen keçi peynirinin daha zor çiğnenebilir olduğu söylenebilir.



Elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ise şekil a. ısıtma uygulanan ve şekil d. Kaynatma işlemi uygulanmış süttlerden üretilen peynir örneklerinde peynir yapısını oluşturan partiküller arası boşlukların fazla olduğu, pastörizasyon sıcaklığı arttıkça yapının daha homojen hale gelmeye başladığı anlaşılmıştır. Kaynatma ile oluşan aşırı denatürasyonun ve su kaybının da yine yapının emülsiyon özelliklerini etkileyerek partiküller arası boşlukları arttırdığı gözlenmiştir. Bu görüntülerden şekil b ve şekil c'de ki gibi pastörizasyon işlemi uygulanan sütle üretilen peynirlerin uzun süreli depolamada daha stabil yapısal özellikler göstereceği, diğer örneklerin ise su kaybı, kuruma, ufalanma gibi kaliteyi olumsuz etkileyebilecek etkilere maruz kalabileceği düşünülebilir.

Kuru madde içerikleri yönünden sayısal olarak en yüksek değer kaynatılmış süttten üretilen peynirlerde bulunmuştur. Bu durum kaynatma olayı sırasında oluşan su kaybının doğal ve beklenen bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Ancak peynirler arasında kuru madde ve kül miktarları açısından istatistiki bir fark gözlemlenmemiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Peynirler arasında tekstür, kuru madde, kül içeriği yönünden istatistiki bir farklılık tespit edilmemiştir. Pastörizasyon işlemi ile birlikte daha homojen yapılı peynirler üretildiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin pastörizasyon sırasında süttte bulunan proteinlerin istenen düzeyde denatürasyona uğraması ve yapıda bulunan yağ ve suyu dayanıklılığı yüksek bir emülsiyon yapısına ulaştırması şeklinde

yorumlanabilir. İnsan sağlığı açısından ısıl işlem uygulanan sütten üretilen peynirlerdeki mikroorganizma sayısında önemli bir azalma olduğu bilinmektedir. Yapılan tekstür analizi sonucunda ve önceden yapılmış çalışmalar göz önüne alındığında pastörizasyonun peynirin yapısal ve duyuusal özellikler üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, yapısal olarak önemli bir fark gözlenmemesi yanında mikrobiyolojik riskler göz önüne alındığında peynire işlenecek sütün pastörize edilerek kullanılmasının daha doğru bir yol olacağı açıktır.

#### **KAYNAKLAR**

1. Ocak, S. ve O. Güney. 2008. Keçi sütü ürünleri, insan sağlığı açısından önemi ve pazarlama olanakları, Hasad Hayvancılık Dergisi, 278:22-25.
2. Coşkun, H. ve E. ndl. 2004. Keçi sütü ve insan beslenmesindeki nemi, Gıda Dergisi, 29(6): 411-418.
3. Hayaloğlu, A. A., Güven, M., Fox, P. F., Hannon, J. A. and McSweeney P.L.H., 2004. Proteolysis in Turkish Whitebrined cheese made with defined strains of Lactococcus. Int. Dairy J., 14, 599-610.
4. Hayaloğlu, A. A., Güven, M., Fox, P. F., and McSweeney P.L.H., 2005. Influence of starters on chemical, biochemical and sensory changes in Turkish White-Brined cheese. J. Dairy Sci., 88, 3460-3467.
5. Dağdemir, E. 2006. Salamura Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak Kullanılabilme İmkanları. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum, 190s.
6. Atasoy AF, Yetişmeyen A, Trkoğlu H, zer B. 2008. Effects of heat treatment and starter culture on the properties of traditional Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) produced from bovine milk. Food Control, 19: 278-285.
7. Pandey PK, Ramaswamy HS, St-Gelais D. 2003. Evaluation of pH change kinetics during various stages of Cheddar cheese-making from raw, pasteurized, microfiltered and high-pressure-treated milk. Lebensm-Wiss Technol, 36: 497-506.
8. nc M. 2004. A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi. Cilt-I. Meta Basım Matbaacılık, İzmir, Türkiye, 544s.

## Memory Enhancing and Neuroprotective Effects of *Hypericum perforatum* L. Extracts on Cholinesterase and Tyrosinase Enzymes

Sevgi Gezici<sup>a,\*</sup>, Nazim Sekeroglu<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Literature;  
Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University, 79000 Kilis, Turkey,  
E-mail: [drsevgigezici@gmail.com](mailto:drsevgigezici@gmail.com), [sevgigezici@kilis.edu.tr](mailto:sevgigezici@kilis.edu.tr)

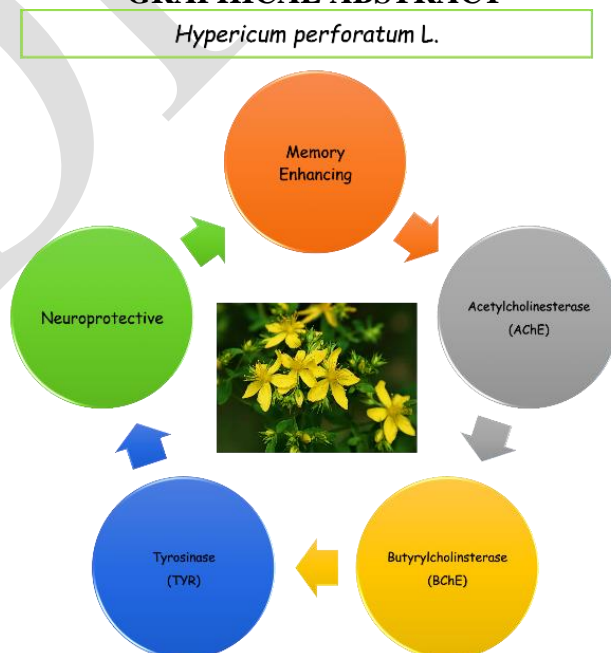
<sup>b</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture;  
Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University, 79000 Kilis, Turkey,  
E-mail: [nsekeroglu@gmail.com](mailto:nsekeroglu@gmail.com), [sekeroglu@kilis.edu.tr](mailto:sekeroglu@kilis.edu.tr)

### Abstract

*Hypericum perforatum* L., widely known as ‘St John’s wort’, is a worldwide medicinal plant that has been mainly used for its antidepressant properties in traditional and conventional medicine. Considering its wide range of bioactive components, *H. perforatum* L. is of high importance for detailed analyzes. Potential antioxidant capacities and DNA protective effects of extracts obtained from flower, stem and leaf parts of *H. perforatum* L. were analyzed in our previous research. In our further research, hypericin was analyzed in terms of its antiproliferative, apoptogenic and cellular DNA fragmentation activities against various human cancer cells. As part of our ongoing projects, leaf and flower parts of *H. perforatum* L. were extracted sequentially with different solvents, and analyzed with regards to their enzyme inhibition potentials against acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and tyrosinase (TYR) enzymes using spectrophotometric microtiter assays in the presented research. According to the results obtained from this research, the methanol extract possessed of higher inhibition on cholinesterase with the values ranged from 71.04±0.86 to 85.06±1.26%, and lower inhibition on tyrosinase enzymes, compared to the water extract. Moreover, the methanol extract from flower exerted the highest AChE and BChE inhibition (85.06±1.26 and 78.82±2.04, respectively), whilst the water extract from flower showed the highest inhibition towards TYR with the values of 65.92±0.38% at the 400 µg mL<sup>-1</sup> concentration. Overall, our results revealed that different plant parts of *H. perforatum* L. has been shown to have excellent enzyme inhibition potentials on cholinesterase enzymes and tyrosinase enzyme. Consequently, *H. perforatum* L. could be considered as a good source for treatment of neurodegenerative disorders and diseases. These insights pave the way to further investigations aimed to find natural neuroprotective and memory enhancing agents in preventing of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Cholinesterase; enzyme inhibitory; *Hypericum perforatum* L.; memory enhancing; neuroprotection; tyrosinase

### GRAPHICAL ABSTRACT





## 1. INTRODUCTION

The formation of Reactive Oxygen Species (ROS), such as superoxide ion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical (OH) and Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), have often been reported to induce DNA damage, protein carboxylation, and lipid peroxidation, causing a variety of chronic health disturbances and diseases, including cancer, ageing, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and cardiovascular diseases. Recent research indicates that several herbal plants can offer alternative sources of dietary ingredients to promote human health and might open promising opportunities for the treatment of a wide range of troublesome diseases and infections (Sahoo et al., 2018; Sun et al., 2016). Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), prion diseases, etc. are of common neurodegenerative diseases, leading cause of direct and indirect health issues. Additionally, these diseases cause of enormous disability in the elderly people around the world. Although, there are so many methods for combatting neurodegenerative diseases and disorders, they cannot always provide effective treatments and mediations. Hence, an extensive research on developing new treatment strategies against these disorders are still needed to cure nowadays. Since ancient times, natural products (NPs), originated from natural sources such as plants, have been used for the cure and treatment of many diseases in Anatolian folk medicine 'herbal therapies' (Gezici and Sekeroglu, 2019a; Awasthi et al., 2016; Godyń, et al, 2016).

*Hypericum perforatum* L. (belonging Clusiaceae; Hypericaceae family), commonly known as 'St John's wort', is a very popular medicinal plants around the world. Even though it has widely consumed as herbal tea formulation among the people; tablets, tinctures, topical preparations, oil macerations are of the other formulations. In traditional folk medicine, it has been extensively used for excitability, neuralgia, menopausal neurosis, anxiety, and depression for the centuries, due to its antidepressant properties (Ng et al., 2017; Oliveira et al., 2016; Barnes et al., 2001). Potential antioxidant capacities and DNA protective potentials, along with polyphenolic contents of extracts from flower, stem and leaf parts of *H. perforatum* L. were analyzed in our previous study (Sekeroglu et al., 2017). In our another previous work, hypericin that is the main bioactive component of *H. perforatum* L. analyzed its antiproliferative, apoptogenic and cellular DNA fragmentation activities against various human cancer cells (Gezici, 2018).

Up to now, we have analyzed various of medicinal plants using *in vitro* antioxidant, anticancer, antiproliferative, anticholinesterase, etc. experiments, which aimed to contribute to the finding of new herbal products for prevention and treatment of cancer and neurodegenerative diseases (Gezici, 2019; Gezici and Sekeroglu, 2019a; Gezici and Sekeroglu, 2019b; Shida et al., 2019; Sekeroglu et al., 2018; Gezici, 2018; Senol et al., 2018; Gundogdu et al., 2018; Karik et al., 2018; Belkhodja et al., 2017; Gezici et al., 2017; Sekeroglu et al., 2017; Akgunlu et al., 2016; Orhan et al., 2013; Sekeroglu et al., 2012; Orhan et al., 2012, etc.). Considering our ongoing research on discovering anticancer and neuroprotective agents obtained from medicinal plants and plant-derived natural products, the current study was undertaken to screen neuroprotective potentials of the extracts of aerial parts of *H. perforatum* on AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase), TYR (tyrosinase) enzymes.

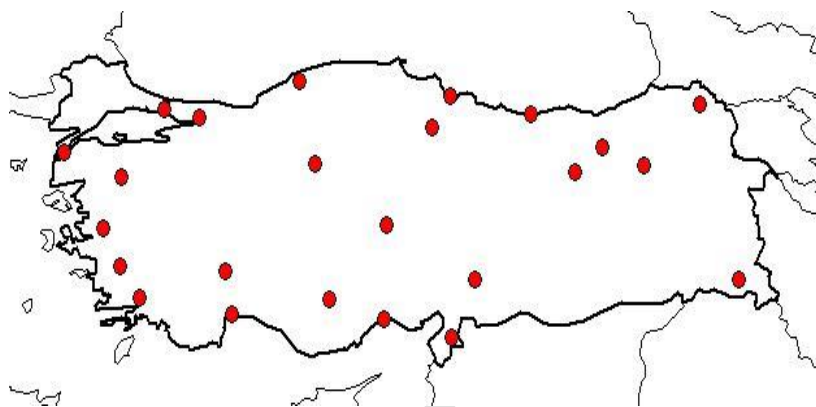
## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Collection of Plant Material

The plant was collected in the blooming season from Kilis, Turkey. After authentication, the voucher specimen was preserved in the Herbarium of Department of Biology, Kilis 7 Aralık University, Turkey. Taxonomic classification of the plant was given in the Table 1, along with geographical distribution of the plant over Turkey.

**Table 1.** Taxonomic classification and distribution of *H. perforatum* L. over Turkey

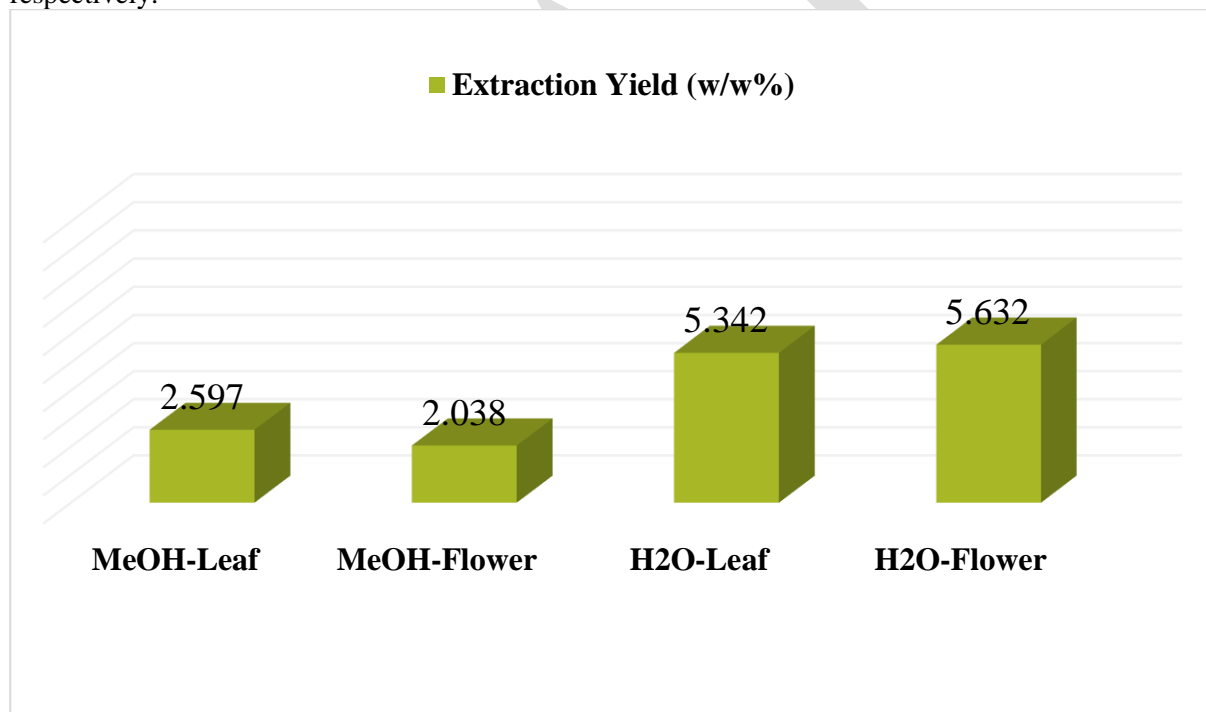
**Kingdom:** *Plantae*  
**Subkingdom:** *Tracheobionta*  
**Division:** *Magnoliophyta*  
**Class:** *Magnoliopsida*  
**Subclass:** *Dilleniidae*  
**Order:** *Theales*  
**Family:** *Clusiaceae*  
**Genus:** *Hypericum*  
**Species:** *perforatum* L.



## 2.2. Preparation of Crude Extract

Air dried and powdered samples (40 g) of the aerial parts of *H. perforatum* L. were individually extracted with solvents (methanol-MeOH, and distilled water-H<sub>2</sub>O) used maceration method, as described in our previous research (Gezici and Sekeroglu, 2019b). After maceration period, the samples were filtered and methanol were evaporated under vacuum using a rotary evaporator. Then the extracts were preserved at 4°C until further analysis.

The extract yields (w/w%) were shown in the Figure 1. Extraction yields of the methanol and water extracts of the leaves and flowers from the plant were determined as 2.597%, 2.038%, 5.342% and 5.632% (w/w), respectively.



**Fig. 1.** Extraction yield (w/w) of *H. perforatum* L.

## 2.3. Enzyme Inhibition Assays

Neuroprotective activities of the extracts were evaluated against AChE (acetylcholinesterase), BChE (butyrylcholinesterase), and TYR (tyrosinase) in the current study. For the enzyme inhibition assays, the extracts were dissolved in DMSO at different concentrations, ranging from 100 µg mL<sup>-1</sup> to 400 µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.3.1. AChE and BChE Inhibitory Activity

AChE and BChE inhibitory activity of the samples was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (1961). Electric eel AChE (EC 3.1.1.Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1. Sigma, St. Louis, 7 MO, USA) were used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as substrates of the reaction. 5,5'-

Dithio- bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All reagents, conditions and calculations were same as described in our previous publication (Senol et al., 2018; Gezici and Sekeroglu, 2019b), and the final concentration of the tested samples was adjusted to 400 µg mL<sup>-1</sup>. Galanthamine hydrobromide (Sigma, St. Louis, MO, USA) was employed as the reference anti-cholinesterase, and the final concentration of the reference was adjusted to 100 µg mL<sup>-1</sup>.

### 2.3.2. TYR Inhibitory Activity

The modified dopachrome method with *L*-DOPA as substrate was used for determination the inhibition of tyrosinase (EC 1.14.1.8.1, 30 U, mushroom tyrosinase, Sigma) (Sekeroglu et al., 2012).  $\alpha$ -Kojic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as the reference, and the final concentration of the tested samples and reference was adjusted to 400 µg mL<sup>-1</sup> and 100 µg mL<sup>-1</sup>, respectively.

### 2.4. Data Analysis

The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software. P value of <0.05 was considered to be statistically significant, p <0.01 and p <0.001 were considered to be very significant. The experiments were done in triplicate, and the results were taken from three independent experiments. The percentage of enzyme inhibition was calculated as following equation;

$$\text{Percent of enzyme inhibition (\%)} = [(Ab_{S_{\text{control}}} - Ab_{S_{\text{sample}}}) / Ab_{S_{\text{control}}} \times 100]$$

## 3. RESULTS

The aerial parts and oils of *H. perforatum* L. were extracted with MeOH and dH<sub>2</sub>O solvents, and subjected to enzyme inhibitory assays through acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), which are closely related to Alzheimer's disease along with tyrosinase (TYR), which are linked to Parkinson's disease using ELISA microplate reader at 50, 100, 200 and 400 µg mL<sup>-1</sup> concentrations.

**Table 2.** Neuroprotective potentials of the samples against AChE, BChE, and TYR at 400 µg mL<sup>-1</sup>

Sample	Solvent	Acetylcholinesterase (AChE) (Inhibition % ± SD)	Butyrylcholinesterase (BChE) (Inhibition % ± SD)	Tyrosinase (TYR) (Inhibition % ± SD)
Leaf	MeOH	82.64 ± 1.08*	71.04 ± 0.86*	47.18 ± 2.64**
	H <sub>2</sub> O	70.01 ± 0.18**	68.72 ± 1.64***	52.74 ± 1.06***
Flower	MeOH	85.06 ± 1.26***	78.82 ± 2.04***	57.48 ± 0.15**
	H <sub>2</sub> O	76.62 ± 0.56***	73.06 ± 1.03**	65.92 ± 0.38***
Galantamine <sup>a</sup> (100µg mL <sup>-1</sup> )		90.26 ± 0.14	82.04 ± 0.08	-----
$\alpha$ -Kojic acid <sup>b</sup> (100µg mL <sup>-1</sup> )		-----	-----	72.10 ± 0.16

<sup>a</sup> Galanthamine; commercial standard for AChE and BChE inhibition.

<sup>b</sup>  $\alpha$ -Kojic acid; commercial standard for TYR inhibition.

\*p value of < 0.05; \*\*p value of < 0.01; \*\*\*p value of < 0.001

As given in Table 2, the methanol extract exerted higher inhibition on cholinesterase and lower inhibition on tyrosinase enzymes, compared to the water extract. However, the greatest enzyme inhibition on AChE and BChE was caused by the methanol extract from flower (85.06 ± 1.26 and 78.82 ± 2.04, respectively), which is closely followed by leaf extract (82.64 ± 1.08 and 71.04 ± 0.86%, respectively), at the higher concentration. Among the plant parts of the plant, the flower extracts were found to have higher enzyme inhibitions against the tested enzymes, compared to that of leaf extracts. The methanol extract from flower displayed the highest AChE and BChE inhibition (85.06 ± 1.26 and 78.82 ± 2.04, respectively), whilst the water extract from flower showed the highest inhibition towards TYR (65.92 ± 0.38%) (Table 2).

In general, our results we obtained from this research revealed that different plant parts of *H. perforatum* L. has been shown to have excellent enzyme inhibition potentials on cholinesterase enzymes and tyrosinase enzyme.

#### 4. CONCLUSION

In conclusion, the leaf and flower extracts of *H. perforatum* L. exerted remarkable enzyme inhibition potentials on the tested enzymes, even at the lowest concentrations. In the light of the findings of our results, it is exceedingly important to indicate that both the extracts and oils of the plant with excellent neuroprotective properties. That plant is likely to be a natural neuroprotective agent to manage of neurodegenerative disorders and diseases, despite further studies should be performed to ascertain its safety in clinical usage.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University for technical support.

#### References

- [1] Akgunlu, S., Sekeroglu, N., Koca-Caliskan, U., Ozkutlu, F., Ozcelik, B., Kulak, M., Gezici, S., 2016. Research on selected wild edible vegetables: Mineral content and antimicrobial potentials. *Ann. Phytomed.* 5(2), 50-57. <https://doi.org/10.21276/ap.2016.5.2.6>.
- [2] Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. 2016. Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the neurological sciences*, 361, 256-271. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.01.008>.
- [3] Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(5), 583-600.
- [4] Belkhdja, H., Meddah, B., Gezici, S. 2017. Anti-Inflammatory Effects of Essential Oils From *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* on Experimental Models of Acute and Chronic Inflammation in Rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 180-184. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.8>.
- [5] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [6] Gezici S. 2018. Hypericin, The Bioactive Components of *Hypericum perforatum* In Cancer Treatments: Antiproliferative, Apoptogenic and Cellular DNA Fragmentation. The 4<sup>th</sup> International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-MESMAP-4. April 18-22, 2018, Antalya, Turkey. Abstract Book, p: 75. (Oral Presentation).
- [7] Gezici, S. 2018. Promising anticancer activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. *Annals of Phytomedicine*, 7(2), 38-45. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.2.5>.
- [8] Gezici, S., 2019. Anticancer, Antiproliferative, Lysosomal and Lactate Dehydrogenase Inhibitory Effects of Fruit Extracts from Sumac (*Rhus coriaria* L.) on Human Lung Cancer Cells. *Acta Oncol Tur.* 2019; 52(1): 160-168. <https://doi.org/10.5505/aot.2019.09326>.
- [9] Gezici, S., Sekeroglu, N., 2019a. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/1871520619666181224121004>.
- [10] Gezici, S., Sekeroglu, N., 2019b. Neuroprotective potential and phytochemical composition of acorn fruits. *Ind. Crop. Prod.* 128, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.082>.
- [11] Gezici, S., Sekeroglu, N., Kijjoa, A., 2017. In vitro Anticancer Activity and Antioxidant Properties of Essential Oils from *Populus alba* L. and *Rosmarinus officinalis* L. from South Eastern Anatolia of Turkey. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51(3), 498-503. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.74>.
- [12] Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., & Malawska, B. 2016. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*, 68(1), 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.07.006>.
- [13] Gundogdu, M., Tunçtürk, M., Berk, S., Şekeroğlu, N., Gezici, S., 2018. Antioxidant Capacity and Bioactive Contents of Mulberry Species from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 52(4), 96-101. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.82>.
- [14] Karik, U., Çinar, O., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N., Gezici, S. 2018. Essential Oil Composition of Some Sage (*Salvia* spp.) Species Cultivated in İzmir (Turkey) Ecological Conditions. *Ind. J. Pharm. Educ. Res.* 52(4), 102-107. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.83>.
- [15] Ng, Q. X., Venkatanarayanan, N., & Ho, C. Y. X. 2017. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 210, 211-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2016.12.048>.

- [16] Oliveira, A. I., Pinho, C., Sarmiento, B., & Dias, A. C. 2016. Neuroprotective activity of *Hypericum perforatum* and its major components. *Frontiers in plant science*, 7, 1004. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01004>.
- [17] Orhan, I.E., Atasu, E., Senol, F.S., Ozturk, N., Demirci, B., Das, K., Sekeroglu, N., 2013. Comparative studies on Turkish and Indian *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola) samples for their enzyme inhibitory and antioxidant effects and phytochemical characterization. *Ind. Crop. Prod.* 47, 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.022>.
- [18] Orhan, I.E., Senol, F.S., Gulpinar, A.R., Sekeroglu, N., Kartal, M., Sener, B., 2012. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chem.* 130(4), 882-888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.11>.
- [19] Sahoo, A.K., Dandapat, J., Dash, U.C., Kanhar, S. 2018. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J. Ethnopharmacol.* 215, 42-73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.015>.
- [20] Shida, W., Tateishi, H., Fujita, M., Koga R., Radwan, M.O., Ciftci, H.I., Otsuka, M., Husham AL-Saadi, D., Watanabe, M., Gezici, S., Wada, M., Sekeroglu, N., Watanabe, T. 2019. Anticancer activity of extract from twigs of Caucasian beech in Turkey. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5), Cappadocia-Turkey, Oral presentation p: 29. [www.ispbs.org](http://www.ispbs.org).
- [21] Sekeroglu, N., Karaoglan, M., Gezici, S., Kulak, M., Ozkutlu, F., Kacar, O., Gul, F., 2018. Variation in the composition of the essential oils, hypericin and mineral elements in aerial parts, stem and flower of *Hypericum capitatum* (CHOISY) growing in Turkey with oxidative DNA damage protective activity. *J. Pharm. Res.* 17, 67-77. <https://doi.org/10.18579/jperkc/2018/17/2/123613>.
- [22] Sekeroglu, N., Senol, F.S., Orhan, I.E., Gulpinar, A.R., Kartal, M., Sener, B., 2012. In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Res. Int.* 45, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.0088>.
- [23] Sekeroglu, N., Urlu, E., Kulak, M., Gezici, S., Dang, R., 2017. Variation in Total Polyphenolic Contents, DNA Protective Potential and Antioxidant Capacity from Aqueous and Ethanol Extracts in Different Plant Parts of *Hypericum perforatum* L. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51, 1-7. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.2s.43>.
- [24] Senol, F. S., Sekeroglu, N., Gezici, S., Kilic, E., Orhan, İ. E. 2018. Neuroprotective potential of the fruit (acorn) from *Quercus coccifera* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(2), 82-87. <https://doi.org/10.3906/tar-1711-18>.
- [25] Sun, J., Ren, X., Qi, W., Yuan, D., Simpkins, J.W. 2016. Geissoschizine methyl ether protects oxidative stress-mediated cytotoxicity in neurons through the 'Neuronal Warburg Effect'. *J. Ethnopharmacol.* 187, 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.034>.

## Poli( $\epsilon$ -CL-co-BMA) Polimerinin Termal Bozunma Kinetiğinin Analizi

Güzin Pıhtılı<sup>1\*</sup>, Fatih Biryant<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Munzur University, Pertek Sakine Genc Vocational, School Department of Food Processing, Tunceli, Turkey

<sup>2</sup> Fırat University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Elazığ, Turkey

\*Güzin Pıhtılı; e-mail: gpihtili@munzur.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, poli( $\epsilon$ -CL-co-BMA) kopolimerinin termal bozunması incelendi. Bu amaçla belirli miktarlarda azot atmosferinde ısıtılan polimer örnekleri 5, 10, 20 ve 30°C/dk ısıtma hızlarında oda sıcaklığından 500°C'ye kadar ölçülerek, TGA eğrilerinden, polimerin bozunma sıcaklıkları belirlendi. Farklı ısıtma hızlarındaki bozunma eğrilerinden yararlanarak, Flynn-Wall-Ozawa metoduna göre polimerin bozunmasına yönelik aktivasyon enerjileri belirlendi. Bu metoda göre aktivasyon enerjisinin tayininde %2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 42, 45, 50, 55, %60 ağırlık kaybı değerlerinden yararlanıldı. Farklı dönüşümlerde tespit edilen 1000/T sıcaklık değerlerine karşı log $\beta$  değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen bir seri doğrunun eğiminden, her bir dönüşüm yüzdesine karşılık gelen aktivasyon enerji değeri ayrı ayrı hesaplandı. Bu değerler arasında polimer için ortalama aktivasyon enerjisi 168.97 kJ/mol olarak hesaplandı. % 8 dönüşüme karşılık gelen aktivasyon enerji değeri (168,69kJ/mol), ortalama aktivasyon enerjisi değerine en yakın değere karşılık olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** inorganik madde katkılı polimer, Termal bozunma, termogravimetrik analiz , Flynn–Wall–Ozawa

### Kinetic Analysis of Thermal Decomposition of Poly ( $\epsilon$ -CL-co-BMA)

#### Abstract

In this study, the thermal degradation of poly ( $\epsilon$ -CL-co-BMA) copolymer was investigated. Thermal decomposition temperatures were investigated by thermogravimetric analysis (TGA) at different heating rates. TGA curves showed that the thermal decomposition occurred in one stage. For this purpose, the comp-type polymers heating rate of 5, 10, 20 and 30 ° C / min from the room temperature was heated to 500 ° C under nitrogen atmosphere. The apparent activation energies of thermal decomposition for copolymer, as determined by Flynn–Wall–Ozawa methods. Because of this method, it is possible to determine the activation energy only in the 3% to 20% conversion, %2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 30, 35, 40, 42, 45, 50, 55, %60, weight loss values were used. The activation energy can also be determined using the method of Flynn–Wall–Ozawa from a linear fitting of log  $\beta$  versus 1000/T at different conversions. Among these values, the average activation energy for the polymer was calculated to be 168.97 kJ / mol. The activation energy value corresponding to 8% conversion (168.69kJ / mol) was found to correspond to the value closest to the average activation energy value.

**Keywords:** inorganic additive polymer, thermal decomposition, thermogravimetric analysis, Flynn -Wall - Ozawa

#### GİRİŞ

Polimerlerin termal bozunmalarının incelenmesi uzun yıllardır termal analiz çalışmalarının merkezinde olmuştur (Jeffery ve ark., 2001), (S. L. Madorsky, 1964), (Reich ve Stivala, 1971), Schnabel, 1981), (Kelen,1983), (Grassie ve Scott, 1985), (Flynn ve ark., 1989),( Hamid ve ark., 1992), (Zaikov, 1995). İnert ve oksidatif atmosfer altındaki degradasyon ilgi çekmektedir. Termogravimetrik analiz (TGA), polimer bozulmalarının kinetiğini incelemek için yaygın bir yöntemdir (Jeffery ve ark.2001), (Caleb ve ark., 2017). Termogravimetrik analiz (TGA) yönteminde, sıcaklık artışına karşılık örneğin kütledeki değişim ölçülür (Ayaz, 2011). Homo polimerlerin veya blok kopolimerlerin termal bozunmasında, depolimerizasyon, ana bozulma örneklerinden biridir (Kurt, 2009), (Mcneill ve ark., 1996), (Guyot, 1986). Depolimerizasyon sırasında, ayırt edici özellik, yüksek sıcaklıklarda artıkların bulunmaması, yani bütün bozucu ürünlerin, örneğin monomerlerin, dimerlerin, zincir parçalarının esasen tekrar eden birim ile aynı bileşime sahip

olmasıdır (Kurt, 2009), (Mcneill ve ark., 1995), (Demirelli ve ark., 2005). Çoğu zaman, polimerin moleküler ağırlığı, degradasyon ilerlediği sürece ve sık sık azalır. Sıcaklık kademeli olarak yükseldiğinden, yalnızca bir bozunma aşaması vardır (Zulfiqar ve ark., 1996)]. Kinetik ölçümü ve Arrhenius parametreleri ile ilişkili ölçümleri polimer meteryallerinin karakterizasyonunun gerekli temel unsurlarındandır. Termal Analiz ve Kalorimetri (ICTAC), kinetik parametrelerin termogravimetri, farklı tarama kalorimetrisi ve farklı termal analiz ile elde edilen verilerden güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi için rehberlik eder (Venkatesh ve ark., 2013). Flynn-Wall-Ozawa tarafından açıklanan izotermal olmayan izo-dönüşümlü yöntemler, polimerik malzemelerin kinetiğini incelemek için sıklıkla kullanılır (Sanja ve ark., 2010). Bu yöntem, integral izo-dönüşümlü yöntemden türetilir (Aboulkas ve El Harfi, 2008). Flynn – Wall – Ozawa yöntemi, aktivasyon enerjisinin zamana göre değişebileceği birçok reaksiyonun meydana geldiği sistemlerde kullanım için potansiyel olarak uygundur (Venkatesh ve ark., 2013). We have investigated the decomposition kinetics of poly ( $\epsilon$ -CL-co-BMA) using TG technique under nitrogen atmosphere. Isoconversional methods were used for the evaluation of kinetic parameters from the kinetic data of different heating temperatures.

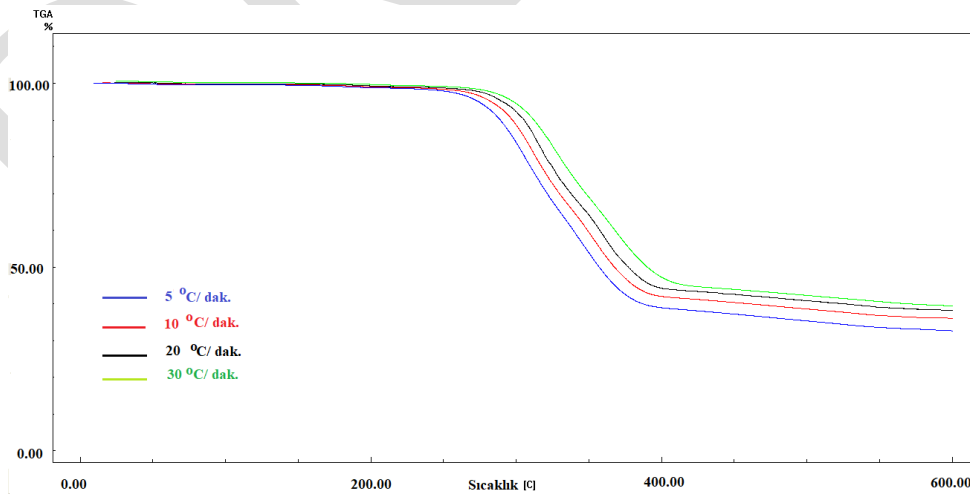
## MATERYAL VE METOT

### 1. Atom Transfer Metodu ile Kopolimer Sentezi

P( $\epsilon$ -CL-co-BMA) kopolimeri ATRP metodu ile hazırlanmıştır. Kopolimerizasyonlarda makrobaşılatıcı : CuBr : bipyridin : monomer : oranları molce 1 : 1 : 2 : 100 olarak alındı. Polimerizasyon tüplerine ilk önce katalist sistem oluşturmak için CuBr ve 2,2'-bipyridin konuldu. Karışım argon gazından geçirildi. Viskoz haldeki polimerler diklormetanda çözülerek, 2-3 damla seyreltik HCl çözeltisi içeren etil alkolde çöktürüldü. Saflaştırma amacıyla, aynı şekilde iki kez tekrarlanan çöktürme işlemiyle elde edilen kopolimerler, vakum altında 40 °C'de 24 saat kurutuldu.

### 2. Termal bozunma kinetiğine dayalı termogravimetrik ölçümler

Termogravimetrik analiz (TGA) yönteminde, sıcaklık artışına karşılık örneğin kütlesindeki değişim ölçülür. Sonuçta bir sıcaklık-kütle eğrisi veya sıcaklık - % kütle kaybı eğrisi elde edilir. Termogravimetrik analizde madde ısıtılırken örneğin kütlesi de bir mikro terazi ile sürekli ölçülür. Bu işlem her hangi bir özel atmosfer (azot, argon vb.) koşulunda da yapılabilir. Termal bozunmaları incelemek amacı ile Shimadzu TA-50 termobalans sistemi kullanıldı. Kopolimerlerin termal bozunması ve aktivasyon enerjileri TGA eğrilerinden belirlendi. Bu amaçla belirli miktarlarda azot atmosferinde ısıtılan polimer örnekleri 5, 10, 20 ve 30°C/dk ısıtma hızlarında oda sıcaklığından 500°C'ye kadar ölçüldü. **Şekil 1**'de farklı ısıtma hızlarında yapılmış TGA ölçümleri gösterilmiştir. **Tablo 1**'de ise bu ölçümlerden elde edilen veriler özetlenmiştir.



**Şekil 1.** P( $\epsilon$ -CL-co-BMA)'nın farklı ısıtma hızlarına bağlı TGA eğrileri

**Tablo 1.** P(MMA-comb-BMA%23)'ün farklı ısıtma hızlarına bağlı TGA verileri

Isıtma Hızı(°C/dk)	T <sub>baş</sub> (°C)	T <sub>son</sub> (°C)	T%50(°C)	500°C'de % atk
5	260	380	360	32
10	270	395	373	38
20	282	400	382	42
30	298	420	385	44

### 3. Flynn-Wall-Ozawa Kinetik Metodu ile E<sub>a</sub> Belirlenmesi

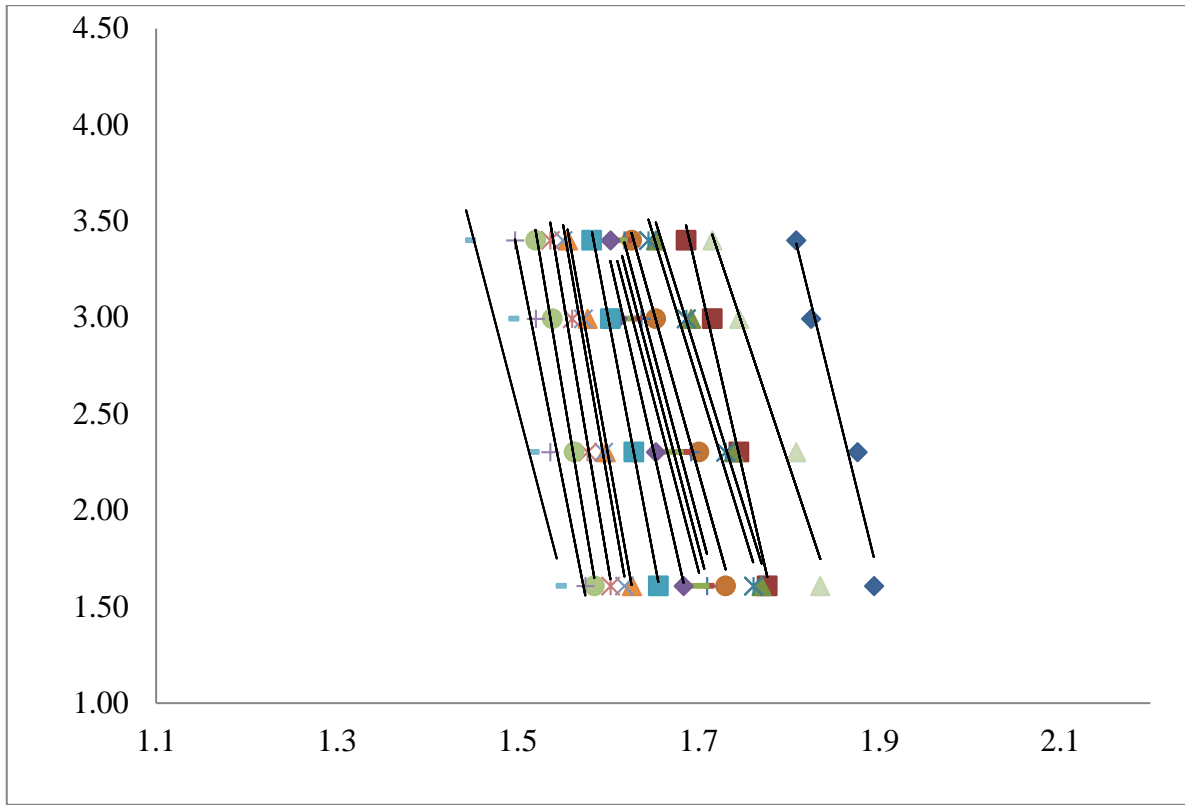
Termogravimetrik bulgulardan yola çıkarak aktivasyon enerjisi ve eksponansiyel faktör gibi önemli kabul edilebilecek bilgileri kabul etmek için pek çok analiz metodu önerilmiştir. Tüm kinetik bilgiler farklı metotlar kullanılarak deneylerden elde edilebilir. Araştırmacıların çoğu, termal bozunma sırasında bir polimerin kinetik çalışması için izotermal olmayan yöntemler kullanmıştır. Bu çalışmada kopolimerinin termal bozunma kinetiğini değerlendirmek için Flynn-Wall-Ozawa (FWO) kinetik metodu kullanıldı. Bu metod da reaksiyon mertebelerini bilmeye gerek yoktur (Ayaz, 2001). Aktivasyon enerjisini belirlemeye yarayan integral metotlarından biridir (Ayhan, 2017), (Flynn and Wall, 2003), (Ozawa, 1986). Verilen dönüşüm değerlerinden aktivasyon enerjilerinin belirlenmesinde kullanılır (Zulfiqar ve ark., 1996). İzotermal olmayan ölçümlerde, bozunma mekanizması bir sıcaklıktan diğerine uyar. Akış hızı ve taşıyıcı gaz, numunelerin katı veya toz halleri gibi çeşitli değişkenler bu kinetik parametreleri doğrudan etkileyen koşullardır. Bu yöntemin en büyük avantajı, Arrhenius tipi sıcaklık bağımlılığı dışındaki kinetik denklemin şekli ile ilgili herhangi bir varsayım gerektirmemesidir (Venkatesh ve ark., 2013). Flynn-Wall-Ozawa metodu Doyle'un yaklaşımını kullanarak integral izokonversiyonel methodundan türetilmiştir. Çeşitli ısıtma oranlarında kaydedilen termogramlarla elde edilen  $1/T \ln \beta$  'ye karşı grafiğe geçirilir. Flynn-Wall-Ozawa metodunda aşağıda verilen eşitlik kullanılır: (Jan ve ark., 2016)

$$\ln \beta = \log \frac{\Delta E}{g(\alpha).R} - 2,35 - \frac{0,457E}{RT} \quad (1)$$

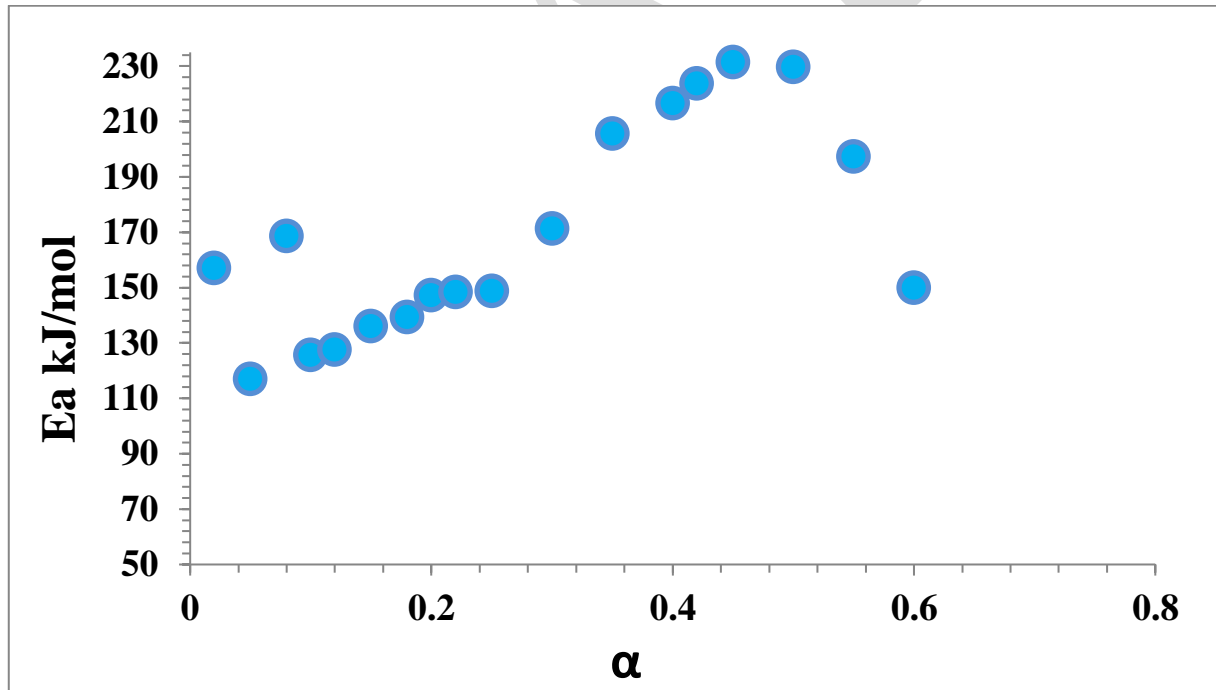
Burada “ $\beta$ ” ısıtma hızıdır (°C/dak). Bu denkleme göre aktivasyon enerjisi  $\log \beta - (1000/T)$  grafiğindeki eğimden hesaplanır. Eğim,  $(-0.457 E/R)$  değerine eşittir. Bu metotta  $\log \beta$  ve  $(1000/T)$  arasında bir lineerlik mevcut olduğundan bütün yüzde dönüşümler için eğriler birbirine paraleldir.

Kopolimerinin termal bozunmasını incelemek amacıyla, TGA eğrilerinden, polimerin bozunma sıcaklıkları belirlendi. Bu amaçla belirli miktarlarda azot atmosferinde ısıtılan polimer örnekleri 5, 10, 20 ve 30°C/dk ısıtma hızlarında oda sıcaklığından 500°C'ye kadar ölçüldü. Elde edilen termogramlar **Şekil 1'de** sonuçlar da **Tablo 1'de**, gösterilmiştir. Farklı ısıtma hızlarındaki bozunma eğrilerinden yararlanarak, Flynn-Wall-Ozawa metoduna göre polimerin bozunmasına yönelik aktivasyon enerjileri belirlemek amacıyla farklı ısıtma hızlarındaki TG eğrilerinden  $1000/T$  değerlerine karşılık  $\log \beta$  değerleri grafiğe geçirildi. Flynn-Wall-Ozawa eğrileri olarak tanımlanan bu eğriler karşılaştırmalı olarak **Şekil 2'de** verilmiştir. **Şekil 3'** de aktivasyon enerjisinin dönüşüme bağlı olarak elde edilen grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre maximum E<sub>a</sub>'ya 231,37 (kJ/mol) ile % 45 dönüşümde ulaşılmıştır. **Şekil 4'te** ise, Sıcaklığın dönüşüme bağlı olarak değişimini görmekteyiz. Burada sıcaklığın kontrollü artışı ile bu değerlerde bir artışın olduğu gözlemlendi.

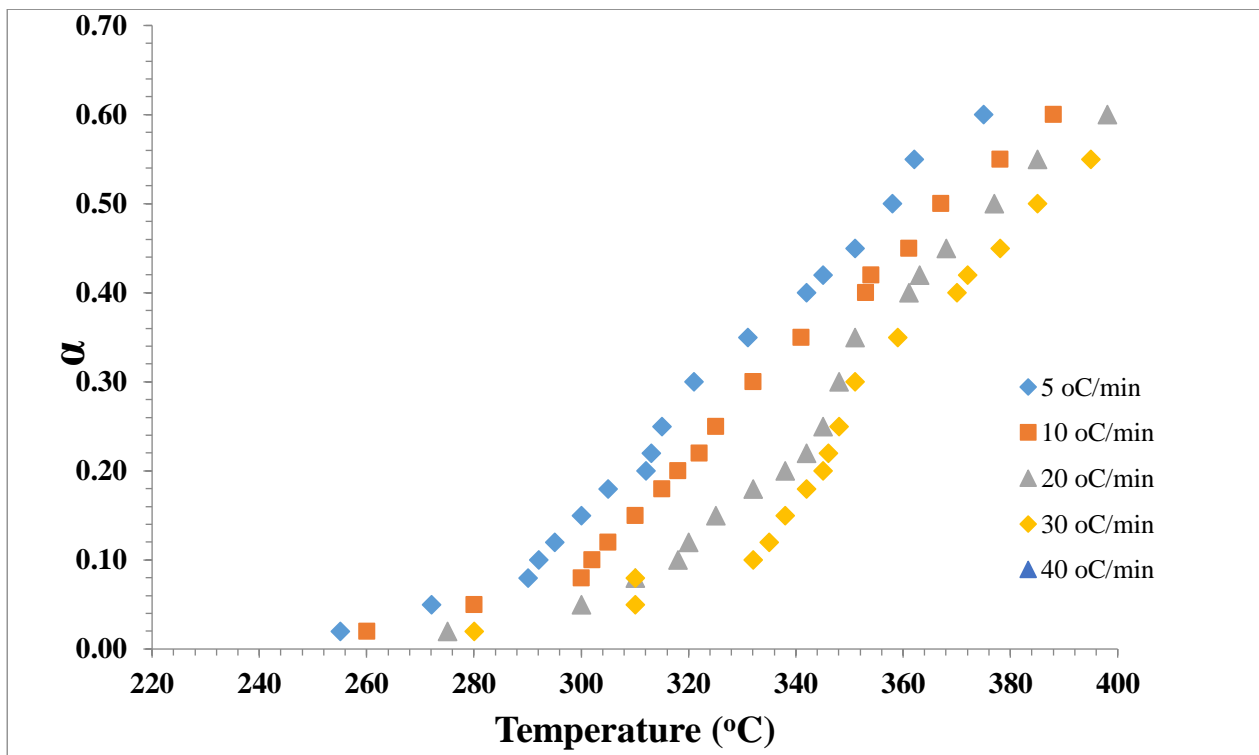




Şekil 2. P(ε-CL-co-BMA)'nın %2-60 bozunma aralığındaki Flynn-Wall-Ozawa eğrileri



Şekil 3. P(ε-CL-co-BMA)'nın  $E_a - \alpha$  grafiği



Şekil 4. P(ε-CL-co-BMA)'nın T - α grafiği grafiği

#### BULGULAR ve TARTIŞMA

Termogravimetrik analiz metodu (TGA) kullanılarak P(ε-CL-co-BMA) kopolimerinin termal davranışları ve termal degradasyon kinetiği detaylıca araştırıldı. Bu amaçla, belirli oranlarda alınan P(ε-CL-co-BMA) kopolimer örnekleri azot gazı atmosferinde 5, 10, 15 ve 20 °C/dakika gibi farklı ısıtma hızlarında oda sıcaklığından 600 °C'ye kadar ısıtıldı. P(ε-CL-co-BMA) kopolimeri için farklı ısıtma hızlarında kaydedilen TGA termogramları Şekil 1'de karşılaştırmalı olarak gösterildi. kopolimerinin 5, 10, 15 ve 20 °C/dakika ısıtma hızlarındaki başlangıç bozunma sıcaklıkları sırasıyla 260°C, 270 °C, 282 °C ve 298 °C olarak ölçülmüştür. Isıtma hızının artmasına bağlı olarak pik sıcaklıklarında bir artış gözlenmiştir. kopolimeri için farklı ısıtma hızlarında kaydedilen bozunma eğrilerinden alınan verilerden yararlanılarak referans kopolimerin termal bozunma aktivasyon enerjileri Flynn-Wall-Ozawa metoduna göre tayin edildi. Bu metodun kullanılmasının temel amacı, reaksiyon mertebesini ve bozunma mekanizmasının bilinmesine gerek duyulmaksızın aktivasyon enerjilerini belirlemeye yarayan integral bir metod olmasıdır.

Flynn-Wall-Ozawa metodu için %2, 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, ve % 25 gibi farklı dönüşüm değerlerinde ölçümler alındı. Bu dönüşümlere karşılık gelen verilere göre logβ değerlerine karşı 1000/T sıcaklık değerleri Şekil 2'de gösterildiği gibi grafiğe geçirildi. Elde edilen bir seri doğrunun eğiminden, her bir dönüşüm yüzdesine karşılık gelen aktivasyon enerji değeri ayrı ayrı hesaplandı. Bu değerler arasında P(ε-CL-co-BMA) kopolimeri için ortalama aktivasyon enerji değeri 168.97 kJ/mol olarak hesaplandı. Hesaplanan ortalama aktivasyon enerji değerine en yakın değer 168.69 kJ/mol değeri ile %8'lik bozunma yüzdesinde elde edilmiştir. Her bir dönüşüme karşılık gelen aktivasyon enerjileri **Tablo 2**'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** Farklı dönüşümlere karşılık gelen aktivasyon enerji değerleri

$\alpha$ (%)	<i>P[<math>\epsilon</math>-CL- BMA%46]</i>	
	$E_a$ (kJ/mol)	<b>R</b>
2	157,1346	0,9867
5	117,052806	0,9686
8	168,69106	0,989
10	125,70768	0,999
12	127,611586	0,999
15	136,14175	0,989
18	139,392524	0,999
20	147,149486	0,989
25	148,812286	0,999
30	171,401424	0,999
35	205,638476	0,997
40	216,637898	0,999
42	223,72974	0,996
45	231,370306	0,989
50	229,640994	0,986
55	197,29122	0,989
60	149,843222	0,999
<i>ort</i>	168.97	

## SONUÇ

P ( $\epsilon$ -CL-ko-BMA) 'nın termal davranışı, termogravimetrik analiz (TGA) ile incelenmiştir. Termal bozunma kinetiği, dört farklı (5-10-2-30 °C/dak) ısıtma hızında yapıldıktan sonra, bir dizi deneyden doğruların eğimi hesaplandı. Flynn-Wall-Ozawa metoduna göre polimerin bozunmasına yönelik aktivasyon enerjileri belirlendi. Aktivasyon enerjisini %8 dönüşüme karşılık gelen 168.97kJ / mol olarak tahmin edildi. Dönüşüm 0.60'a kadar arttırıldığında, polimere ait bozunma sıcaklıklarının da arttığı sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

Aboulkas A, El Harfi K 2008. Study of the Kinetics and Mechanisms of Thermal Decomposition of Moroccan Tarfaya Oil Shale and its Kerogen. Oil Shale, 25: 426–443.

Ayaz H 2011. Pirazabol Merkezli İki Kollu Polimetilmetakrilat'ın Hazırlanması ve Termal Davranışının İncelenmesi. Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü .

Ayhan AF, Kumarin Türevli Kopolimer Sistemlerinin Geliştirilmesi 2017. Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

- Caleb A, Michael KD, Charles KSM, Mahmood A and Clarence MO 2017. Thermogravimetric Characterization of ex situ Polymethacrylate (EDMA-co-GMA) Monoliths. *The Canadian J. Chem. E.*, 9999:1-7.
- Demirelli K, Kurt A, Coskun M 2004. Atom transfer radical polymerization of 1-phenoxy carbonyl ethyl methacrylate monomer. *Eur Polym J*, 40: 451-457.
- Flynn JH, Wall LA 2003. Initial Kinetic Parameters From Thermogravimetric Rate and Conversion Data. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, 5: 191-196.
- Flynn JH 1989. Thermal Analysis, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Wiley, New York, 690. 7
- Grassie N, Scott G 1985. *Polymer Degradation and Stabilisation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Guyot A 1986. Recent developments in the thermal degradation of polystyrene. *Polym Degrad Stab*, 15: 219.
- Hamid SH, Amin MB, Maadhah AG, Dekker EM 1992. *Handbook of Polymer Degradation*. New York.
- Jeffery DP, Sergey V, Charles AW 2001. Kinetics of the Thermal and Thermo-Oxidative Degradation of Polystyrene. Polyethylene and Poly(propylene). *Macromol. Chem. Phys.*, 202: 775-784.
- Kelen T 1983. *Polymer Degradation*. Van Nostrand, New York.
- Kurt A 20019. Thermal Decomposition Kinetics of Poly(nButMA-b-St) Diblock Copolymer Synthesized by ATRP. *Journal of Applied Polymer Science*, 114: 624-629.
- Madorsky SL 1964. *Thermal Degradation of Organic Polymers*. Interscience Publishers, New York.
- Mcneill IC, Memetea L, Ahmed S, Cole WJ 1995. The thermal degradation of the vinyl acetate-methacrylic acid copolymer and its related homopolymers III: the analysis of the pyrolysis products. *Polym Degrad Stab*, 48: 395-410.
- Mcneill IC, Ahmed S, Memetea L, Mohammed MH, Zaikov GE, Polishchuk AY 1996. Thermal degradation behaviour of some alternating copolymers. *Polym Degrad Stab*, 52;171-181.
- Nisar J, Khan MA, Iqbal M, Shah A, Khan RA, Sayed M, Mahmood T 2016. Comparative Study of Kinetics of the Thermal Decomposition of Polypropylene Using Different Methods. *Advances in Polymer Technology*, 37: 1168-1175.
- Ozawa T 1986. Applicability of Friedman Plot. *Journal of Thermal Analysis*, 31: 547-551.
- Reich L, Stivala SS 1971. *Elements of Polymer Degradation*. McGraw-Hill, New York.
- Sanja MM, Ivona FH, Muhamed S 2010. Applicability of Non-isothermal DSC and Ozawa Method for Studying Kinetics of Double Base Propellant Decomposition. *Central European Journal of Energetic Materials*, 7: 233-251.
- Schnabel W 1981. *Polymer Degradation: Principles and Practical Applications*. Macmillan, New York
- Venkatesh M, Ravi P, Surya P 2013. Tewari Isoconversional Kinetic Analysis of Decomposition of Nitroimidazoles: Friedman method vs Flynn-Wall-Ozawa Method. *J. Phys. Chem. A*, 117: 10162-10169.
- Zaikov GE 1995. *Degradation and Stabilization of Polymers: Theory and Practice*. Nova Science Publishers, Commack, New York
- Zulfiqar S, Piracha A, Masud K 1996. The thermal degradation of poly(allyl methacrylate). *Polym Degrad Stab*, 52, 89-93

## Investigation of Essential Oil Chemical Composition of *Thymus* Species (*T. longicaulis* subsp. *chaubardii*, *T. sipyleus* and *T. zygoides*) from Turkey

Züleyha Özer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Medicinal and Aromatical Plants Programme, Altinoluk Vocational School, Balıkesir University, Altinoluk, Edremit-Balıkesir, Turkey

\*Corresponding author e-mail: zuleyhaozer@balikesir.edu.tr

### Abstract

*Thymus* species are known as “kekik” in Turkish and commonly used for spice, herbal tea and medicinal plant. In this study, dried aerial parts of *Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *chaubardii* (Rchb.f.) Jalas (dağkekiği), *T. sipyleus* Boiss. (sipilkekiği) and *T. zygoides* Griseb. (bodurkekiği) species harvested from region of Balıkesir, identified the essential oil compositions by hydrodistillation and the essential oils obtained were analyzed by using GC-MS/MS. The major compounds in the essential oils of three *Thymus* species were found as follows: thymol (30.9%),  $\alpha$ -bergamotene (15.3%) and *p*-cymene (10.0%) in *T. longicaulis* subsp. *chaubardii*; carvacrol (46.7%), *p*-cymene (23.4%),  $\beta$ -E-ocimene (16.2%) in *T. sipyleus*; *p*-cymene (43.5%), thymol (40.5%) and allo-aromadendrene (4.0%) in *T. zygoides*.

**Keywords:** *Thymus*, essential oil, GC-MS/MS, hydrodistillation, chemical composition

### INTRODUCTION

Lamiaceae (Labiatae) family has 300–400 endemic species which widely distributed worldwide in particular in the Mediterranean region. The plants belong to Lamiaceae family, the third richest family in Turkey, have been used since ancient times for their flavoring qualities, and their preservative and pharmacological properties (Pereira et al., 2013).

The genus *Thymus* is one of the most important genera of the Lamiaceae. The genus *Thymus* is comprises 215 species which especially common in the Mediterranean region (Nickavar and Esbati, 2012). *Thymus* species is generally recognised and used as spice, tea or herbal medicine. In Turkey, *Thymus* is represented by 39 species with 64 taxa, 27 taxa of which are endemic (Gökbulut, 2015). Many articles have focused on chemical profiles and activities of various extracts of *Thymus* species. Previous studies have been indicated that the chemical components of essential oil of *Thymus* species and the main compounds generally were determined as mainly thymol and carvacrol (Gonçalves et al., 2010; Tepe et al., 2005; Corticchiato et al., 1998; Hazzit et al., 2009; Ozen et al., 2011; Demirci et al., 2018; Ballester-Costa et al., 2013; Azaz et al., 2004; Yaşar et al., 2016; Tzakou et al., 1998; Polat et al., 2007). Also there are some reports about biological activities of essential oils of the *Thymus* species (Tepe et al., 2005; Azaz et al., 2004; Tzakou et al., 1998; Polat et al., 2007; Ceylan and Ugur, 2015). The *Thymus* genus are the most popular plants in the World, usually used for perfumery, cosmetic, medicinal and preservation for food purposes (Hazzit et al., 2009; Ozen et al., 2011). In addition, the *Thymus* species are used in infusion form as traditional medicine, due to expectorant, antiasthmatic, bronchiolytic, antiseptic, antispasmodic, analgesic, antifungal, antimicrobial, and antioxidant properties (Gonçalves et al., 2010; Hazzit et al., 2009; Özgen et al., 2011; Ali et al., 2015).

The composition of the essential oils depends on factors such as year, climate, solar angle, and collection region; the volatile oil compositions of the species of these two sections have been re-examined. Therefore the objectives of this study are to examine chemical composition of essential oil of *Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *chaubardii* (Rchb.f.) Jalas (TL), *T. sipyleus* Boiss (TS) and *T. zygoides* Griseb (TZ).

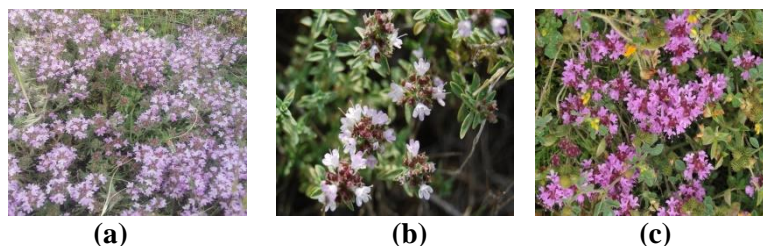


Figure 1. TL (a), TS (b) and TZ (c)

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Localities, coordinates and collector numbers of the *Thymus* species are given in Table 1. The species were identified by Doç. Dr. Selami Selvi at Balıkesir University. Voucher specimens were deposited at the Herbarium of Altınoluk Vocational School, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey.

**Table 1.** List of the *Thymus* species with locality, altitude and collection time.

Code	Collector Number	Species	Locality	Altitude (m)	Coordinates	Year
L	S V 1154	<i>Thymus longicaulis</i> subsp. <i>chaubardii</i>	Balıkesir: Karanlıkdere road edges and slopes	12 20	N 39 19 521 E 28 49 145	016
S	S V 850	<i>Thymus sipyleus</i> Boiss.	Balıkesir: Kazdağları, Edremit, rocky slopes	91 3	N 39 39 12 E 26 51 10	014
Z	S V 121	<i>Thymus zygioides</i> Griseb.	Balıkesir: Edremit, Kazdağları, Ortaoba village, rocky slopes	35 5	N 39 37 58 E 27 00 00	013

### Essential oil

The aerial parts of *Thymus* species (100 g of each) which were air-dried in shade, were chopped into small pieces and subjected to hydrodistillation with water for 3 h, using a Clevenger-type apparatus to produce the essential oil.

### Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) conditions

GC-MS was conducted on Thermo Electron Trace 2000 GC model gas chromatography and Thermo Scientific TSQ GC-MS/MS. A Phenomenex DB5 fused silica column (30 m x 0.32 mm, with 0.25 µm film thickness) was used with helium as a carrier gas at 1 mL/min flow rate (20 psi). The GC oven temperature was kept at 60°C for 10 min and programmed to 220°C at a rate of 4°C/min increment and then kept constant at 220°C for 15 min. The split ratio was adjusted to 1:20, the injection volume was 0.1 mL, and EI/MS was recorded at 70 eV ionization energy. Mass range was m/z 35-500 amu. A homologous series of n-alkanes was used as reference in the calculation of Kovats Indices (KIs).

## RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil of aerial parts of *T. longicaulis* subsp. *chaubardii*, *T. sipyleus* Boiss. and *T. zygioides* Griseb. were analyzed by using GC-MS/MS. The components were classified into 5 classes based on their chemical structures: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, and phenolic compounds. Essential oil compositions and yield ratio of the species are given in Table 2. A total of 54 different compounds, composed of 14 monoterpene hydrocarbons, 14 oxygenated monoterpenes, 17 sesquiterpene hydrocarbons, 6 oxygenated sesquiterpenes, and 3 phenolic compounds were determined in essential oil of TS, TZ and TL. The yield of essential oil from the TS, TZ and TL were found to be 0.87%, 0.65% and 0.96%, respectively,

In the essential oil of TS, 87.0 mg essential oil was obtained and 20 components were defined representing the 100.0% of the total oil. 10 monoterpene hydrocarbons, 3 oxygenated monoterpenes, 4 sesquiterpene hydrocarbons, 1 oxygenated sesquiterpenes, and 2 phenolic compounds were determined in TS essential oil. TS was found to be rich in phenolic compounds (47.9%). The main compound of the essential oil of TS was carvacrol (46.7%). Other main compounds were determined as *p*-cymene (23.4%) and β-E-ocimene (16.2%) for essential oil of TS. In the previous study, the chemical composition and biological activities of the TS

essential oil has investigated by several studies (Tepe et al., 2005; Demirci et al., 2018; Polat et al., 2007; Ceylan and Ugur, 2015; Özgen et al., 2011; Baser et al., 1995). Previous studies of TS essential oil reported thymol and carvacrol as the main constituents (Tepe et al., 2005; Ceylan and Ugur, 2015). Also, Baser et al., reported geranial, neral and linalool are the main compounds in *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* (Baser et al., 1995). Demirci et al., reported the volatile components were identified as *p*-cymene (26.1%) and  $\gamma$ -terpinene (26%) within the 15. min. and thymol (75.3%) after 24 h in the HS-SPME method for *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* (Demirci et al., 2018).

In the essential oil of TZ, 65.0 mg essential oil was obtained and 27 components were defined representing the 98.0% of the total oil. 10 monoterpene hydrocarbons, 6 oxygenated monoterpenes, 6 sesquiterpene hydrocarbons, 3 oxygenated sesquiterpenes, and 2 phenolic compounds were determined in TZ essential oil. The chemical composition of the oil includes a high monoterpenes (51.3%) from which 49.0% is attributed to the oxygenated compounds. The main compound of essential oil of TZ was *p*-cymene (43.5%), with thymol (40.5%) and allo-aromadendrene (4.0%). According to literature, essential oil content [12,19-21], phenolic content (Kaska et al., 2018), antimicrobial activity (Azaz et al., 2004), antioxidant, anthelmintic and cytotoxic activities (Kaska et al., 2018) of *T. zygoides* were examined. Azaz et al., reported the major component was determined as geraniol (22.8%) of *T. zygoides* var. *lycaonicus* (Azaz et al., 2004). Baser et al., reported the main compounds were identified as linalool (33.7%) and (E)-nerolidol(12.5%) for *T. zygoides* var. *zygoides* Griseb. (Baser et al., 1999). Tzakou and Couladis reported the major constituents of *T. zygoides* var. *lycaonicus* essential oil with *p*-cymene (19.4%), thymol (19.5%) and  $\gamma$ -terpinene (17.2%) (Tzakou and Couladis, 2008).

In the essential oil of TL, 96.0 mg essential oil was obtained and 40 components were defined representing the 92.0% of the total oil. 9 monoterpene hydrocarbons, 11 oxygenated monoterpenes, 12 sesquiterpene hydrocarbons, 6 oxygenated sesquiterpenes, and 2 phenolic compounds were determined in TL essential oil. This essential oil is characterised by the high sesquiterpene hydrocarbons (36.2%). The phenolic compound thymol (30.9%) was determined as the major compounds of the essential oil followed by  $\alpha$ -bergamotene (15.3%) and *p*-cymene (10.0%). Tzakou et al., reported that chemical components and antibacterial activities of *T. longicaulis* subsp. *chaubardii* essential oil. Also, limonene (18.7%) and thymol (19.4%); geraniol (56.8%) and geranyl acetate (7.6%); linalool (63.1%) and  $\alpha$ -terpinyl acetate (20.4%) were determined as the major components in each of the three different chemotypes (Tzakou et al., 1998).

## CONCLUSION

The present work was a study of essential oil of three *Thymus* species (*Thymus longicaulis* C.Presl subsp. *chaubardii* (Rchb.f.) Jalas (TL), *T. sipyleus* Boiss (TS) and *T. zygoides* Griseb (TZ)).

The major compound in the essential oil of TL was found to be thymol (30.9%) while in the essential oil of TS was carvacrol (46.7%). Additionally *p*-cymene was determined as main compound of the essential oil of TZ. It was concluded that these differences were probably due to differences in genetic structure and growing conditions (ecological variation), geographical location, and time of collection of plant material.

It was determined that these *Thymus* species were rich in phenolic compounds. These compounds give this genus specific aroma and biological activity. Specifically, carvacrol and thymol have been reported to have strong antioxidant properties in both compounds, and also have antibacterial, antifungal, antimicrobial and insecticidal activities.

Table 2. Essential oil composition of *Thymus* species.

No	Compounds <sup>b</sup>	KI <sup>a</sup>	TS	TZ	TL	No	Compounds <sup>b</sup>	KI <sup>a</sup>	TS	TZ	TL
Essential oil yields (%)											
0.87 0.65 0.96											
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>						<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>					
1	$\alpha$ -thujene	930	1.4	0.2	0.5	29	$\delta$ -elemene	1338	1.9	2.0	0.3
2	$\alpha$ -pinene	939	1.0	0.8	0.2	30	$\alpha$ -ylangene	1375	0.2	0.1	-
3	$\alpha$ -fenchene	953	-	-	0.2	31	$\beta$ -bourbonene	1388	-	0.1	-
4	camphene	954	0.4	0.3	-	32	Z-caryophyllene	1409	-	-	4.3
5	$\beta$ -pinene	979	0.2	0.1	0.3	33	$\alpha$ -bergamotene	1413	-	-	<b>15.3</b>
6	$\beta$ -myrcene	991	-	-	0.5	34	E-caryophyllene	1419	-	-	0.2
7	$\alpha$ -phellandrene	1003	0.8	0.2	-	35	$\beta$ -cedrene	1421	-	-	0.2
8	$\alpha$ -terpinene	1017	2.1	0.5	-	36	$\beta$ -copaene	1432	-	-	2.5
9	<i>p</i> -cymene	1025	<b>23.4</b>	<b>43.5</b>	<b>10.0</b>	37	gurjunene	1434	-	-	5.8
10	$\beta$ -phellandrene	1030	0.8	0.3	-	38	$\beta$ -bergamotene	1435	-	-	0.6
11	1,8-cineole	1031	-	-	1.2	39	elemene	1437	-	-	3.3
12	cis-ocimene	1037	-	-	0.2	40	aromadendrene	1441	0.9	0.6	-
13	$\beta$ -E-ocimene	1050	<b>16.2</b>	2.7	-	41	allo-aromadendrene	1460	1.6	<b>4.0</b>	-
14	$\tau$ -terpinene	1060	0.2	0.4	0.3	42	germacrene-D	1485	-	0.2	-
	% identified		<b>46.5</b>	<b>49.0</b>	<b>13.4</b>	43	$\beta$ -bisabolene	1507	-	-	2.7
<b>Oxygenated monoterpenes</b>						44	$\delta$ -cadinene	1523	-	-	0.6
15	cis-sabinene hydrate	1070	0.2	0.1	0.4	45	trans-calamenene	1529	-	-	0.4
16	1-terpineol	1134	-	0.1	-		% identified		<b>4.6</b>	<b>7.0</b>	<b>36.2</b>
17	limonene oxide	1142	-	-	0.2	<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>					
18	$\beta$ -cis-terpineol	1144	0.4	1.5		46	spathulenol	1578	0.1	0.7	0.5
19	camphor	1146	0.3	0.3	0.2	47	caryophyllene oxide	1583	-	0.1	0.4
20	menth-3-en-8-ol	1150	-	0.1	0.2	48	globulol	1585	-	-	0.4
21	$\delta$ -terpineol	1166	-	-	0.2	49	cedrol	1601	-	-	0.3
22	borneol	1169	-	-	1.3	50	cadinol<epi-alpha->	1640	-	-	0.2
23	4-terpineol	1177	-	-	0.9	51	$\alpha$ -cadinol	1654	-	0.1	0.2
24	dihydrocarvone	1193	-	-	0.2		% identified		<b>0.1</b>	<b>0.9</b>	<b>2.0</b>
25	pulegone	1237	-	-	0.7	<b>Phenolic compounds</b>					
26	cis-carveol	1229	-	0.2	-	52	carvacrol, methyl ether	1245	1.2	-	-
27	carvone	1243	-	-	0.2	53	thymol	1290	-	<b>40.5</b>	<b>30.9</b>
28	dihydro carveol acetate	1307	-	-	2.2	54	carvacrol	1299	<b>46.7</b>	0.1	2.8
	% identified		<b>0.9</b>	<b>2.3</b>	<b>6.7</b>		% identified		<b>47.9</b>	<b>40.6</b>	33.7
							<b>Total (%)</b>		<b>100</b>	<b>98.0</b>	<b>92.0</b>

<sup>a</sup>KI Kovats indices

<sup>b</sup>Compounds listed in order of elution from a DB-5 column

## REFERENCES

- Ali IBEH, Chaouachi M, Bahri R, Chaieb I, Boussaïd M, Harzallah-Skhiri F 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. Industrial Crops and Products, 77: 631-639.
- Azaz AD, Irtem HA, Kurkcuoglu M, Baser KHC 2004. Composition and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. Z. Naturforsch, 59: 75-80.
- Ballester-Costa C, Sendra E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M 2013. Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. Industrial Crops and Products, 50: 304-311.
- Baser KHC, Kürkçüoğlu M, Özek T, Tümen G, Akgül A 1995. Essential oil of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*. Journal of Essential Oil Research, 7: 411-413.
- Baser KHC, Demirci B, Kürkçüoğlu M, Tümen G 1999. Essential oil of *Thymus zygoides* Griseb. var. *zygoides* from Turkey. Journal of Essential Oil Research, 11: 409-410.



- Baser KHC, Kirimer N, Ermin N, Kürkçüoğlu M, Tümen G 1996. Essential oils from four chemotypes of *Thymus zygioides* Griseb. var. *lycaonicus* (Celak) Ronniger. Journal of Essential Oil Research, 8: 615-618.
- Ceylan O, Ugur A 2015. Chemical composition and anti-biofilm activity of *Thymus sipyleus* BOISS. subsp. *sipyleus* BOISS. var. *davisanus* RONNIGER essential oil. Archives of Pharmacal Research, 38: 957-965.
- Corticchiato M, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J 1998. Composition and infraspecific variability of essential oil from *Thymus herba barona* Lois. Biochemical Systematics and Ecology, 26: 915-932.
- Demirci F, Karaca N, Tekin M, Demirci B 2018. Anti-inflammatory and antibacterial evaluation of *Thymus sipyleus* Boiss. subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* essential oil against rhinosinusitis pathogens. Microbial Pathogenesis, 122: 117-121.
- Gonçalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C, Lopes MC, Salgueiro L 2010. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. Industrial Crops and Products, 32: 70-75.
- Gökbulut A 2015. Validated RP-HPLC method for quantification of phenolic compounds in methanol extracts of aerial parts and roots of *Thymus sipyleus* and evaluation of antioxidant potential. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14: 1871-1877.
- Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, Faleiro ML, Miguel MG 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chemistry, 116: 714-721.
- Kaska A, Çiçek M, Deniz N, Mammadov R 2018. Investigation of phenolic content, antioxidant capacities, anthelmintic and cytotoxic Activities of *Thymus zygioides* Griseb. Journal of Pharmaceutical Research International, 21: 1-13.
- Nickavar B, Esbati N 2012. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 5: 119-125.
- Ozen T, Demirtas I, Aksit H 2011. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. Food Chemistry, 124: 58-64.
- Özgen U, Mavi A, Terzi Z, Kazaz C, Asçi A, Kaya Y, Seçen H 2011. Relationship between chemical structure and antioxidant activity of luteolin and its glycosides isolated from *T. sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus*. Records of Natural Products, 5: 12.
- Pereira OR, Peres AM, Silva AM, Domingues MR, Cardoso SM 2013. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. Food Research International, 54: 1773-1780.
- Polat ZA, Tepe B, Vural A 2007. In vitro effectiveness of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. Parasitology Research, 101: 1551-1555.
- Tzakou O, Couladis M 2008. Essential oil of *Thymus zygioides* var. *lycaonicus* from Greece. Journal of Essential Oil Research, 20: 442-443.
- Tzakou O, Verykokidou E, Roussis V, Chinou I 1998. Chemical composition and antibacterial properties of *Thymus longicaulis* subsp. *Chaoubardii* oils: three chemotypes in the same population, J. Essent. Oil Res., 10: 97-99.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A 2005. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. Journal of Food Engineering, 66: 447-454.
- Yaşar S, Dişli M, Sonkaya Y 2016. Comparison of volatile components of *Thymus zygioides* Griseb. var. *lycaonicus* (Celak.) Ronniger due to reaping time. Turkish Journal of Forestry, 17: 94-98.

## Proliferation of HELA cells may be prevented by rivaroxaban

Özer Aylin Gürpınar<sup>1\*</sup>, Emre Kubat<sup>1,2</sup>, Durdu Karasoy<sup>3</sup>, Özgü Zuğa Örsöğlü<sup>1</sup>, Mehmet Ali Onur<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara, Türkiye.

<sup>2</sup>Gülhane Training and Reserch Hospital, Department of Cardiovascular Surgery, Ankara, Türkiye.

<sup>3</sup>Hacettepe University, Faculty of Science, Department of Statistics, Ankara, Türkiye.

\*Corresponding author e-mail: gurpinar@hacettepe.edu.tr

### Abstract

New oral anticoagulants including rivaroxaban are commonly used in the prophylaxis and treatment of systemic embolism and deep vein thrombosis. Cancer patients have also an increased risk of developing venous thromboembolic events or may have other indications for anticoagulation, such as atrial fibrillation. Several data suggest that anticoagulant drugs may have an effect on tumor development and progression. In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of rivaroxaban on a cervical cancer cell line HeLa cells. Cells lines were placed in 96-well culture at an initial density of 50.000 cells/ml in six replicates. HeLa cells were incubated in the Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F12 supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Following incubation, the cells were treated with four dilutions (dilution I: 30  $\mu$ m; dilution II: 15  $\mu$ m; dilution III: 7.5  $\mu$ m; dilution IV: 3.75  $\mu$ m and control: only the cell culture medium) of the test material [Xarelto (rivaroxaban, 20 mg)<sup>TM</sup>]. Test material was prepared in culture medium supplemented with 1% dimethyl sulfoxide. The cell viability was determined by MTT assay. At 24 and 48-hours incubation, the cells exposed to dilution I of rivaroxaban showed a significant difference compared to control group ( $p < 0.001$ ). The cells displayed cellular alterations including nuclear condensation, rounded morphology, and cell degeneration. These results showed that rivaroxaban may reduce proliferation of cancer cells in high dilutions.

**Keywords:** Oral anticoagulants, Rivaroxaban, Cell viability, MTT assay

### INTRODUCTION

Rivaroxaban is a non-vitamin K oral anticoagulant (NOAC) (Di Minno, 2017). Non-vitamin K oral anticoagulants are good alternatives to other anticoagulants such as heparin and low molecular weight heparins (LMWH) (Sogaard, 2019). Oral anticoagulants are commonly used in the prophylaxis and treatment of systemic embolism and deep vein thrombosis (Di Minno, 2017). Thromboembolic disorder is a serious risk factor in cancer patients. Acute VTE is the second leading cause of death after the malignancy itself (Signorelli, 2019). Recurrent VTE and bleeding complications are high risk factors in anticoagulant treatment for acute VTE in cancer patients (Sogaard, 2019). As well as their benefits to prevent VTE, anticoagulant drugs may have an inhibitory effect on tumor development and progression. However, there is only a few data suggest that anticoagulant drugs may have an inhibitory effect on cancer cells (Núñez-Navarro, 2017). In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of rivaroxaban on a cervical cancer cell line HeLa cells.

### MATERIAL and METHODS

#### Cell culture and treatment of cells with test material

HeLa cells were cultured in a 96-well plate (Greiner Bio-One, Germany) and 50,000 cells/mL in each six replicate plates were seeded. The cells were, then, incubated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/Ham's F12 (Biowest Inc., Nuaille, France) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest Inc., Nuaille, France) at a humid environment and 95% air and 5% CO<sub>2</sub> and 37°C for 12 hours. After incubation, the cells were treated with four dilutions of the test material [Xarelto (rivaroxaban, 20 mg)<sup>TM</sup>]. Dilutions were prepared in the medium as Dilution I: 30  $\mu$ M; Dilution II: 15  $\mu$ M; Dilution III: 7.5  $\mu$ M; Dilution IV: 3.75  $\mu$ M. In the control group, the cells were incubated in the test material-free medium.

#### Assessment of cell morphology

Alterations in the cell morphology were analyzed using an inverted microscope (IX70 Olympus, Japan). At 24 and 48 hours. All dilutions treated with the test material were compared with the control group.

#### Assessment of cell viability

Alterations in the cell viability were analyzed using an inverted microscope (IX70 Olympus, Japan) and apoptosis was analyzed using propidium iodide (PI) / acridine orange staining. At 24 and 48 hours, all dilutions treated with the test material were compared with the control group. The cell viability was analyzed through (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) assay. At 24 and 48 hours of incubation, the media were removed and 12.5  $\mu$ L MTT solution (Sigma-Aldrich, Germany) was added into 100  $\mu$ L FBS-free DMEM/F12 for the each well. The cell culture plates were wrapped with aluminum foil and incubated for four hours. Then, MTT solution was removed and 100  $\mu$ L isopropyl alcohol (Amresco Inc., USA) was added to discontinue reaction. The cell viability was measured through an ultraviolet (UV)-visible spectrophotometer (EZ Reac 400 Microplate Reader, Biochrom) at an absorbance of 560 nm wavelength. In order to observe apoptosis, at 24 hours of incubation, the media on the cells were removed and PI/AO (Sigma-Aldrich, Germany) was added without fixation at a v/v ratio of 1:1 and incubated for 20 sec. Subsequently, the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Germany) for 10 sec and covered with a PBS: glycerol (v/v: 1:1) mounting medium. The cells were, then, examined under a fluorescence microscope. Apoptotic cells were evaluated by counting red cells with fragmented nuclei. The PI/AO-stained cells were observed under a narrow band fluorescein (FITC) filter (520–560 nm) in green color, and PI-stained cells were observed under rhodamine filter (510–560 nm) as stained red.

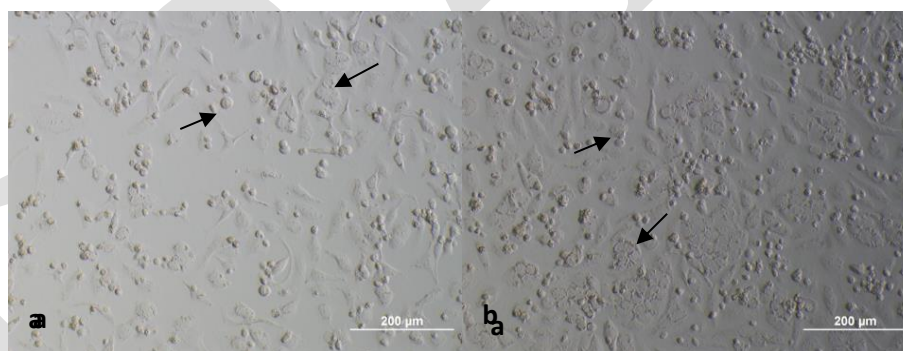
#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS version 23.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Descriptive statistics were expressed in mean  $\pm$  standard deviation (SD). The Kolmogorov-Smirnov test was used for the normality test. The analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means of more than two groups. A *post-hoc* test (least significant difference [LSD] or Tamhane's test) was used to analyze significant differences among the groups. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS and DISCUSSION

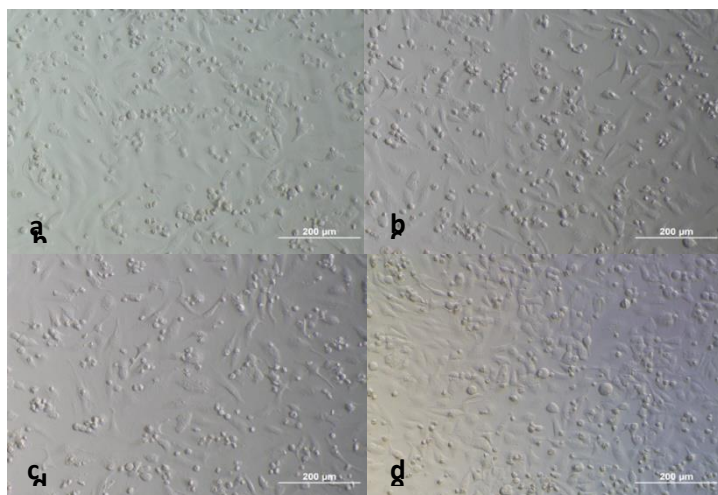
### Assessment of cell morphology

After 24 and 48 hours of incubation, the cells exposed to 30  $\mu$ M of rivaroxaban (Dilution I) showed a significant difference compared to normal fibroblastic morphology. The cells displayed degeneration as nuclear condensation and rounded cell morphology (**Fig. 1a and b**).

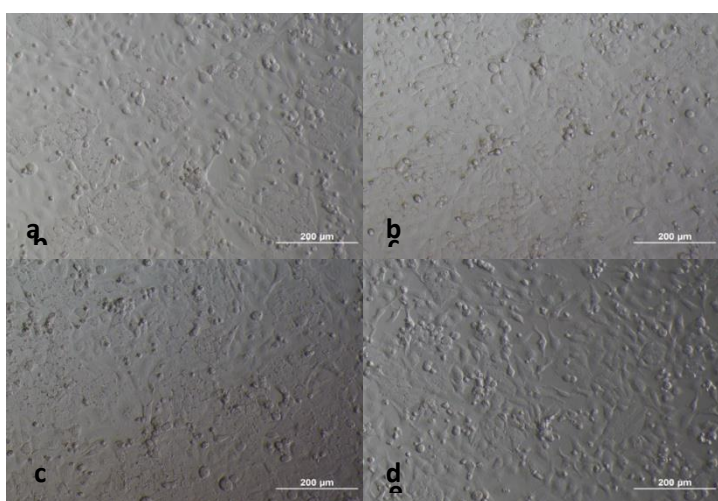


**Figure 1.** Morphological appearance of HeLa cells exposed to enoxaparin sodium in Dilution I at 24 hours (a) and 48 hours (b) (10 $\times$ ) (black arrows indicate rounded and degenerated cells).

In the other dilutions of rivaroxaban (Dilution II, III and IV) cells display similar fibroblastic morphology compared to control cells at 24 hours (**Fig. 2a-d**) and at 48 hours (**Fig. 3a-d**).



**Figure 2.** Morphological appearance of HeLa cells exposed to enoxaparin sodium at 24 hours. Dilution II (a) (10×); Dilution III (b) (10×); Dilution IV (c) (10×) and Control (d) (10×) at 24 hours of incubation.



**Figure 3.** Morphological appearance of HeLa cells exposed to enoxaparin sodium at 48 hours. Dilution II (a) (10×); Dilution III (b) (10×); Dilution IV (c) (10×) and Control (d) (10×) at 24 hours of incubation.

### Assessment of cell viability

The cell viability was examined for each dilution compared with the control group at 24 and 48 hours after incubation (**Table 1 and 2**). The cell viability was significantly lower in Dilution I than the control group both at 24 and 48 hours ( $p < 0.05$ ). there was no significant difference in the cell viability in Dilutions II, III and IV compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** MTT results of rivaroxaban at 24 hours in each dilution compared to control group

Time	Dilutions	Mean	sd	p
24 h	D1	0,252	0,006	$p < 0,05$
	D2	0,340	0,062	$p > 0,05$
	D3	0,349	0,066	$p > 0,05$
	D4	0,368	0,076	$p > 0,05$
	Control	0,389	0,175	-

Mean: Absorbance (OD), sd: standart deviation, \*P values compared to control group.  
Dilution I: 30 µm; Dilution II: 15 µm; Dilution III: 7,5 µm; Dilution IV: 3,75

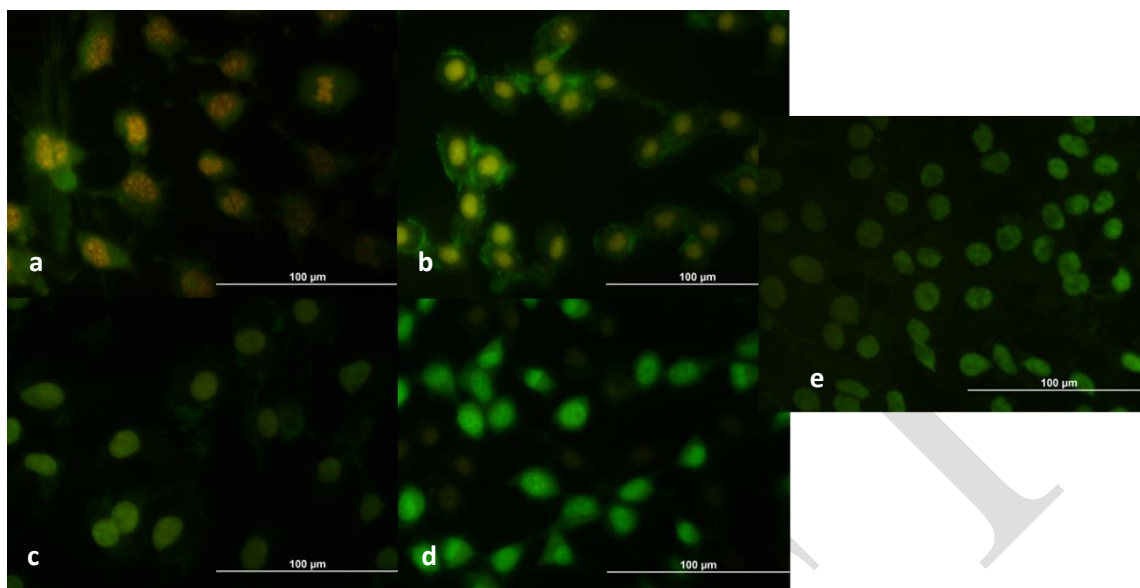
**Table 2.** MTT results of rivaroxaban at 48 hours in each dilution compared to control group

Time	Dilutions	Mean	sd	p
48 h	D1	0,334	0,036	$p < 0,05$
	D2	0,448	0,062	$p > 0,05$
	D3	0,533	0,066	$p > 0,05$
	D4	0,507	0,076	$p > 0,05$
	Control	0,579	0,175	-

Mean: Absorbance (OD), sd: standart deviation, \*P values compared to control group.

Dilution I: 30  $\mu$ m; Dilution II: 15  $\mu$ m; Dilution III: 7,5  $\mu$ m; Dilution IV: 3,75

According to AO/PI staining results normal fibroblast cells elongated with intact nuclei and were stained with green color, while apoptotic cells were in red dye with round-shape morphology and fragmented nuclei. The apoptotic effect was prominent in Dilution I (**Fig. 4a**). In Dilution II, III and IV, there was no significant alteration in the cell morphology, compared to the control group (**Fig. 4b-e**).



**Figure 4.** AO/PI staining of HeLa cells exposed to enoxaparin sodium. Red and round apoptotic cells in Dilution I (a) (10 $\times$ ); Green healthy and normal cells in Dilution II (b), III (c), IV (d) and Control (e) (10 $\times$ ) at 24 hours of incubation.

Many the types of anticoagulants have been used for treatment or secondary prevention of VTE (Kubat et al., 2018). VTE is also very important risk factor in cancer patients as a result of increasing expression and releasing of procoagulants, endothelial damage, use of hormones and steroids or use of central venous catheters (Signorelli, 2019). Treatment of VTE in cancer patients can be difficult due to increased risk of bleeding and drug-drug interactions with chemotherapeutic agents (Ay, 2019). Therefore, safe and effective anticoagulant therapy has a vital importance in cancer treatment. Several studies have reported that cancer patients receiving anticoagulants show prolonged survival with a good prognosis (Tieken, 2016). In addition, it has been reported that FXa inhibitors have effect over migration of breast, lung and colon cancer cells. (Sampson, M. T 2010) In these studies, the effect of anticoagulants on tumor development and progression is not fully understood and there is only a few data suggest that anticoagulant drugs may have an inhibitory effect on cancer cells. FXa inhibitors such as rivaroxaban are pyrazol derivatives (Lourenço, 2019) and recent studies have showed that pyrazol-based compounds have anti-cancer activity (Ardianash, 2017). Furthermore, Núñez-Navarro et al stated that newly synthesized of analogous to the commercial FXa inhibitor has cytotoxic effect on cancer cells (Núñez-Navarro, 2017). In addition, tissue factor pathway inhibitor, a physiological FXa inhibitor, has been described as an inducer of apoptosis in tumor cells, activating caspase, unbalancing anti- and pro-apoptotic protein expression and also preventing metastasis in vivo (Hembrough, 2003). Recently, amblyomin-X, a Kunitz type FXa inhibitor highly similar to tissue factor pathway inhibitor, has been described as a drug able to reduce the cell viability in vivo of several cancer cell lines (Ventura JS 2013). In a study, it was found that benzimidazole derivatives from pyrazole show potent anticancer activities (Akhtar MJ 2018). In this study, we also found that high dilutions of rivaroxaban caused cell apoptosis of the HELA cells. Assessment of cell viability and morphology showed us rivaroxaban is a strong cytotoxic and apoptotic agent for HELA cells in high dilutions. As a result, rivaroxaban contains pyrazole ring and pyrazole ring and its derivates show anticancer effect via potent apoptotic and cytotoxic properties.

## CONCLUSION

In conclusion, in this study, we used HeLa cervical cancer cell line to investigate cytotoxic effects of rivaroxaban in an in vitro model. The results of present study suggest that a non-vitamin K oral anticoagulant rivaroxaban is cytotoxic in high doses, although cell viability is similar to control group in lower doses.

Therefore, it can be said that rivaroxaban may be a good cytotoxic and apoptotic agent in cancer patients as well as its anticoagulant activity.

## REFERENCES

- Ardiansah B 2017. Recent reports on pyrazole-based bioactive compounds as candidate for anticancer agents. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10: 45-51.
- Ay C, J. Beyer-Westendorf, PI 2019. Treatment of cancer-associated venous thromboembolism in the age of direct oral anticoagulants. *Annals of Oncology*, 30: 897–907.
- Di Minno A, Frigerio B, Spadarella G, Ravani A, Sansaro D, Amato M, Kitzmiller JP, Mauro P, Tremoli E, Baldassarre D 2017. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. *Blood Reviews*, 31: 193–203.
- Lourenço ALPG, Vegi PF., Faria JV, Pinto GSP, Santos S. dos, Sathler Plínio C, Saito MS., Santana M, Dutra TPP, Rodrigues CR, Monteiro R, Bernardinoc AMR, Castroa H 2019. Pyrazolyl-Tetrazoles and Imidazolyl-Pyrazoles as potential anticoagulants and their Integrated Multiplex Analysis Virtual Screening. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1: 33-47.
- Núñez-Navarro NE., Segovia GF., Burgos Renato A., Lagos Carlos F., Fuentes-Ibacache Nataly, Faúndezb Mario A., Zacconi Flavia C. 2017. Microwave Assisted Synthesis of Novel Six-Membered 4-C, 4-O and 4-S Lactams Derivatives: Characterization and in vitro Biological Evaluation of Cytotoxicity and Anticoagulant Activity. 2: 203-207.
- Signorelli JR, Gandhi AS. 2019. Evaluation of rivaroxaban use in patients with gynecologic malignancies at an academic medical center: A pilot study. 25: 362–368.
- Søgaard M, Nielsen PB, Skjøth F, Kjældgaard Jette N, Larsen TB 2019. Risk of recurrence and bleeding in patients with cancer-associated venous thromboembolism treated with rivaroxaban: A nationwide cohort study. *Cancer Medicine*, 8: 1044–1053.
- Tieken Chris, Versteeg Henri H 2016. Anticoagulants versus cancer. *Thrombosis Research*, S148–S153.
- Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ 2003. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 63:2997±3000. PMID: 12782609.
- Ventura JS, Faria F, Batista IF, Simons SM, Oliveira DG, Morais KL 2013. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 67:192±196.
- Sampson MT, Kakkar AK 2002. Coagulation proteases and human cancer. *Biochemical Society Transactions* 30: 201-7.
- Akhtar MJ, Khan AA, Ali Z, Dewangan RP, Rafi M, Hassan MQ, Akhtar MS, Siddiqui AA, Partap S, Pasha S, Yar MS 2018. Synthesis of stable benzimidazole derivatives bearing pyrazole as anticancer and EGFR receptor inhibitors. *Bioorg Chem.* 78:158-169.

## Kopolimerlerin Dielektrik Sabitini Geliştirmede Frekans, Voltaj, Grafen Katkısının Etkisi ve Optimizasyonu

Gülben Torğut<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, TMYO, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri, Tunceli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: gtorgut@munzur.edu.tr

### Özet

Poli (Vinil pivalat-ko-Maleik anhidrit) [poli(VP-ko-MA)] kopolimerinin dielektrik sabitini ( $\epsilon$ ) optimize etmek için merkezi kompozit tasarımı (MKT) birleştirilmiş cevap yüzey yöntemi (CYY) kullanılmıştır. 3 değişken (frekans, uygulanan voltaj ve grafen miktarı) arasındaki etkileşim incelenmiş ve modellenmiştir. Sonuçların istatistiksel analizi varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Deneysel sonuçlara göre, artan grafen miktarıyla birlikte dielektrik sabiti önemli ölçüde artarken, frekansın artmasıyla azalmıştır. Aksine uygulanan voltajın kopolimerin  $\epsilon$  üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. RSM ile tahmin edilen optimum değerlerin deneysel verilerle uyum içinde olduğu onaylanmıştır. Ayrıca RSM, 127 Hz frekansında, 7.44 V voltajında ve ağırlıkça % 9.52 grafen içeriğinde maksimum  $\epsilon$  (11.55) elde edildiğini belirtti.

**Anahtar Kelimeler:** Dielektrik sabiti, grafen, cevap yüzey yöntemi, kopolimer, ANOVA

### Effect and Optimization of Frequency, Voltage, Graphene Additive in Developing Dielectric Constant of Copolymers

#### Abstract

To optimize the dielectric constant ( $\epsilon$ ) of the poly (vinyl pivalate-co-maleic anhydride) [poly(VP-co-MA)] copolymer, the response surface method (CYY) combined with the central composite design (MCT) was used. The interaction between 3 variables (frequency, applied voltage and graphene amount) was examined and modeled. Statistical analysis of the results was performed by analysis of variance (ANOVA). According to the experimental results, the dielectric constant increased significantly with increasing amount of graphene, but decreased with increasing frequency. On the contrary, it was found that the applied voltage had no significant effect on the copolymer  $\epsilon$ . The optimum values predicted by RSM were confirmed to be in agreement with the experimental data. Also, the RSM indicated that maximum  $\epsilon$  (11.55) was achieved at the frequency of 127 Hz, at the voltage of 7.44 V, and at the graphene content of 9.52 wt%.

**Keywords:** Dielectric constant, graphene, response surface method, copolymer, ANOVA.

### GİRİŞ

Dielektrik malzemeler elektrik ve elektronik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimer içeren kompozitler, benzersiz dielektrik özelliklerinden dolayı şarj depolama kapasitörlerinde kullanılır (Wang ve Zhu, 2011). Genel olarak, polimer malzemeler düşük dielektrik geçirgenliğe sahiptir. Fakat, küçük bir miktar (hacimce % 1'i) iletken dolgu maddesinin eklenmesi dielektrik geçirgenliği önemli ölçüde artırır (Ahmad ve ark., 2019). Grafen, grafen oksit, grafit, gibi nano doldurucular faz-faz dönüşümü kolaylaştırır, bu da güçlü arayüzey etkileşimleri ile sonuçlanır ve dielektrik sabitini artırır (Li ve ark., 2019). Son zamanlarda, grafen katkılı nanokompozitler, yüksek dielektrik sabiti ve düşük dielektrik kayıpları nedeniyle bilim adamlarının nano dinamik uygulamaları için ilgi odağı olmuştur.

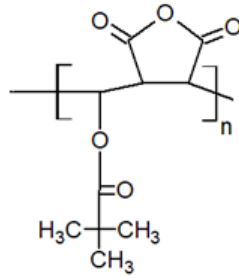
Grafen (GN), petek yapılı tek katmanlı iki boyutlu karbon bileşiğine sahip yeni bir nanomalzemedir (Lee ve ark. 2014; Liu ve ark., 2013). Yüksek yüzey alanı, iyi elektrokatalitik aktiviteler, yüksek yük taşıma hareketi, ve güçlü mekanik mukavemeti nedeniyle en çekici nanomalzemelerden biridir (Stoller ve ark., 2008; Geim ve Novoselov, 2007). GN, diğer karbon nanomalzemelerinden farklıdır ve teknolojik sürecin ilerlemesine izin veren benzersiz fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Ek olarak, GN içeren nanokompozitler, mükemmel fiziksel, mekanik ve kimyasal stabiliteleri nedeniyle çeşitli alanlarda büyük dikkat çekmiştir (Wu ve ark., 2018). Güçlü karbon-karbon bağlarına sahip olmak, aromatik bir yapı, esneklik, güçlü elektriksel iletkenlik, optik ve mekanik özellikler GN'yi önemli kılar. Son yıllarda, grafen nanoparçacıkları polimer özelliklerini iyileştirmek için takviye edici materyaller olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Mittal ve ark., 2015). Özellikle elektriksel olarak iletken polimer-grafen kompozitler, süper kapasitörlerden, güneş pillerinden ve transistörlerden biyomedikal alanlara kadar birçok uygulama bulmuşlardır (Kaur ve ark., 2015).

Cevap yüzey yöntemi (CYY) ve faktör tasarımı, deneysel modelleme için yaygın olarak kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerdir (Nasouri ve Shoushtari, 2017). Sorunların analizinde ve bağımsız süreç faktörleri arasındaki zorlu ilişkilerin belirlenmesinde başarılı bir yöntemdir. Ayrıca, CYY parametrelerin önemini belirler ve bir süreci optimize eder. CYY'nin optimizasyonda kullanılması, minimum deney sayısı ile daha doğru ve eksiksiz sonuçlar sağlar.

Bu çalışmada, merkezi kompozit tasarım (MKT), üç parametre (frekans, voltaj ve grafen miktarı) arasındaki kantitatif ilişkiyi araştırmak ve bunların poli(VP-ko-MA) kopolimerinin dielektrik sabiti üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Poli(VP-ko-MA)-grafen nanokompozitlerin dielektrik özellikleri, literatürde CYY kullanılarak ilk kez çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda kullanılan kopolimerin kimyasal kimyasal yapısı şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Kopolimerin kimyasal yapısı

### Deney tasarımı

Bu çalışmada tasarım sürecinin geliştirilmesi ve optimize edilmesi için bir deney yöntemi tasarımı olan CYY, çalışma parametrelerinin olası etkileşimlerindeki önemini araştırmak için kullanılmıştır. Merkezi kompozit tasarım (MKT), istatistiksel analiz yapmak ve regresyon modelini oluşturmak için Tasarım Uzman Yazılımı, sürüm 7.0.0 kullanılarak oluşturulmuştur. ANOVA (Varyans Analizi) kullanılarak istatistiksel olarak daha önemli model parametreleri tanımlanmıştır. Bu araştırma için üç değişken vardır: frekans (A), voltaj (B) ve grafen yükleme (C). Dielektrik sabiti değişkenin cevabıdır. Çalışma için her biri üç seviyede üç değişken kullanılarak yirmi deney yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Deneysel tasarımda değişken faktörler ve özellikleri

Faktörler	Çalışma aralığı ve değerleri				
	$-\alpha$ (-1.682)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1.682)
$X_1$ (A): Frekans (Hertz)	50	537.5	1025.00	1512.5	2000
$X_2$ (B): Voltaj (Volt)	-20	-10	0.000	10	20
$X_3$ (C): Kütlece grafen yüzdesi	0	2.5	5.000	7.5	10

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, voltaj, frekans ve GN miktarı proses değişkenleri olarak seçilmiş ve MKT kullanılarak dielektrik sabiti incelenmiştir. MKT kullanılarak oluşturulan bağımsız değişkenlerin değerleri, deney tasarımı ve bu tasarımdan elde edilen deney sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Poli(VP-ko-MA) kopolimerin dielektrik sabiti, ANOVA kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Deneysel sonuçlara göre, cevap (Dielektrik sabiti) ile bağımsız değişkenler arasındaki ampirik ilişki aşağıdaki gibidir.

$$\hat{\epsilon} = 9.41 - 0.29A + 2.46E - 003B + 1.49C - 2.63E - 003AB + 8.80E - 003AC + 2.45E - 003BC + 0.11A^2 - 0.14B^2 - 0.03C^2 \quad (1)$$



Denklem 1'den görülebileceği gibi, frekans (A) ve voltaj (B) negatif bir etkiye sahiptir ve GN miktarı (C) pozitif bir etkiye sahiptir. Bu, dielektrik sabitinin, frekans ve voltaj arttıkça azaldığını, artan GN miktarıyla arttığını gösterir. Tablo 3'de, Poli(VP-ko-MA)'nın  $\epsilon$  için modelin önemli terimlerinin C ve C<sup>2</sup> olduğu açıktır. (P < 0.05). Ayrıca, bu sonuçlar özellikle GN miktarının (P < 0.0001)  $\epsilon$  üzerindeki en etkili değişken olduğunu göstermektedir.

**Tablo 2.** Deneysel dizayn ve MKT sonuçları.

Deney Sıra No	Bağımsız değişkenler			Cevap (Y)
	A	B	C	Dielektrik sabiti ( $\epsilon$ )
	Frekans, (Hertz)	Voltaj, (V)	Grafen miktarı, (%wt)	
1	1025	0.00	5.00	9.38
2	1025	0.00	5.00	9.38
3	445	-11.89	2.03	7.42
4	445	-11.89	7.97	10.27
5	1025	0.00	10.00	11.52
6	1025	0.00	5.00	9.38
7	1025	0.00	5.00	9.38
8	1604	11.89	2.03	7.17
9	1604	11.89	7.97	10.07
10	1025	0.00	5.00	9.38
11	1604	-11.89	7.97	10.06
12	1025	0.00	5.00	9.38
13	1025	-20.00	5.00	9.45
14	1025	20.00	5.00	9.45
15	1025	0.00	0.00	6.29
16	445	11.89	7.97	10.30
17	2000	0.00	5.00	9.28
18	445	11.89	2.03	7.43
19	1604	-11.89	2.03	7.16
20	50	0.00	5.00	11.05

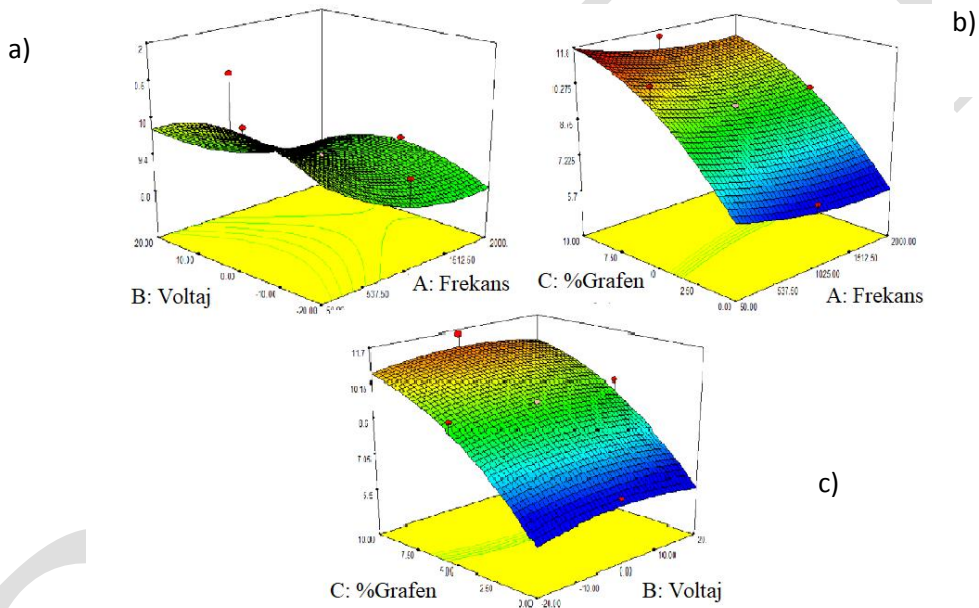
ANOVA tasarımı hangi faktörün en önemli olduğunu göstermesi yanında, araştırılan faktörler arasındaki ilişkiyi belirler ve deney sonuçlarının anlamlı olup olmadığı hakkında bilgi verir. Genel olarak, Prob> F değerinin 0,05'ten küçük olması, faktörlerin önemli bir etkiye sahip olduğunu ve modelin üretilen verilerle iyi uyum gösterdiğini göstermektedir (Rzaev ve ark., 2002). Bu çalışmada modelin P ve F değerleri sırasıyla 0.0001 ve 14.68'dir. bu değerlere göre deney, istatistiksel olarak anlamlıdır. Korelasyon katsayısının yüksek değeri ( $R^2 = 0.9296$ ) modelin yüksek hassasiyetini göstermektedir.

**Tablo 3.** Dielektrik sabiti için ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Ortalama kare	F- değeri	P-değeri P > F	Anlamlılık
Model	33.47	9	3.72	14.68	< 0.0001	anlamlı
A-Frekans	1.14	1	1.14	4.50	0.059	
B-Voltaj	$8.27 \times 10^{-5}$	1	$8.27 \times 10^{-5}$	$3.26 \times 10^{-4}$	0.9859	
C-% Grafen	30.20	1	30.20	119.20	< 0.0001	
AB	$5.56 \times 10^{-5}$	1	$5.56 \times 10^{-5}$	$2.19 \times 10^{-4}$	0.9885	
AC	$6.19 \times 10^{-4}$	1	$6.19 \times 10^{-4}$	$2.44 \times 10^{-3}$	0.9615	
BC	$4.82 \times 10^{-5}$	1	$4.82 \times 10^{-5}$	$1.90 \times 10^{-4}$	0.9893	
A <sup>2</sup>	0.19	1	0.19	0.73	0.4121	
B <sup>2</sup>	0.28	1	0.28	1.12	0.3157	
C <sup>2</sup>	1.60	1	1.60	6.33	0.0306	
Uyum eksikliği	2.54	5	0.51			anlamlı
Saf hata	0.000	5	0.000			

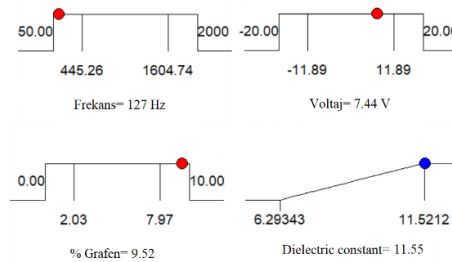
Değişkenlerin optimum değerlerini belirlemek ve değişkenler arasındaki etkileşimi anlamak için oluşturulan modele dayanarak üç boyutlu tepki yüzeyi grafikleri çizilmiştir. Şekil 5 (a), frekans ile gerilimin  $\epsilon$  üzerindeki etkileşiminin 3D grafiğini gösterir. Şekil 5a, hem frekansın hem de voltajın  $\epsilon$  üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu göstermiştir. Voltajın  $\epsilon$  üzerindeki etkisi oldukça azdır. En yüksek  $\epsilon$  değeri düşük frekanslarda görülmüştür.  $\epsilon$  bir malzemenin üzerindeki yükleri depolama yeteneğini ölçmek için bir katsayıdır. Elektrik alanı altında, bir süre polar yapı polimerlerin dipollerini yönlendirmek gerekir. Bu süre yüksek frekanslarda yeterli değildir, bu nedenle  $\epsilon$  sabiti azalır (Mousavi ve ark., 2016). Polimerler alternatif bir elektrik alanında bırakıldığında elektronlar ve atomlar yer değiştirir, böylece elektrik yükü merkezleri elektriksel kutuplaşmaya neden olur. GN yüklemesi sabitken poli (VP-ko-NIPA) kopolimeri için maksimum  $\epsilon$  değeri 100 Hz civarında, 10V'da sağlandı.

Frekansın ve grafen yüklemesinin bir fonksiyonu olarak dağılımını gösteren 3D grafiği Şekil 5 (b) 'de gösterilmiştir. Grafen miktarındaki artış ve frekanstaki düşüş  $\epsilon$ 'inde yükselişe neden olmuştur. Ayrıca, sabit voltajda, grafen miktarının  $\epsilon$  üzerindeki etkisinin düşük frekansta daha belirgin olduğu açıktır. Şekil 5'den (c) görülebileceği gibi, grafen yüklemesinin artmasının  $\epsilon$ 'ni arttırdığı açıktır. Bununla birlikte, voltajdaki artışla  $\epsilon$  neredeyse sabit kalmıştır.



Şekil 2. Farklı deneysel şartlar için poli(VP-co-MA) kopolimerinin dielektrik sabitinin 3D grafikleri

Poli(VP-ko-MA) kopolimerinin maksimum dielektrik sabiti değerini belirlemek için Desing expert'in desirability programı kullanılmıştır ve optimum şartlar belirlenerek ve Şekil 3'de verilmiştir. Bulunan optimum şartlar, frekans için 127 Hz, voltaj için 7.44 V ve grafen miktarı için %9.52'dur. Bu şartlarda  $\epsilon$  değeri 11.55 olarak bulunmuştur.



Desirability=1.000

Şekil 3. Maksimum dielektrik sabitini veren parametrelerin optimum değerleri

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, Merkezi kompozit tasarım frekans, uygulanan voltaj ve grafen miktarı arasında kantitatif ilişkiler kurmak için kullanılmıştır. Modelde terimlerin önemi varyans analizi (ANOVA) sonuçlarının analizi ile incelenmiştir. Sonuçlar, dielektrik sabitinin MKT modeliyle çok kesin bir şekilde tahmin edilebileceğini göstermiştir. Poli(VP-ko-MA) kopolimerinin  $\epsilon$ , grafen %'sinin artmasıyla önemli ölçüde artarken, frekansın artmasıyla azalmıştır. Voltaj değişikliğinin ise  $\epsilon$  üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. En yüksek  $\epsilon$  değeri için optimum şartlar belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

Ahmad MW, Dey B, G Sarkhel, Bag DS, Choudhury A 2019. Exfoliated graphene reinforced polybenzimidazole nanocomposites with high dielectric permittivity at low percolation threshold. Journal of Molecular Structure, 1177: 491-498.

Geim A, Novoselov K 2007. The rise of graphene. Nature Materials, 6: 183-191.

Kaur G, Adhikari R, Cass P, Bown M, Gunatillake P 2015. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. RSC Advances, 5: 37553-37567

Lee EJ, Lee JH, Shin YC, Hwang DG, Kim JS, Jin OS, Jin L, Hong SW, Han D.-W 2014. Graphene oxide-decorated PLGA/collagen hybrid fiber sheets for application to tissue engineering scaffolds. Biomaterials Research, 18: 18-24

Li W, Song Z, Qian J, Tan Z, Chu H, Wu X, Nie W, Ran X 2019. Enhancing conjugation degree and interfacial interactions to enhance dielectric properties of noncovalent functionalized graphene/poly (vinylidene fluoride) composites. Carbon, 141: 728-738

Liu J, Cui L, Losic D 2013. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. Acta Biomaterialia, 9: 9243-9257

Mittal G, Dhand V, Rhee KY, Park SJ, Lee WR 2015. A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 21: 11-25

Mousavi MR, Rafizadeh M, Sharif F 2016. Effect of electrospinning on the ionic conductivity of polyacrylonitrile/polymethyl methacrylate nanofibrous membranes: optimization based on the response surface method. Iran Polymer Journal, 25: 525-537

Nasouri K, Shoushtari AM 2017. Designing, modeling and manufacturing of lightweight carbon nanotubes/polymer composite nanofibers for electromagnetic interference shielding application. Composite Science and Technology, 145: 46-54

Rzaev ZMO, Dincer S, Koseli V, Kesim H, Piskin E 2002. Radical copolymerization of N-isopropylacrylamide with anhydrides of maleic and citraconic acids. European Polymer Journal, 38: 2143-2152

Stoller M, Park S, Zhu Y, An J, Ruoff R 2008. Graphene-based ultracapacitors. Nano Letters, 8: 3498-3502

Wang Q, Zhu L 2011. Polymer nanocomposites for electrical energy storage. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 49: 1421-1429

Wu H, Huang X, Qian L 2018. Preparation, mechanism and property of metacomposites with carbon materials as fillers. Engineering Science, 2: 17-25

## PLA/bazalt ve PP/bazalt kompozitlerin performans özelliklerinin incelenmesi

Mahmut Ali Ermeydan<sup>1\*</sup>, Onur Aykanat<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, Bursa, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Biyokompozit Mühendisliği ABD, Bursa, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: Mahmut Ali Ermeydan, mahmut.ermeydan@btu.edu.tr

### Özet

Bazalt lifi çevre dostu, yüksek performanslı inorganik bir malzemedir. Ülkemizde yoğun olarak bulunan bazalt taşından elde edilebilir ve termal özellikleri, dayanımı onu öne çıkaran özellikleridir. Bu çalışmada aynı ağırlık oranlarında bazalt lifi (%75 polimer - %25 bazalt lifi) ile, biyobozunurluk özelliğiyle dikkat çeken polilaktik asit (PLA) ve mekanik özellikleriyle öne çıkan polipropilen (PP) polimerleri kompozit yapmak üzere kullanılmıştır. Kompozitler, çift vidalı ekstrüder ile üretilmiştir. Kompozitlerin gösterdiği mekanik özellikleri incelemek için çekme ve eğilme testleri yapılmıştır. Kompozitlerin kimyasal özellikleri için FTIR spektroskopisi, termal özellikleri için TGA analizi yapılmıştır. Bazalt lifinin yoğunluğu, kullanılan polimerlerden yüksek olduğu için üretilen kompozitlerin yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir. Üretilen kompozitlerde çekme ve eğilme modülü değerlerinde artış elde edilmiştir. Bazalt lifinin PLA matrisiyle olan uyumluluğunun, PP matrise göre daha az olduğu, bu yüzden çekme ve eğilme dayanımındaki olumsuz etkinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** PLA, PP, bazalt lifi, kompozit, mekanik özellikler, termal özellikler

### Investigation of performance properties of PLA/Basalt and PP/Basalt composites

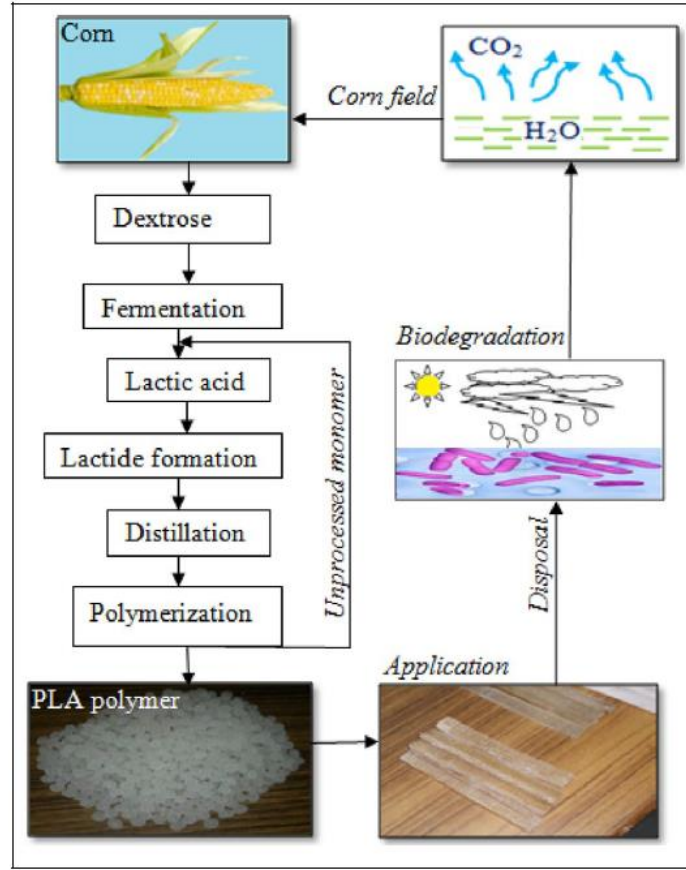
#### Abstract

Basalt fiber is an environmentally friendly, high performance inorganic material. It can be obtained from the basalt stone which is densely found in our country and its thermal properties and its strength are the features that make it favourable. In this study, the same weight ratios of basalt fiber (75% polymer - 25% basalt fiber) was used to make composites with polylactic acid (PLA) which is notable for its biodegradability, and polypropylene (PP) which are prominent with its mechanical properties. Composites were produced with twin screw extruder. Tensile and bending tests were performed to examine the mechanical properties of the composites. FTIR spectroscopy were revealed the chemical insights and TGA analysis was used to obtain thermal properties of composites. As the density of the basalt fiber was higher than the polymers used, it was observed that the density of the composites were increased. The tensile and flexural modulus values of the novel composites were increased. It has been observed that basalt fiber has less compatibility to PLA matrix which results more negative effects on tensile and bending strength than PP matrix composites.

**Keywords:** PLA, PP, basalt fiber, composite, mechanical properties, thermal properties.

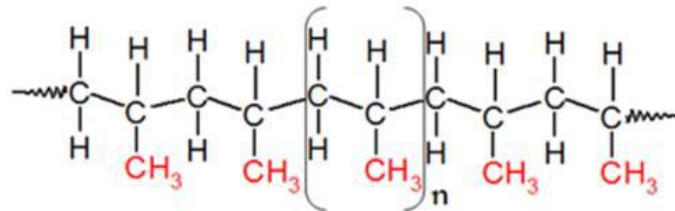
### 1. GİRİŞ

Plastiklerin geri-dönüşüm problemleri ve çevresel etkileri düşünüldüğünde, alternatif olma açısından en umut verici biyopolimerlerden biri, nişasta ve şekerin laktik aside fermantasyonu ve laktik asidin polikondenzasyonu ile üretilen polilaktik asittir (PLA) (Şekil 1) (Drumright ve ark., 2000; Kumar ve ark., 2012). Nişastanın tüm dünyada mısır, buğday, pirinç, patates gibi tarımsal bitkilerde yüksek miktarlarda bulunabilmesi nedeniyle, PLA'nın biyokütlenin ilk yaygın kullanılan öncüsü olabileceği kolayca görülebilmektedir (Gross, 2002). PLA, termoplastik bir malzemedir, bu nedenle enjeksiyon kalıplama, ekstrüzyon, termoform, sıkıştırma veya şişirme gibi geleneksel termoplastik işleme ekipmanları kullanılarak işlenebilir. Aynı zamanda iyi mekanik özelliklere, 60 MPa'lık çekme dayanımına, 3 GPa'lık çekme modülüne sahiptir (Yu ve Dean, 2006).



Şekil 1. PLA sentezi ve yaşam döngüsü (Kumar ve ark., 2012)

Diğer yandan polipropilen, emtia plastikleri arasında en düşük yoğunluğa sahip olması nedeniyle çok hızlı bir şekilde popülerlik kazandı. PP kimyasal yapısı sebebiyle (Şekil 2) mükemmel bir kimyasal dirence sahiptir ve enjeksiyonla kalıplama, ekstrüzyon gibi birçok dönüştürme yöntemiyle işlenebilir. PP'nin klinik ortamlarda kullanımının uygun olması yüksek ısıl direnci ile ilgilidir. Polipropilen, 0,90 g/cm<sup>3</sup> yoğunluğa sahip hafif bir polimer olup, otomotiv sektörü gibi birçok endüstriyel uygulamada uygun olmasını sağlar (Moritomi ve ark., 2010). Nispeten sert ve yüksek bir erime noktasına, düşük yoğunluğa ve darbelere karşı nispeten iyi bir dirence sahiptir (Maddah, 2016).



Şekil 2. Polipropilen kimyasal yapısı (Maddah, 2016)

Plastik takviye malzemesi dendiğinde akla ilk gelen cam elyafa alternatif olan ve son dönemde yaygınlığı artan bazalt lifleri, bazalt mineralinin liflendirilmesiyle üretilmektedir. Bazalt ayrıca doğal olarak kabul edilir, çünkü erimiş lavların katılaşmasıyla üretilir. Bazalt kayalar eritilerek, sürekli (spinneret methodu) veya kısa (Junkers methodu) bazalt elyaf üretilebilir (Gur'ev ve ark., 2001). Bazalt lifleri, cam elyafa benzer bir yapıya sahiptir ve kompozit ürünlerde takviye olarak kullanılmak üzere yüzeyleri kolayca değiştirilebilir (Deak ve ark., 2010). Bazalt elyaf gürültü azaltma özellikleri ve yüksek ısıl direnç gibi pozitif performans özellikleri göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, yüksek ısıl direnç gerektiren uygulamalarda kullanılabilir. Ayrıca, bazalt lifleri yüksek mekanik özellik gösterir ve cam lifine kıyasla düşük maliyetlidir (Kogan ve Nikitina, 1994).

Bu çalışmada, bazalt lifi takviyeli PLA ve PP kompozitleri üretilmiş, mekanik özellikleri başta olmak üzere, termogravimetrik özellikleri ve kimyasal yapıları incelenmiştir. Çalışma sonucunda işlem görmemiş bazalt

liflerinin PP ile olan yüzey uyumunun PLA'ya kıyasla daha iyi olduğu anlaşılmıştır. Her iki kompozitin de çekme ve eğilme dayanımlarının küçük bir miktar düştüğü ancak modüllerinin kayda değer oranda arttığı anlaşılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Malzemeler

Kompozitlerin üretilmesi çift vidalı ekstrüder yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan erime sıcaklığı 180°C olan PLA Kumru Kimya'dan, polipropilen Petkim'den ve elyaf çapı 9-23 mikron arası olan işlem görmemiş bazalt lifleri Dost Kimya'dan temin edilmiştir.

### 2.2 Kompozitlerin hazırlanması

Polimerler ve bazalt lifleri öncelikle Fritsch pulverisette 19 markalı öğütücü kullanılarak 0,5 mm boyutuna getirildi. Öğütme işleminden sonra mekanik karıştırıcı cihazında 600 rpm'de 5 dakika bekletilerek ağırlık oranları %25 bazalt - %75 polimer olacak şekilde PLA+BL (PB25) ve PP+BL (PPB25) karışımlar elde edildi. Elde edilen bu karışımlar 100°C sıcaklıkta 24 saat etüvde bekletildi. Daha sonra kompozitler Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilen sıcaklık değerlerinde 40 L/D Gülnar Makina çift vidalı ekstrüder ile üretildi. Ekstrüderden geçirilen malzemeler, kırıcı vasıtasıyla ufak parçalara ayrıldıktan sonra, Carver ısıtmalı-soğutmali preste 190°C sıcaklık ve 0.24 MPa basınç 5 dakika boyunca uygulanarak 20x20 cm boyutunda düz levha şeklinde kompozitler üretildi. Daha sonra Kaya Grup KG-960 lazer kesim cihazıyla çekme ve eğilme test numunelerinin boyutlarında kesildi.

**Tablo 1.** PLA'nın ekstrüder sıcaklıkları

Kafa	7	6	5	4	3	2	1	Besleme
170°C	175°C	180°C	180°C	180°C	180°C	175°C	165°C	25°C

**Tablo 2.** PP'nin ekstrüder sıcaklıkları

Kafa	7	6	5	4	3	2	1	Besleme
190°C	195°C	200°C	200°C	200°C	200°C	195°C	90°C	25°C

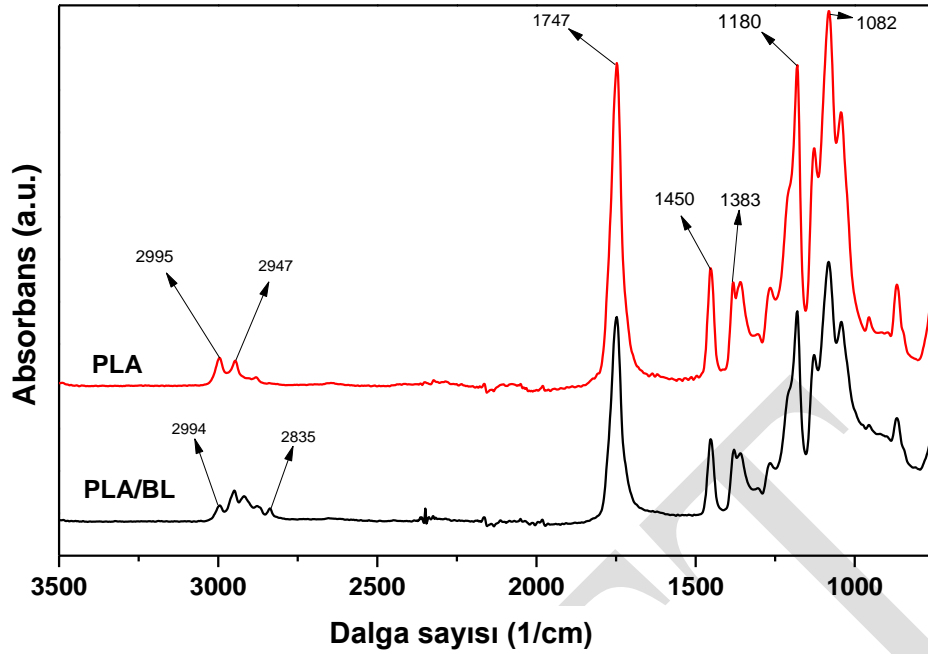
### 2.3 Uygulanan Testler

Numuneler mekanik testler yapılmadan önce %50 nem, 23°C sıcaklıkta 48 saat bekletildi. Üretilen kompozitlere çekme testi ASTM D-638 standardına göre 3mm/dk test hızında uygulandı. Eğilme dayanımı testi 10mm/dk test hızında ASTM D-790 standardına göre uygulandı. Kompozitlerin kimyasal yapısını incelemek için FT-IR spektroskopisi yapıldı. FT-IR spektrumları için universal ATR detektörü olan Bruker marka cihaz kullanıldı. Ölçümler 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> dalga boyları arasında 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte yapıldı. Kompozitlerin termal kararlılığını belirlemek için TGA analizi yapıldı. TGA analizleri 30-800°C sıcaklıklarında 10°C/dk ısıtma hızında gerçekleştirildi.

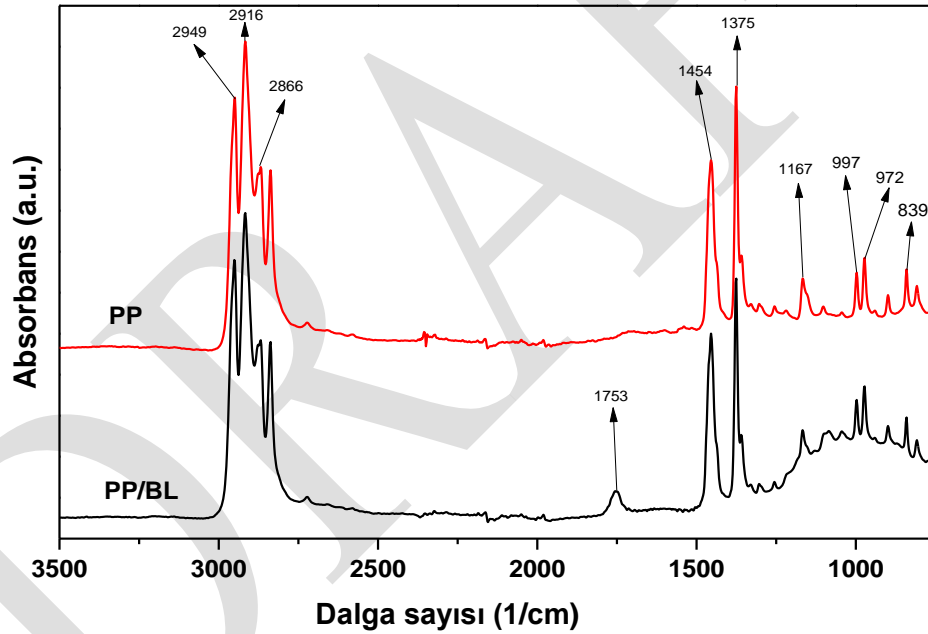
## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1 FTIR Spektroskopisine ait Bulgular

Şekil 3'e göre saf PLA'daki 1747, 2995, 2947 ve 1082 cm<sup>-1</sup> bandlarında sırasıyla C=O, -CH<sub>3</sub> asimetrik, -CH<sub>3</sub> simetrik ve C-O bağlarına ait titreşimler görülmektedir. 1450 cm<sup>-1</sup> bandında -CH<sub>3</sub> asimetrik ve 1383 cm<sup>-1</sup> bandında -CH<sub>3</sub> simetrik gerilim titreşimleri görülmektedir (Chieng ve ark., 2013). PLA/BL kompozitinde saf PLA'dan farklı olarak 2994 cm<sup>-1</sup> ve 2835 cm<sup>-1</sup> bandında karakteristik metilenden gelen -CH gerilim bandı, -CH<sub>2</sub> ve -CH<sub>3</sub> gruplarının titreşimleri gözlemlenmektedir. Bu bandlar, cam ve bazalt fiberlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan organik karakterli malzemelerden sağlanmaktadır (Iorio ve ark., 2018).



Şekil 3. PLA ve PLA/BL kompozitinin FTIR spektrasi



Şekil 4. PP ve PP/BL FTIR spektrasi

Diğer yandan Şekil 4'te polipropilene ve PP/bazalt lifi kompozitine ait FTIR spektrasi gösterilmiştir. Buna göre 2949, 2916, 2866  $\text{cm}^{-1}$  bandlarında -CH gerilimi, 1454  $\text{cm}^{-1}$  bandında  $\text{CH}_2$  gerilimi, 1375  $\text{cm}^{-1}$  simetrik  $\text{CH}_3$  ve 1167, 997, 972, 839  $\text{cm}^{-1}$  aralığında izotaktik polipropilen bandı gözlemlenmektedir. PP/BL kompozitinde saf PP'den farklı olarak gözlemlenen 1753  $\text{cm}^{-1}$  bandı bazalt lifinden kaynaklı karbonil (C=O) gerilme titreşimini göstermektedir (Noda ve ark., 2007).

### 3.2 Mekanik Testlere ait Bulgular

**Tablo 3.** PLA/BL ve PP/BL kompozitlerin mekanik özellikleri

Numune adı	Çekme dayanımı (Mpa)	Çekme modülü (MPa)	Gerinim (%)	Eğilme dayanımı (MPa)	Eğilme modülü (MPa)
PLA	40,95 (3,44)*	2111,17 (100,20)	2,91 (0,17)	62,17 (8,83)	3096,47 (230,60)
PB25	24,29 (3,52)	2372,13 (191,88)	1,63 (0,22)	52,66 (5,99)	3257,74 (174,79)
PP	26,79 (1,47)	1006,53 (82,17)	6,67 (0,83)	52,99 (6,97)	1665,88 (212,22)
PPB25	22,68 (1,81)	1230,56 (157,23)	4,27 (0,69)	50,24 (4,61)	1802,85 (232,22)

\*Parantez içindeki değerler standart sapmayı göstermektedir.

PB25 kompozitinin çekme ve eğilme dayanımı saf PLA'ya göre düşük olduğu gözlemlenmektedir. Ancak çekme modülünün 2111,17 MPa'dan 2372,125 MPa değerine yükselmiştir. Eğilme modülü ise 3096,47 MPa'dan 3257,74 MPa değerine yükseldiği gözlemlenmektedir. PPB25 kompozitinde ise çekme ve eğilme dayanımı saf PP'ye göre düşük olmasına rağmen yakın değerler göstermektedir. Çekme modülü ise 1006,526 MPa'dan 1230,562 MPa yükselmiştir. Eğilme modülü ise 1665,88 MPa'dan 1802,85 MPa değerine artış göstermiştir.

Diğer yandan Tablo 4'te verildiğine göre PB25 ve PPB25 kompozitleri bazalt takviye malzemesi ihtiva ettikleri için yoğunluklarında artış gözlemlenmiştir.

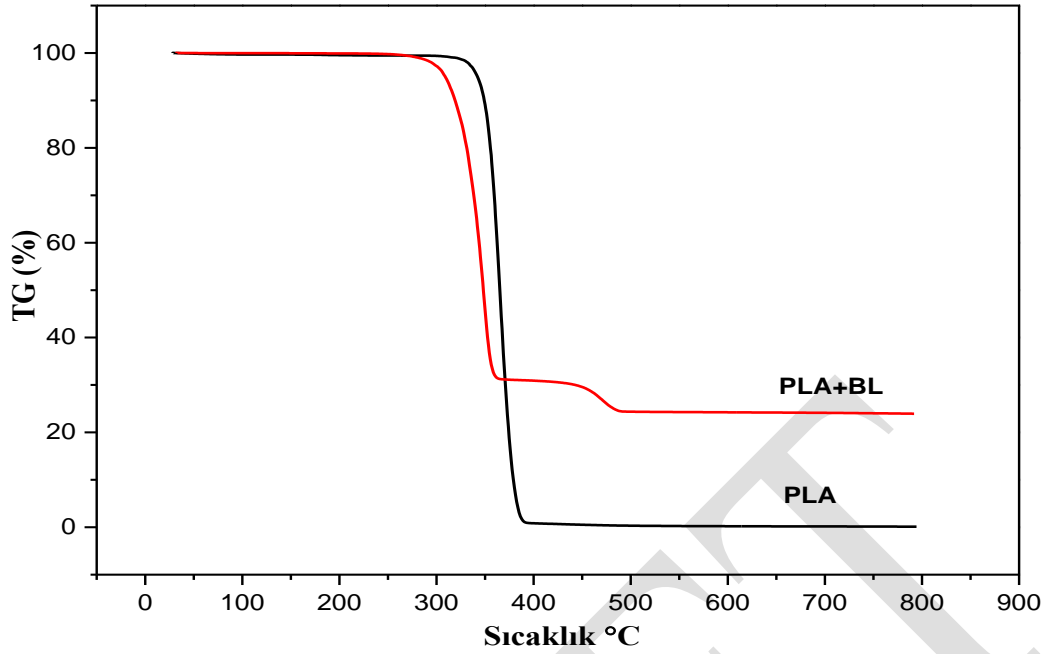
**Tablo 4.** Yoğunluk ve katkı oranları

Numune	Katkı oranı (%)	Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )
PLA	0	1,21 (0,01)
PLA + Bazalt (PB25)	25	1,23(0,01)
PP	0	0,86(0,01)
PP + Bazalt (PPB25)	25	0,98(0,03)

### 3.3 TGA Analizlerine Ait Bulgular

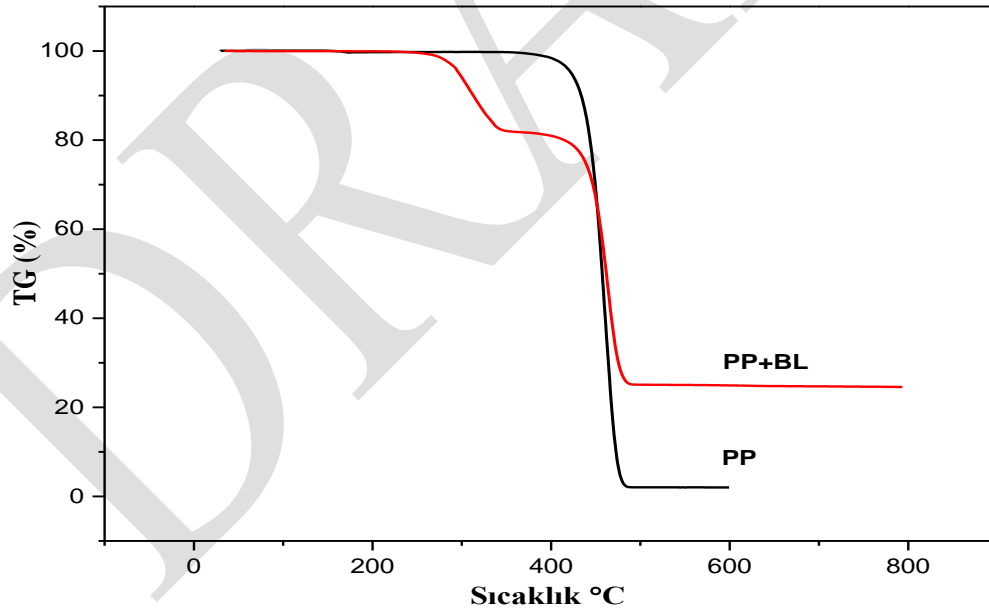
Şekil 5'e göre saf PLA kütle kaybına 305 °C'de başlamaktadır. PLA/BL kompozitinde bu sıcaklık 257 °C'dir. Saf PLA 347 °C'de ayrışmaya başlamış ve 395 °C'de tamamen kütle kaybına uğramıştır. PLA/BL kompoziti 316 °C'de ayrışmaya başlamıştır ve 495 °C'de %25 kütle kadar düşmüştür ve bu oranda kütle kaybı sonlanmıştır. Sonda kalan %25'lik orandaki kalıntı takviye malzemesi olan bazalttır. Bazalt çok yüksek sıcaklıklara dayanabilen inorganik bir malzeme olduğu için saf PLA'dan farklı olarak tamamen kütle kaybına uğramamıştır (Cheng ve ark., 2009).





Şekil 5. PLA+BL TGA grafiği

Şekil 6'ya göre işlem görmemiş PP 346 °C'de kütle kaybına başlamaktadır ve 436 °C'de ayrışmaya başlamıştır. PP/BL kompozitinde ise 249 °C'de bozunmaya başlamış ve 430 °C'de ayrışmaya başlamıştır. Kütle kaybı işlem görmemiş PP'de 490 °C sıcaklıkta sonlanmıştır. PP/BL kompozitinde ise 497 °C sıcaklıkta %25 kütle oranında bozunma sonlanmıştır.



Şekil 6. PP+BL TGA grafiği

## SONUÇ

Sonuç olarak PLA ve PP polimerlerine takviye edici olarak öğütülmüş bazalt lifi %25 oranında eklenmiş ve kompozit malzeme üretilmiştir. Üretilen PB25 ve PPB25 kompozitlerinde çekme ve eğilme modüllerinde kayda değer artış gözlemlenmiştir. FTIR analizlerinde bazalt liflerine ait karakteristik gerilimler gözlemlenmiştir. Bazalt takviye malzemesi kompozitlerin yoğunluklarını arttırmıştır. TGA analizlerinde kütle kaybının bitmesinin ardından kalan malzemenin bazalt olduğu gözlemlenmiştir. Bazalt katkı malzemesinin PP ile daha uyumlu olduğu anlaşılmakta olup, PP ve PLA gibi plastiklerin maliyetinin bazalt katkısıyla ile ucuzlatılabileceği düşünülmektedir. Mekanik özelliklerdeki kayıplarında uyumlaştıran yardımıyla giderileceği bilinmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 1180152 nolu TÜBİTAK projesi ile desteklenmektedir.

## KAYNAKLAR

- Cheng S, Lau K, Liu T, Zhao Y, Lam P, Yin Y 2009. Mechanical and thermal properties of chicken feather fiber/PLA green composites. *Composites: Part B*, 40: 650-654.
- Chieng B, Ibrahim N, Yunus W, Hussein M 2013. Effects of graphene nanoplatelets on poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites. *Polymers*, 6(1): 93-104.
- Deak T, Czigan T, Tamas P, Nemeth CS 2010. Enhancement of interfacial properties of basalt fiber reinforced nylon 6 matrix composites with silane coupling agents. *Express Polymer Letters*, 4: 590-598.
- Drumright RE, Gruber PR, Henton DE 2000. Polylactic acid technology. *Advanced Materials*, 12(23): 1841-1846.
- Gross RA 2002. Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, 297(5582): 803-807.
- Gur'ev V, Neproshin E, Mostovoi G 2001. The effect of basalt fiber production technology on mechanical properties of fiber. *Glass and Ceramics*, 58: 62-65.
- Iorio M, Santarelli M, Gonzalez-Gaitano G, Gonzalez-Benito J 2018. Surface modification and characterization of basalt fibers as potential reinforcement of concretes. *Applied Surface Science*, 427: 1248-1256.
- Kogan M, Nikitina O 1994. Solubility of Chrysotile Asbestos and Basalt Fibers in Relation to Their Fibrogenic and Carcinogenic Action. *Environment Health Perspective*, 102: 205.
- Kumar P, Inderdeep S, Jitendra M 2012. Development and characterization of PLA-based green composites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 27(1): 52-81.
- Long Y, Katherine D, Lin L 2006. Polymer blends and composites from renewable resources. *Progress in Polymer Science*, 31(6): 576-602.
- Maddah H 2016. Polypropylene as a Promising Plastic. *American Journal of Polymer Science*, 6(1): 1-11.
- Mofokeng J, Luyt AS, Tábi T, Kovacs J 2012. Comparison of injection moulded, natural fibre reinforced composites with PP and PLA as matrices. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 25:927-948.
- Moritomi S, Watanabe T, Kanzaki S 2010. Polypropylene compounds for automotive applications. *Sumitomo Kagaku*, 1(1): 1-16.
- Noda I, Dowrey AE, Haynes JL, Marcott C 2007. Group Frequency Assignments for Major Infrared Bands Observed in Common Synthetic Polymers. In: Mark J.E. (eds) *Physical Properties of Polymers Handbook*. Springer, New York, NY.

## A Case Study for Determination of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae Fauna of Lakes Eber (Afyonkarahisar) and Cernek (Samsun), Turkey

Naime Arslan<sup>1</sup>, Deniz Mercan<sup>1\*</sup>

<sup>\*1</sup> Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Art and Sciences, Department of Biology, Eskişehir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: oligo2009@gmail.com

### Abstract

There are above 200 natural lakes in Turkey. Properties of Turkey's lakes like their geographical status, stories of their historical developments, their connections with fresh waters and marine waters in world make them valuable according to biological diversity and endemism. Lakes Eber located in Afyonkarahisar and Cernek located in Samsun are listed in Turkey's important lakes in terms of ecologically. Within this study, zoobenthic samples were collected for determining Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of both lakes between 2012 and 2014 years, and also some environmental parameters (pH, temperature, dissolved oxygen and depth) were measured *in situ*.

According to our results, totally 11 species from Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae were identified in Lake Eber. Abundance of *Physella acuta* from Gastropoda increased in 2012 year. Individuals of *Radix labiata* which were determined in 2012 year were not detected in 2014 year. Similarly, while populations of *Limnodrilus hoffmeisteri*, partially *Potamothrix hammoniensis* (Oligochaeta) and *Cryptochironomus defectus* (Chironomidae) species which are typical tolerant species of polluted waters increased, populations of *Polypedilum aberrans*, *Polypedilum convictum* and *Dicortendipes tritonus* seriously decreased.

In Lake Cernek, abundance of *Physella acuta* which has high ecological tolerance increased last 2 years. Similar situation was observed in tolerant Oligochaeta (*Limnodrilus hoffmeisteri*, *Tubifex tubifex* and partially *Potamothrix hammoniensis*) and Chironomidae (*Chironomus thummi*) species. In addition, individuals of *Tanytus punctipennis* which is carnivore species and *Psammoryctides albicola* which has narrow ecological tolerance were detected before in the Lake but they were not detected in sampling in 2014 year.

Consequently, species diversities of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae in Lakes Eber and Cernek are not very high and comprised of  $\alpha$ - $\beta$  mesosaprobic and polysaprobic species.

**Keywords:** Lakes Eber and Cernek, Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae.

### INTRODUCTION

Turkey has three different types of bioclimate and three biogeographical zones which are Euro-Siberian, Mediterranean and Irano-Turanian. Turkey has 200 natural lakes, 33 rivers, 750 artificial lakes and 159 dam reservoirs. With its lakes and rivers covering an area of about 10000 km<sup>2</sup>, Turkey has very important inland water resources to maintain biological diversity (Republic of Turkey Ministry of Environment and Forestry, 2009).

As an important component of aquatic biodiversity, the macroinvertebrates are being used to evaluate in fresh water quality assessment (Guareschi et al., 2012; Balachandran and Ramachandra, 2010). Macrozoobenthos is defined as invertebrate bottom fauna living in, or on bottom and the big part of their life cycle is depended on bottom substrates of water bodies (Graaf et al., 2009; Bouchard, 2004). They are important in water-sediment interactions; the abundance and presence of benthos indicates normal limnological conditions of the water bodies (Habib et al., 1984; Nupur et al. 2013). Macrobenthic animals live in very different habitats that are influenced by eutrophication, pollution, fisheries, removal of substrate and dumping of substrate (Graaf et al., 2009). The zoobenthic communities of many lentic systems are represented by three major groups: chironomid larvae Gastropoda and oligochaetes. Chironomids which are larval forms of insects live in bottom of water bodies in a part of their life cycle while freshwater oligochaetes and gastropods spend whole their life cycle on the bottom. Certain species of Chironomidae, Gastropoda and Oligochaeta are considered as promising indicator of water quality because of their abundance and ubiquity in aquatic ecosystems (Bouchard, 2004).

This study was carried out for determination of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of Lakes Eber and Cernek which are located in different regions of Turkey September 2012 and July 2014 years. And also we were evaluated the situation of lakes in terms of pollution with the measured some environmental parameters and identified macroinvertebrates.

## MATERIALS and METHODS

### Study Areas

Lake Eber located in the central part of Anatolia is a small, shallow tectonic lake and it is surrounded by Sultan Mountains from the north and Emir Mountains from the south (Atalay 1977; Köle et al. 2016). Lake Eber is the biggest lake in the Akarçay River Basin after drying of Lake Akşehir. Akarçay River is also the main influent into the lake (Mangıt et al., 2017).

Lake Cernek located at the sea level in the Kızılırmak Delta in the Northern Turkey is a typical lagoon lake which is separated from Black Sea by dune barrier. Maximum depth of the lake is 1.95 meters and the surface area is 370 hectares. The water of lake is slightly saline (average 0.75-1.28 ppt) and the lake is also non-stratified because of continuous mixtures. Natural channels that connect Lake Cernek to Lake Balık and other small temporal marshes are established in rainy seasons (Demirkalp, 2007).

### Sampling Procedures and Laboratory Studies

Macrozoobenthic samples were collected with Ekman-Birge grab (15x15 cm) in Lakes Eber and Çernek (September 2012 and July 2014 years, Figure 1). Samples were washed through on sieve series (2 mm, 1 mm and 0.5 mm mesh net sieves, respectively). After sieving, bottom material were fixed with 70% ethanol and transferred to laboratory. In the laboratory, zoobenthic samples were sorted from bottom material under the stereo microscope and Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae groups were identified at the level of species by using different identification keys. Brinkhurst (1971), Kathman and Brinkhurst (1998), Timm (1999) and Wetzel et al. (2000) were used in identification of Oligochaeta taxa, Şahin (1984, 1991), Moller Pillot (1979, 2013) were used in identification of Chironomidae taxa and Zhadin (1965), Bilgin (1980) and Glöer (2002) were used in identification of Gastropoda taxa.

And also some environmental parameters (pH, temperature, dissolved oxygen and depth) were measured at the time when benthic samples was taken by using Hach-Lange HQ40D *in situ*.

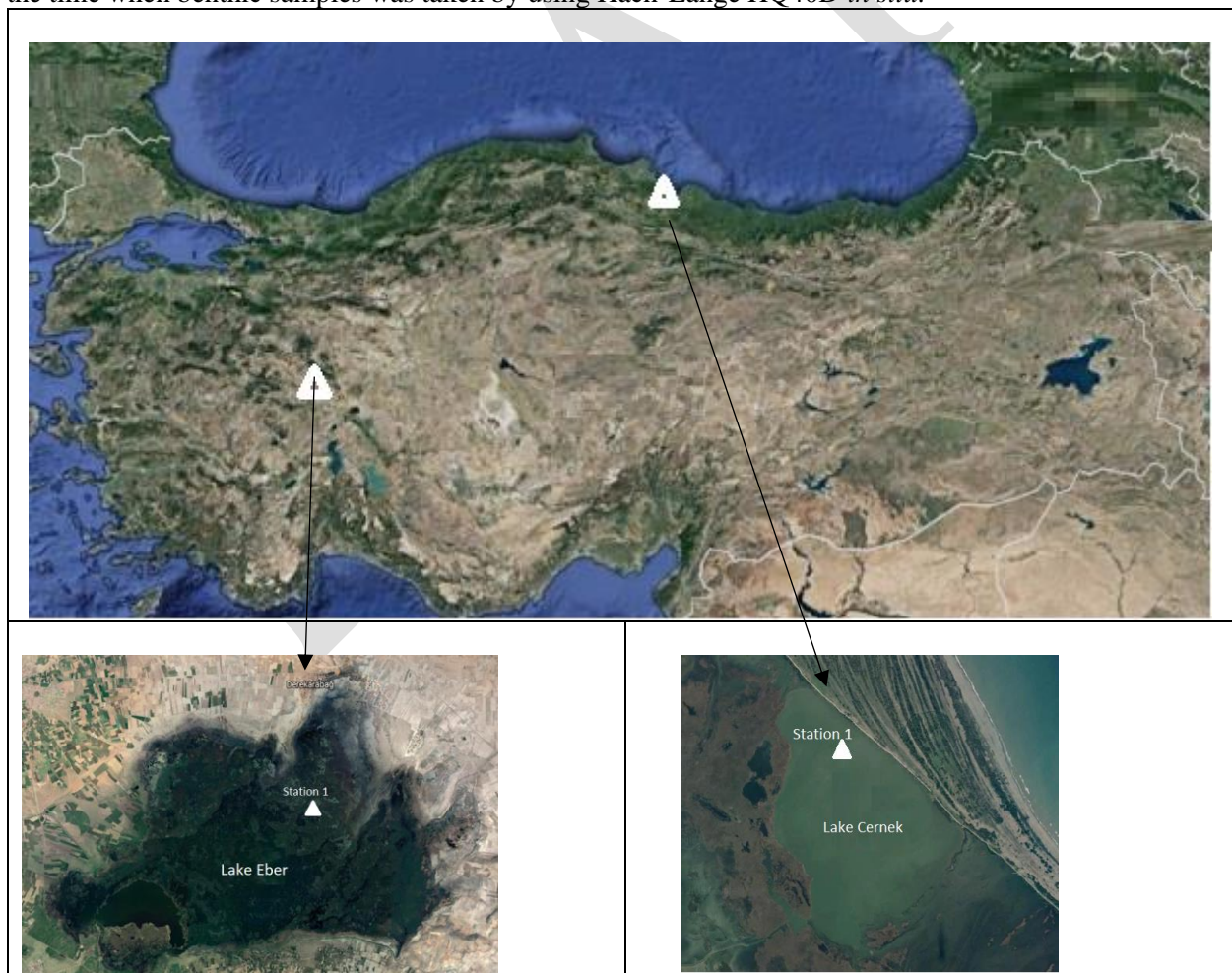


Figure 1. Geographical locations and sampling stations of Lakes Eber and Cernek

## RESULTS and DISCUSSION

In the present study in Lake Eber, the results of identified Gastropoda, Chironomidae and Gastropoda species in 2012 and 2014 years were listed in Table 1. As a results of the study in Lake Eber, *Physella acuta*, *Radix labiata* and *Lymnaea stagnalis* from Gastropoda, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Potamothenis hammoniensis* and *Psammoryctides albicola* from Oligochaeta and *Cryptochironomus defectus*, *Polypedilum aberrans*, *Polypedilum convictum* and *Dicrotendipes tritonus* from Chironomidae were identified in 2012 year. In 2014 year, the species of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae were not changed much. Individuals of *Radix labiata* which were determined in 2012 year were not detected in 2014 year. And individuals of *Bithynia* sp. which were not detected in 2012 were identified in 2014 (Table 1). A total of 11 species containing 4 species of Gastropoda, 3 species of Oligochaeta and 4 species of Chironomidae were identified in Lake Eber. Dominancy of *Physella acuta* from Gastropoda increased from 1.85 D% in 2012 to 6.36 D% in 2014. Similarly, while populations of *Limnodrilus hoffmeisteri*, partially *Potamothenis hammoniensis* and *Cryptochironomus defectus* species which are typical tolerant species of polluted waters increased, populations of *Polypedilum aberrans*, *Polypedilum convictum* and *Dicrotendipes tritonus* seriously decreased. Changes in the fauna structure tend to typical species of meso-polysaprobic zones.

**Table 1.** Dominancy values of identified species of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae in Lakes Eber and Cernek in 2012 and 2014 years and values of some environmental parameters and indices.

	Lake Eber		Lake Cernek	
	2012 year	2014 year	2012 year	2014 year
	D%	D%	D%	D%
<b>Environmental Parameters</b>				
pH	8.52	9.86	8.26	8.96
Temperature (°C)	19.5	25.43	16.30	18.70
Dissolved oxygen (mg/L)	6.54	4.18	8.21	7.16
Depth (m)	1.26	1.13	1.25	1.67
<b>Index</b>				
Taxa	9	8	11	9
Individuals	266	366	148	139
Shannon	1.72	1.06	1.67	1.80
Evenness	0.78	0.51	0.70	0.82
<b>Taxa</b>				
<b>Gastropoda</b>				
<i>Physella acuta</i> (Draparnaud, 1805)	1.85	6.36	2.70	6.47
<i>Radix labiata</i> (Rossmässler, 1835)	3.32	0.00	0.00	0.00
<i>Bithynia</i> sp.	0.00	1.53	0.00	0.00
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	1.48	2.80	0.00	0.00
<b>Oligochaeta</b>				
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparède, 1862	12.92	12.47	3.38	5.76
<i>Potamothenis hammoniensis</i> (Michaelsen, 1901)	2.95	6.36	2.70	6.47
<i>Potamothenis bedoti</i> (Piguet, 1913)	0.00	0.00	3.38	7.91
<i>Psammoryctides albicola</i> (Michaelsen, 1901)	16.61	3.05	3.38	0.00
<i>Tubifex tubifex</i> (Müller, 1774)	0.00	0.00	1.35	2.88
<i>Nais communis</i> Piguet, 1906	0.00	0.00	8.11	2.88
<b>Chironomidae</b>				
<i>Tanypus punctipennis</i> Meigen, 1818	0.00	0.00	5.41	0.00
<i>Cryptochironomus defectus</i> (Kieffer, 1913)	42.07	65.39	0.00	0.00
<i>Polypedilum aberrans</i> Chernovskij, 1949	4.43	0.51	6.08	10.07
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker, 1856)	10.33	0.76	0.00	0.00
<i>Dicrotendipes tritonus</i> (Kieffer, 1916)	4.06	0.76	0.00	0.00
<i>Chironomus thummi</i> (Kieffer, 1916)	0.00	0.00	8.78	14.39
<i>Tanytarsus gregarius</i> Kieffer, 1909	0.00	0.00	54.73	43.17

According to results in Lake Cernek, *Physella acuta* from Gastropoda, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Potamothenix bedoti*, *Potamothenix hammoniensis*, *Tubifex tubifex*, *Nais communis* and *Psammoryctides albicola* from Oligochaeta and *Tanypus punctipennis*, *Chironomus thummi*, *Polypedilum aberrans* and *Tanytarsus gregarius* from Chironomidae were identified in 2012 year. Totally 11 species consisting of 1 species from Gastropoda, 6 species from Oligochaeta and 4 species from Chironomidae were determined in 2012 and 2014 years (Table 1). Dominancy of *Physella acuta* which has high ecological tolerance increased last 2 years from 2.70 D% in 2012 to 9.00 D% in 2014. *Tanytarsus gregarius* is dominant species in the lake both 2012 and 2014 years with dominancy values of 54.73 and 43.17, respectively. Their substratum preference is mud, sand, algae and floral detritus (Özkan et al., 2010). Dominancy values of euryök Oligochaeta (*Limnodrilus hoffmeisteri*, *Tubifex tubifex* and partially *Potamothenix hammoniensis*) and Chironomidae (*Chironomus thummi*) species increased from 2012 year to 2014 year. In addition, individuals of *Tanypus punctipennis* which is carnivore species and *Psammoryctides albicola* which has narrow ecological tolerance were detected before (in 2012 year) in the Lake but they were not determined in 2014 year (Table 1).

## CONCLUSION

Our results indicate that the species diversities of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae of Lakes Eber and Cernek are not high. Especially, Gastropoda species is limited one species in Lake Cernek. The lake is one of the most important wetlands in Kızılırmak Delta, many studies indicated that the lake has a serious eutrophication potential because of its hypertrophic capacity (Taş and Gonulol, 2007; Cüce and Bakan, 2017). Yıldız et al. were carried a study in some lagoons contained Lake Cernek for determination of Oligochaeta fauna. They identified species of *Tubifex tubifex*, *Potamothenix hammoniensis*, *Potamothenix bavaricus* and *Potamothenix bedoti* in Lake Cernek (Yıldız et al., 2007). And also Arslan and Mercan (2018) were studied 3 different stations in Lake Cernek in 2013 year and they identified *Nais communis*, *Nais elinguis*, *Nais pardalis*, *Nais barbata*, *Stylaria lacustris*, *Tubifex tubifex*, *Psammoryctides albicola*, *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Potamothenix hammoniensis* from Oligochaeta in the lake. And the dominant species were determined as *P. hammoniensis* in their study. In present study, we identified only 6 species of Oligochaeta and these are pollutant tolerant species. Öktener was carried out a study about mollusca species of some freshwaters of Sinop and Bafra in 2004 year. The author was identified 7 gastropod species as *Theodoxus fluviatilis*, *Viviparus viviparus costae*, *Stagnicola palustris*, *Radix auricularia*, *Radix peregra*, *Physa acuta* and *Physa fontinalis* (Öktener, 2004). After ten years, we determined only one species from Gastropoda which is *Physella acuta*. This tolerant species can survive well under temporary hard conditions (water pollution and extreme temperature), as long as they are short lived (Wethington, 2004). From Chironomidae in Lake Cernek, samples of *Tanypus punctipennis* which is carnivore species and *Psammoryctides albicola* which has narrow ecological tolerance were detected in the Lake in 2012 year but they were not determined in 2014 year. Dominancy value of *Chironomus thummi* increased during our study period from 8.78 D% to 14.39 D%. The larvae of the chironomid *Chironomus thummi* had a greater resistance to the contaminated sediment. It can live easily in polluted area or fresh waters having high nutrient and low dissolved oxygen. Because the species can tolerate or adapt itself to slight contamination quickly (Bat and Akbulut, 2001; Epler, 1995). The increases of meso and polysaprobic species can be related to getting worse environmental conditions.

In Lake Eber, we identified totally 11 species from Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae taxa. Yıldız and Balık were carried out a study in 1999-2000 years in Lake District including Lake Eber and determined Oligochaeta fauna. They identified 4 Oligochaeta as *Tubifex tubifex*, *Potamothenix hammoniensis*, *Potamothenix bedoti* and *Stylaria lacustris* in Lake Eber (Yıldız and Balık, 2005). In the present study, we only identified 3 Oligochaeta species which are *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Potamothenix hammoniensis* and *Psammoryctides albicola*. As can be seen in the results, the Oligochaeta species fauna of Lake Eber is quite low. These species are commonly collected from eutrophic lakes (Brinkhurst and Jamieson, 1971; Milbrink, 1980). Dominancy of *Physella acuta* from Gastropoda increased in 2012 year. Individuals of *Radix labiata* which were determined in 2012 year were not detected in 2014 year. Population densities of *Physella acuta* from Gastropoda, *Limnodrilus hoffmeisteri* from Oligochaeta and *Cryptochironomus defectus* from Chironomidae increased. This variation can be related to negative changing of lake water variables. These species are known to occur mostly in polluted waters (Brinkhurst and Jamieson, 1971; Mason, 1996). While populations of *Limnodrilus hoffmeisteri*, partially *Potamothenix hammoniensis* and *Cryptochironomus defectus* species which are typical euryök species of pollution waters increased, populations of *Polypedilum aberrans*, *Polypedilum convictum* and *Dicrotendipes tritonus* seriously decreased. According to study of Mangit et al. 2017, most of the parameters reach levels classified as class IV (the worst class) according to criteria for water quality in the lake

and the lake is hypertrophic. Oxygen levels in lake look like high throughout the year. In shallow lakes, this over saturation with oxygen is typical situation with dense submerged macrophytes as Eber Lake. Rather than showing a stabilization or recovery, their values showed a significant increase (Mangıt et al., 2017). Consequently, the fauna structures of Lake Eber and Cernek consist of Palearctic species which are widespread in Europe fresh water systems and fauna structure according to Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae tend to be meso and polysaprobic species from 2012 to 2014 years. Negatively changes in the environmental variables undoubtedly affect the fauna structure of Lake Eber and Cernek.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Projects (Project number: 201319D21).

## REFERENCES

- Arslan N, Kara D, Odabaşı DA 2013. Twelve new records (Clitellata, Chironomidae and Gastropoda) from Lake Gölbaşı (Hatay-Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13: 869-873.
- Arslan N, Mercan D 2018. Water quality determination of the Lakes Mogan and Cernek (Turkey) by using macroinvertebrates accordance with Water Framework Directive. UNITECH2018, 16-17 November, Gabrovo.
- Atalay İ 1977. Sultandağları ile Akşehir ve Eber gölü havzalarının strüktürel, jeomorfolojik ve toprak erozyonu etüdü, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 260 p.
- Balachandran C, Ramachandra TV 2010. Aquatic macroinvertebrate diversity and water quality of Bangalore lakes. *Lake 2010: Wetlands, Biodiversity and Climate Change*, 22-24 December.
- Bat L, Akbulut M 2001. Studies on sediment toxicity bioassays using *Chironomus thummi* K., 1911 larvae. *Turkish Journal of Zoology*, 25: 87-93.
- Bilgin FH 1980. Batı Anadolu'daki bazı önemli tatlı sulardan toplanan Mollusca türlerinin sistematiği ve dağılışı. *Dicle Üni. Tıp Fak. Dergisi*, 8(2): 1-64.
- Bouchard RW 2004. Guide aquatic invertebrates of the Upper Midwest. Identification Manual for Student, Citizen Monitors, and Aquatic Resource Professionals. University of Minnesota, 208 pp.
- Brinkhurst RO 1971. A Guide for the Identification of British Aquatic Oligochaeta. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 22, 2nd Ed., Toronto, 55 pp.
- Brinkhurst RO, Jamieson BGM 1971. Aquatic Oligochaeta of the World. Univ. of Toronto, 860 pp.
- Cüce H, Bakan G 2017. Sığ sularda nutrient seviyelerine sediman kalitesinin etkisinin konumsal olarak değerlendirilmesi: Cernek Gölü örneği. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(5): 546-555.
- Demirkalp FY 2007. Some of the growth characteristics of carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) in Çernek Lake (Samsun, Turkey). *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 35(1): 57-65.
- Epler JH 1995. Identification manual for the larvae Chironomidae (Diptera) of Florida. Department of Environmental Protection, Division of Water Facilities, Tallahassee, 250p.
- Glöer P 2002. Die Süßwassergastropoden Nord und Mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. *Die Tierwelt Deutschlands*. ConchBooks. Hackenheim.
- Graaf S, de Vlas J, Herlyn M, Voss J, Heyer K, Drent J 2009. Macrozoobenthos. *Quality Status Report 2009 Thematic Report* No. 10, Common Wadden Sea Secretariat Trilateral Monitoring and Assessment Group.
- Guareschi S, Gutiérrez-Cánovas C, Picazo F, Sánchez-Fernández D, Abellán P, Velasco J, Millán A 2012. Aquatic macroinvertebrate biodiversity: patterns and surrogates in mountainous Spanish national parks. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 22: 598–615.
- Habib MAB, Haque AKM, Islam MA 1984. Status of macro-benthos in two ponds in Bangladesh Agricultural University Campus, Mymensingh. *Bangladesh J. Agril. Sci.* 11: 39-46.
- Kathman RD, Brinkhurst RO 1998. Guide to the freshwater Oligochaetes of North America, Aquatic Resources Center, Tennessee, USA, Pp: 1- 264.
- Köle MM, Ataoğlu M, Erkal T 2016. Eber ve Akşehir gölleri'nde 1990-2016 yılları arasında gerçekleşen alansal değişimler. Paper presented at: TÜCAUM Uluslararası Coğrafya Sempozyumu; Ankara, Turkey.
- Mangıt F, Korkmaz M, Sü U, Yerli SV 2017. Actual status of Eber Lake in terms of fish community structure. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 3(2): 101-106.
- Mason CF 1996. Biology of freshwater pollution. Longman Group Limited, Essex, 82-88 pp.

- Milbrink G 1980. Oligochaeta Communities in Pollution Biology: The European Situation with Special Reference to Lakes in Scandinavia. In: Aquatic Oligochaeta Biology (Eds R.O. Brinkhurst and D.G Cook), Plenum Press, New York, pp. 433-455.
- Moller Pillot HKM 1979. De Larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). Leiden, I–IX. 2, 7.
- Moller Pillot HKM, Buskens RFM 2013. Chironomidae larvae, biology and ecology of the aquatic Orthocladiinae. KNNV Publishing, 22-252.
- Nupur N, Shahjahan M, Rahman MS, Fatema MK 2013. Abundance of macrozoobenthos in relation to bottom soil textural types and water depth in aquaculture ponds. Int. J. Agril. Res. Innov. & Tech., 3(2): 1-6.
- Öktener A 2004. A preliminary research on Mollusca species of some freshwaters of Sinop and Bafra. G.U. Journal of Science, 17(2): 21-30.
- Özkan N, Moubayed-Breil J, Çamur-Elipek B 2010. Ecological analysis of Chironomid larvae (Diptera, Chironomidae) in Ergene River Basin (Turkish Thrace). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 10: 93-99.
- Republic of Turkey Ministry of Environment and Forestry 2009. UN Convention of Biological Diversity. *Fourth National Report*.
- Şahin Y 1984. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri Akarsu ve Göllerindeki Chironomidae (Diptera) Larvalarının teşhisi ve dağılışları. Anadolu Üniversitesi Yayınları 57, Eskişehir.
- Şahin Y 1991. Chironomidae potamofauna of Turkey (in Turkish). TÜBİTAK, TBAG-869: 88 pp.
- Tas B, Gonulol A 2007. An ecologic and taxonomic study on phytoplankton of a shallow lake, Turkey. Journal of Environmental Biology, 28(2): 439-445.
- Timm T 1999. A Guide to the Estonian Annelida. Naturalist's Handbooks 1. Estorian Acedemy Publishers, Tartu-Tallinn, 208 pp.
- Wethington AR 2004. Family Physidae. A supplement to the workbook accompanying the FMCS Freshwater Identification Workshop. University of Alabama, Tuscaloosa, 24 pp.
- Wetzel MJ, Kathman RD, Fend SV Coates KA 2000. Taxonomy, systematics, and ecology of freshwater Oligochaeta. In: Workbook prepared for North American Benthological Society Technical Information Workshop, 48th Annual Meeting, Keystone Resort, CO., 120 pp.
- Yıldız S, Balık S 2005. The Oligochaeta (Annelida) fauna of the Inland Waters in the Lake District (Turkey). E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 22(1-2): 165-172.
- Yıldız S, Ustaoglu MR, Balık S 2007. Türkiye'deki bazı lagünlerin Oligochaeta (Annelida) faunası için bir ön araştırma. Ulusal Su Günleri 2007 Sempozyumu, 217-223, Antalya.
- Zhadin VI 1965. Mollusks of fresh and brackish water of The U.S.S.R. Zoological Institute of The Academy Sciences of The Union of Soviet Socialist Republics. Israel Program for Scientific Translations. 46: 1-368.



## Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae Fauna of Gala Lake (Edirne)

Naime Arslan<sup>1</sup>, Deniz Mercan<sup>1\*</sup>

<sup>\*1</sup> Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Art and Sciences, Department of Biology, Eskişehir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: oligo2009@gmail.com

### Abstract

Gala Lake is an important wetland and national park in Edirne Province of Turkey. In order to determine and monitor the lake's Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna, zoobenthic samples were taken in 2012 and again in 2014. A number of environmental variables (pH, temperature, dissolved oxygen, depth) were measured and effects of environmental variables on the distribution of the species were investigated. A total of 40 taxa were identified in Lake Gala, two of which were Gastropods, 12 were Oligochaeta and 26 were classified as Chironomidae.

The results of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna structure obtained in Lake Gala in 2012 and 2014 were as follows: The population density of *Physella acuta*, one of the members of Gastropoda, was found to have increased while the population density of *Melanopsis costata* decreased. In the samples of 2014, the members of Oligochaeta as typical types of polysabrobic zones species *Limnodrilus claparedianus*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Limnodrilus profundicola*, *Tubifex tubifex*, *Potamothrix hammoniensis*, *Nais communis*, *Nais variabilis*, and *Nais elingais* were identified to have increased; however, *Nais pardalis* was not detected in the 2014 samples. *Potamothrix hammoniensis* individuals detected in both sampling periods, but individuals with ecophenotypic differentiation were identified. It has been determined that population density of Chironomidae members, *Cryptochironomus defectus*, *Camptochironomus tentans*, *Chironomus plumosus* and *Chironomus thummi*, which are typical species of polysabrobic zones and resilient to a wide range of adverse conditions have increased. However, the population density of *Dicrotendipes tritonus*, *Endochironomus tendens*, which are ecologically tolerant but not as resilient as the abovementioned species, have also decreased.

Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of Gala Lake contain Palearctic species that are common in European freshwater systems and it is observed that Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna change towards the predominance of  $\alpha$ - $\beta$  mesosabrob and polysabrob species in two years period.

**Keywords:** Lake Gala, macrozoobenthos, Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae

### INTRODUCTION

There are over 200 natural lakes in Turkey. The geographic proximity of the Turkish lakes along with the historical formation, links with both freshwater and marine systems around the globe and in Anatolia collectively make this water systems valuable in terms of biodiversity and endemism. As one of these freshwater systems, Lake Gala is a fluvial lake located at İpsala and Enez districts of Edirne province where Meriç River forms Turkey-Greece border and meets the Aegean Sea. As in many other countries, increasing water pollution and the change of fauna structure due to this pressure is one of the main problems in Turkey. Gala Lake is under a threat from the industrial pollution load of the Thrace Region through Ergene River and the pollution of the Meriç River from Bulgaria to Turkey. In addition, pollution from all agricultural activities in the Meriç Delta affects the lake. For this reason, while the mirror part of the lake is narrowing, the lake area is getting smaller and the pressure of agricultural activities is increasing (Çamur-Elipek et al., 2010; Güher et al., 2011) and as a result, the composition of the lake is changing. Although there have been many studies on different subjects (fish, plankton, water quality) in Gala Lake, there are very few studies on invertebrate fauna (Kırgız, 1988, 1989; Çamur-Elipek et al., 2010). In this study, the Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of the lake were determined according to the data obtained from zoobenthic sampling conducted in 2012 and 2014 and it was aimed to contribute to the fauna history of the lake by comparing two sampling periods and previous studies.

## MATERIALS and METHODS

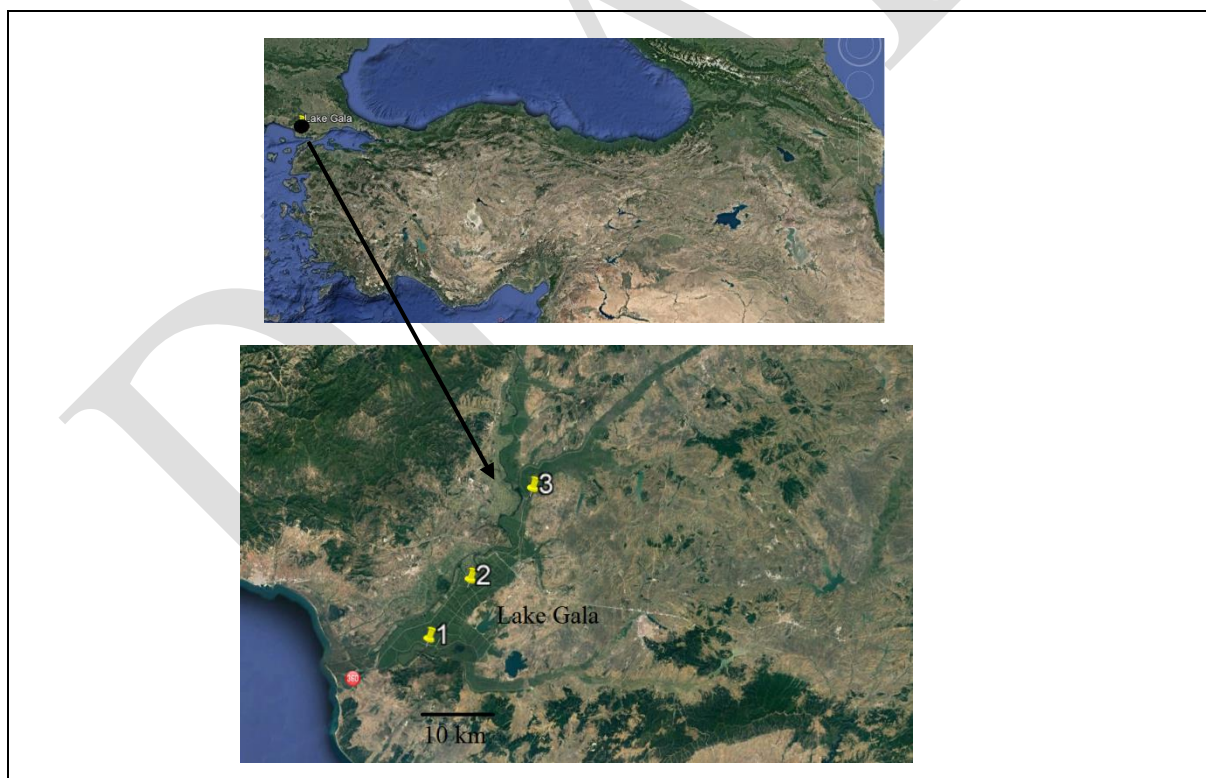
### Study Area

Located in Enez and İpsala districts of Edirne province, Gala Lake is comprised of 3,090 hectares of wetlands (Great Gala Lake, Little Gala Lake, Pamuklu Lake) and 3,000 hectares of forest (Hisarlı Mountain foothills) with a total area of 6,090 hectares and was declared Turkey's 36<sup>th</sup> national park in 2005. Gala Lake National Park is within the Meriç Delta Wetlands (<http://galagolu.tabiat.gov.tr/>) which is listed in Turkey's Key Biodiversity Areas, Important Bird Inhabited Areas, and Important Plant Areas lists that collectively corresponds to three of the Ramsar Criteria (4<sup>th</sup>, 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> criteria) and is an internationally renowned A class wetland. The area and depth of the lake vary greatly according to years, seasons and months. Its area is 5.6 km<sup>2</sup> and its altitude is 2.0 m. The depth of the lake varies between 0.4-2.2 m and the lake is surrounded by large reeds (*Phragmites australis* L. and *Typha* sp.).

### Sampling and Species Identification Studies

In this study, zoobenthic samples were collected in September 2012 and July 2014 to determine the Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of Lake Gala (Figure 1). The obtained benthic samples were sieved in the field with a 3-mesh system (60, 100 and 200 mesh) and fixed with alcohol and transferred to the laboratory. In the identification of Oligochaeta samples, Brinkhurst (1971), Kathman and Brinkhurst (1998), Timm (1999) and Wetzel et al. (2000) were followed. In the identification of Chironomidae specimens, Şahin 1984, 1991, Moller Pillot 1979, 2013 were employed. In Gastropoda species identification, "Mollusks of Fresh and Brakish Waters of the USSR" of Zhadin (1965), "Systematics and distribution of Molluscatures collected from some important fresh waters of Western Anatolia" of Bilgin (1980), "Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas" of Glöer (2002) were employed.

A number of lake water parameters (pH, temperature, dissolved oxygen, depth) were also measured *in situ* by Hydrobios brand water analyzer during the collection of zoobenthic samples.



**Figure 1.** Geographic location of Gala Lake and sampling stations.

## RESULTS and DISCUSSION

The research result revealed that there were a total of 35 taxa including 2 Gastropods, 11 Oligochaeta and 22 Chironomidae in 2012 samples. In 2014 samples, 2 Gastropods, 11 Oligochaeta and 26 Chironomidae with a total of 39 taxa were detected. The results of Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna obtained in

Lake Gala in 2012 and 2014 are given in Table 1. As seen in Table 1, it was found that the population density of *Physella acuta*, one of the members of Gastropoda, increased compared to 2012, whereas the density of *Melanopsis costata* decreased. In the samples of 2014, the members of Oligochaeta as typical types of polysaprobic zones the species *Limnodrilus claparedianus*, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Limnodrilus profundicola*, *Tubifex tubifex*, *Potamothrix hammoniensis*, *Nais communis*, *Nais variabilis* and *Nais elingais* were identified to have increased; however, *Nais pardalis* was not detected in the 2014 samples. *Potamothrix hammoniensis* individuals detected in both sampling periods, however, individuals with ecophenotypic differentiation were identified. It has been determined that population density of Chironomidae members, *Cryptochironomus defectus*, *Camptochironomus tentans*, *Chironomus plumosus* and *Chironomus thummi*, which are typical species of polysaprobic zones and resilient to a wide range of adverse conditions have increased. However, the population density of *Dicrotendipes tritonus*, *Endochironomus tendens*, which are ecologically tolerant but not as resilient as the abovementioned species, have also decreased.

Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna of Gala Lake contain Palearctic species that are common in European freshwater systems and it is observed that Gastropoda, Oligochaeta and Chironomidae fauna change towards the predominance of  $\alpha$ - $\beta$  mesosaprob and polysaprob species in two years period. Furthermore, the diversity index (Shannon-H') value of 3.110 in 2012 decreased to 2.828 in 2014.

**Table 1.** Species detected in Gala Lake in 2012 and 2014, dominance rates (%), some environmental parameters-index values and comparison with previously determined invertebrate species.

Environmental parameters	%D		Previous Studies
	2012	2014	Elipek et al., 2005
pH	7.68	8.53	8.41
Temperature	19	23	18
Dissolved Oxygen	6.24	4.04	13.45
Depth	1.86	1.23	1.39
<b>Index</b>			
Taxa_S	35	39	
Individuals	1782	5798	
Shannon_H	3.110	2.828	
Evenness_e^H/S	0.6406	0.4336	
<b>Taxa</b>			
<b>Gastropoda</b>			
<i>Physella acuta</i> (Draparnaud, 1805)	0.22	1.28	
<i>Melanopsis costata</i> (Olivier, 1804)	1.35	0.12	
<b>OLIGOCHAETA</b>			
<i>Nais communis</i> Piguët, 1906	0.67	0.59	+
<i>Nais variabilis</i> Piguët, 1906	0.51	0.69	+
<i>Nais elinguis</i> Piguët, 1906	0.34	0.24	-
<i>Nais pardalis</i> Piguët, 1906	0.79	-	-
<i>Tubifex tubifex</i>	0.79	4.69	+
<i>Potamothrix hammoniensis</i> (Michaelsen, 1901)	7.97	9.45	+
<i>Potamothrix</i> sp.	3.14	1.41	-
<i>Psammoryctides albicola</i> (Michaelsen, 1901)	8.14	1.02	+
<i>Limnodrilus claparedianus</i> Ratzel, 1869	0.22	2.78	+
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparède, 1862	1.35	10.16	+
<i>Limnodrilus profundicola</i> (Verrill, 1871)	0.34	1.10	+
<i>Limnodrilus</i> sp.	-	5.09	+
<b>CHIRONOMIDAE</b>			
<i>Tanytus punctipennis</i> Meigen, 1818	8.14	1.21	+
<i>Procladius</i> ( <i>Holotanytus</i> ) sp.	6.73	2.52	+

<i>Psectrocladius limbatellus</i> (Holmgren, 1869)	-	0.05	+
<i>Psectrocladius sordidellus</i> (Zetterstedt, 1838)	0.62	0.03	+
<i>Cricotopus bicinctus</i> (Meigen, 1818)	2.64	0.26	+
<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabricius, 1794)	4.15	0.88	+
<i>Cricotopus flavocinctus</i> (Kieffer, 1924)	2.64	6.09	+
<i>Parachironomus arcuatus</i> Kieffer, 1909	0.22	0.60	+
<i>Cryptotendipes holsatus</i> (Lenz, 1959)	0.51	0.14	+
<i>Cryptochironomus</i> sp.	-	0.03	
<i>Cryptochironomus defectus</i> K.	1.29	1.85	+
<i>Einfeldia</i> sp.	-	0.24	+
<i>Camptochironomus tentans</i> Fabricius, 1805	0.95	5.54	+
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus, 1758)	1.68	16.09	+
<i>Chironomus</i> sp. Kieffer, 1909	-	0.17	-
<i>Chironomus thummi</i> (Kieffer, 1916)	0.34	0.21	-
<i>Polypedilum pedestre</i> (Meigen, 1818)	2.69	0.48	+
<i>Polypedilum sordens</i>	1.46	0.48	+
<i>Polypedilum convictum</i> (Walker, 1856)	4.83	0.69	+
<i>Endochironomus tendens</i> (Fabricius, 1775)	4.10	0.22	+
<i>Endochironomus albipennis</i> (Meigen, 1830)	1.35	4.00	+
<i>Dicrotendipes tritonus</i> (Kieffer, 1916)	7.07	0.38	+
<i>Paratanytarsus lauterborni</i> (Kieffer, 1909)	8.31	8.43	+
<i>Cladonytarsus mancus</i> (Walker, 1856)	1.80	0.05	+
<i>Virgatanytarsus arduensis</i> (Goetg., 1922)	7.69	10.38	+
<i>Tanytarsus gregarius</i> Kieffer, 1909	4.99	0.34	-

## CONCLUSION

*Polypedilum nubifer*, *Chironomus plumosus*, and *Camptochironomus tentans* (Kırgız, 1988) were reported as the most abundant species in the study carried out in Lake Gala in 1988. Nonetheless, *Polypedilum nubifer* was not detected either in 2010 (Çamur-Elipek et al., 2010) or in this study. In the current study, the most prevalent species were *Chironomus plumosus* (Chironomidae) and *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta) which are very tolerant species to pollution (Brinkhurst and Jamieson, 1971; Timm, 1999). These species are cosmopolitan species (Wetzel et al., 2000; Epler, 2001; Timm, 1970) that can be encountered in wide range of environments from oligotrophic habitats to habitats rich in organic matter. *Chironomus* species (especially *plumosus*) is known to increase the number of individuals in eutrophic lakes in parallel to the decrease in dissolved oxygen (Moss, 1988). Dominance of *Chironomus plumosus* and *L. hoffmeisteri* in this study and in 1988 (Kırgız, 2010 (Çamur-Elipek et al.) reveals the pollution level of the lake and abundance of these two pollution-tolerant species, especially in recent years, due to the decrease in dissolved oxygen implies that the pollution in the lake has reached a serious level.

Another species of Oligochaeta with high abundance in our study is *Potamothrix hammoniensis*, which is relatively tolerant to pollution. However, *Potamothrix* sp. in our study indicated morphological character deviations from *Potamothrix hammoniensis*. This can be considered as an ecophenotypic variation developed with the changing environmental conditions.

Gala Lake Gastropoda species diversity is not very high, but two species were identified in the lake. When the 2012 and 2014 sampling results were compared, it was observed that the population density of *Physella acuta* is increased whereas that of *Melanopsis costata* decreased. The species belonging to the genus *Melanopsis* are Prosobranch Gastropods and are known to be sensitive to changes in dissolved oxygen levels in the water (Yıldırım, 1999). However, *Physella acuta*, which is one of the species with a wide ecological tolerance, has a short life cycle and can survive in extremely harsh environmental conditions (extreme temperature and water pollution, etc.) (Wethington, 2004). The decrease in *Melanopsis costata*, which has lower ecological tolerance in the lake, and the increase in population density of euryök *Physella acuta* may be related to negative changes in lake water parameters.

Thus, intensive detection of Oligochaeta, Chironomidae and Gastropoda species which are typical types of  $\alpha$ - $\beta$  mesosaprobic and polysaprobic zones in the lake shows that environmental conditions in the lake have changed negatively. It is an inevitable result that adversely changing environmental conditions affect the fauna. Therefore, urgent measures should be taken for the pollution in the lake.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Projects (Project number: 201319D21).

## REFERENCES

- Bilgin FH 1980. Batı Anadolu'daki bazı önemli tatlı sulardan toplanan Mollusca türlerinin sistematigi ve Dağılışı. Dicle Üni. Tıp Fak. Dergisi, 8(2): 1-64.
- Brinkhurst RO 1971. A Guide for the Identification of British Aquatic Oligochaeta. Freshwater Biological Association, Scientific Publication No. 22, 2nd Ed., Toronto, 55 pp.
- Brinkhurst RO, Jamieson BGM 1971. Aquatic Oligochaeta of the World. University of Toronto, Pp: 1-860.
- Çamur-Elipek B, Arslan N, Kırgız T, Öterler B, Güher H, Özkan N 2010. Analysis of benthic macroinvertebrates in relation to environmental variables of Lake Gala, a national park of Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science, 10: 235-243.
- Epler JH 2001, Identification manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North And South Carolina. Version 1.0, Crawfordville, FL, USA, 53 pp.
- Glöer P 2002. Die Süßwassergastropoden nord und mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung. Die Tierwelt Deutschlands. ConchBooks. Hackenheim.
- Güher H, Erdoğan S, Kırgız T, Çamur-Elipek B 2011. Dynamics of zooplankton in national park of Lake Gala (Edirne-Turkey). Acta Zoologica Bulgarica, 63(2): 157-168.  
<http://galagolu.tabiat.gov.tr/> (Accessed: 9 July 2019).
- Kathman RD, Brinkhurst RO 1998. Guide to The freshwater Oligochaetes of North America. Aquatic Resources Center, Tennessee, USA, Pp: 1- 264.
- Kırgız T 1988. Gala Gölü Chironomidae (Diptera) larvaları üzerinde bir ön çalışma. IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-23 Eylül, Sivas, 489-498.
- Kırgız T 1989. Gala Gölü bentik faunası. Anadolu Univ., Fen-Ed. Fak. Dergisi, 1(2): 67-87.
- Moller Pillot HKM 1979. De Larven der Nederlandse Chironomidae (Diptera). Leiden, I–IX. 2, 7.
- Moller Pillot HKM, Buskens RFM 2013. Chironomidae larvae, biology and ecology of the aquatic Orthocladiinae. KNNV Publishing, 22-252.
- Moss B 1988. Ecology of freshwaters man and medium, Second Edition. Blackwell Scientific Publications, 399 pp.
- Şahin Y 1984. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri akarsu ve göllerindeki Chironomidae (Diptera) larvalarının teşhisi ve dağılışları. Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Eskişehir.
- Şahin Y 1991. Türkiye Chironomidae Potamofaunası, (TÜBİTAK, Proje No: TBAG-869).
- Timm T 1970. On the fauna of Estonian Oligochaeta. Institute of Zoology and Botany of the Academy of Sciences of the Estonian S.S.R., Tartu.
- Timm T 1999. A Guide to the Estonian Annelida. Naturalist's Handbooks 1. Estorian Acedemy Publishers, Tartu-Tallinn, 208 pp.
- Wethington AR 2004. Family Physidae. A supplement to the workbook accompanying the FMCS. Freshwater Identification Workshop, University of Alabama, Tuscaloosa, 24 pp.
- Wetzel MJ, Kathman RD, Fend SV, Coates KA 2000. Taxonomy, systematics, and ecology of freshwater Oligochaeta. In: Workbook prepared for North American Benthological Society Technical Information Workshop, 48th Annual Meeting, Keystone Resort, CO., 120 pp.
- Yıldırım MZ 1999. Türkiye Prosobranchia (Gastropoda: Mollusca) türleri ve zoocoğrafik yayılışları 1. Tatlı ve Acı Sular. TÜBİTAK Turkish Journal of Zoology, 23(3): 877-900.
- Zhadin VI 1965. Mollusks of fresh and brackish water of The U.S.S.R. Zoological Institute of The Academy Sciences of The Union of Soviet Socialist Republics. Israel Program for Scientific Translations. 46: 1-368.

## Microencapsulation of N-icosane By nano Clay Particles Doped Chitosan/Sodium Alginate Wall For Latent Heat Storage

Simge Özkayalar, Sennur Alay Aksoy\* Ebru Genç,

Süleyman Demirel University, Engineering Faculty, Department of Textile Engineering, Isparta, Türkiye.

\*Corresponding author e-mail: sennuralay@sdu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, mikrokapsülenmiş faz değıştiren madde (FDM) kompleks koaservasyon metodu ile hazırlanmıştır. Çalışmada FDM olarak lineer uzun zincirli hidrokarbon olan n-eykosan, mikrokapsüllerin duvar yapısını oluşturmak için ise kitosan ve sodyum alginat polimerleri kullanılmıştır. Mikrokapsülasyon işlemi sırasında mikrokapsül duvar yapısına nanokil ilave edilmiştir. Kompleks koaservasyon yönteminde, iki zıt yüklü polimer çözeltisi karıştırılmıştır. Karışımın pH'ı, polimerlerin karışımında emülsiyeye edilmiş çekirdek malzemenin etrafında kompleks yapısını oluşturmak için pH 4'e ayarlanmıştır. Çalışma kapsamında, çözelti karışımı, polikasyon çözelti olarak %2.5'lik kitosan polimer çözeltisi ve polianyon çözelti olarak %2.5'lik sodyum alginat polimer çözeltisi içermektedir. Konvansiyonel kompleks koaservasyon yönteminden farklı olarak, çalışmada polianyon polimer çözeltisi içerisine nanokil parçacıkları ilave edilmiştir. Böylece, polianyon polimer çözeltisine ilave edilen nano partiküllerin, negatif yüklerinden kaynaklı polikasyon polimer molekülleri ile kompleks oluşturması amaçlanmıştır. Mikrokapsüllerin morfolojisi, kimyasal yapısı ve termal özellikleri incelenmiştir. FT-IR analiz sonuçlarına göre, n-eykosan çekirdekli kitosan/sodyum alginat/nanokil duvarlı mikrokapsüller başarılı bir şekilde üretilmiştir. DSC analiz sonuçları, nanokil duvarlı mikrokapsüllerin 60 J/g ile 80 J/g arasında gizli ısıyı absorbe ettiğini göstermiştir. Öte yandan, nanokil içermeyen mikrokapsüller 68 J/g gizli ısı absorbe etmiştir. Ayrıca, nano kil miktarı 1.2 gramdan 2 grama artırıldığında entalpi değerlerinin 69 J/g'den 80 J/g'ye artmasına ve mikrokapsüllerin erime sıcaklıklarının artmasına neden olmuştur. Mikrokapsüllerin yapısındaki nanokil varlığı taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışınları (SEM-EDX) ve X-Ray fotoelektron spektroskopisi (XPS) analizi ile belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** FDM, n-eykosan, mikrokapsül, nanokil, entalpi, gizli ısı.

## Microencapsulation of N-icosane By Nano Clay Particles Doped Chitosan/Sodium Alginate Wall For Latent Heat Storage

### Abstract

In this study, microencapsulated phase change material (PCM) was prepared by complex coacervation method. In the study, n-icosane which was a linear long chain hydrocarbon was used as PCM and chitosan and sodium alginate polymers were used to form wall of the microcapsules. Nano clay was doped to microcapsule wall structure during microencapsulation process. In the microencapsulation process by complex coacervation method, two oppositely charged polymer solutions were mixed. The pH of the mixture was set to 4 to form the polymer complex structure around the core material emulsified in the mixture. In this study, the mixture solution comprised a chitosan polymer solution of 2.5% (w/v) as polycation solution and a sodium alginate solution of 2.5 % (w/v) as polyanion solution. Different from the conventional complex coacervation process, in the study, clay nanoparticles were added in polyanion polymer solutions. Thus, it was aimed that nano particles added in polyanion polymer solution form complex with polycation polymer molecules because of their negative charge. The morphology, chemical structure and thermal properties of the microcapsules were investigated. According to the FT-IR analysis, microencapsulated n-icosane with chitosan/sodium alginate/nano clay wall was fabricated successfully. DSC analysis results showed that microcapsules containing nano clay in their wall absorbed the latent heat of from 69 J/g to 80 J/g. On the other hand, microcapsules having no nano clay absorbed 68 J/g latent heat. Besides, the increasing amount of the doped nano clay from 1.2 grams to 2 grams, caused to increase the enthalpy values from 69 J/g to 80 J/g as well as melting points of the microcapsules increased. The presence of clay nano particles in the structure of microcapsules was confirmed by energy dispersive X-ray microanalysis (SEM-EDX) and X-ray photoelectron spectroscopy.

**Keywords:** PCM, n-icosane, microcapsules, nano clay, entalpy, latent heat.

## INTRODUCTION

In recent years, energy consumption has been increasing as a result of the rapid development of technology, the increasing population of the world population and the rising standard of living. Despite the increasing energy needs, the rapidly decreasing energy sources pose a problem of depletion of the existing energy sources and draw attention with their negative effects on the environment and economy. Consequently, it became necessary to carry out studies to improve the availability and continuity of energy. Nowadays, efforts to turn to alternative energy sources or to make energy efficiently available continue in this context (Genç, 2016). Thermal energy storage is the process of temporarily storing low or high heat energy for later use. The latent heat storage is one of the important thermal energy storage techniques. This is because the latent heat storage has a high heat storage capacity and a heat storage and releasing capability in a narrow temperature range. Latent heat is the heat that the material stores and releases during the phase change process (Farid vd., 2004; Mondal, 2008). Phase change materials (PCMs) are substances that store heat when passing from one phase to another, and vice versa. (Mondal, 2008; Alay, 2010).

That large amount of latent heat absorbs and emits during the melting and solidification processes of PCMs without significant temperature changes, causes phase change materials to become a source of heat storage (Mattila, 2006). Phase change materials may be used directly or in encapsulated form. However, since microencapsulation technology offers advantages such as a larger heat transfer area of the FDMs, reduced reactivity with the external environment, and controlled volume changes during phase transition, FDMs are generally used after microencapsulation (Pielichowska ve Pielichowski, 2014; Özkayalar, 2019).

In this study, it is aimed to improve the thermal stability of microcapsule wall structure by adding inorganic material to the microcapsule wall structure.

## MATERIALS and METHODS

In the study, n-icosane paraffin, which is a phase-change material with heat storage property, was used as nanocapsule core material. Chitosan and sodium alginate polymers were preferred as wall materials in microcapsule production. Chitosan polymer was used as the cationic polymer and sodium alginate polymer was used as the anionic polymer. The wall structure was reinforced by the addition of nano clay particles into the anionic polymer solution. In the preparation of emulsion, span 80 was used as the surfactant. Glutaraldehyde (25% aqueous solution) was used as cross-linker to stabilize the microcapsule structure. Acetic acid (2%) and sodium carbonate were used to adjust the pH in microcapsule production.

Microcapsule production was carried out using complex coacervation method. Complex coacervation, the oldest of the microencapsulation methods, is one of the commonly used methods for encapsulating insoluble oils in water. In the method, a second polyelectrolyte solution with different charge is added to a hydrophilic polyelectrolyte aqueous solution and microencapsulation is carried out by depositing the colloids at the appropriate pH around the core. In this study, it was aimed to increase the thermal resistance of polymeric wall structure by adding nano clay particles.

In the first stage of microcapsule production process, n-icosane was emulsified in anionic polymer solution using surfactant. In the study, sodium alginate / water polymer solution was used as anionic polymer solution and nano clay used to reinforce the microcapsule wall material was mixed into this solution. The cationic polymer (chitosan) solution was added to the prepared emulsion and the pH was adjusted to a range of 4-4.5, where the polymers were electrolytes. After this step, polymer-polymer complex formation was initiated and the reaction was continued with stirring for approximately 90 minutes. Then, the complex formation was stopped by adjusting the pH to 9 by the addition of sodium carbonate. In the final stage of microcapsule production, the temperature of the reaction medium was cooled to 5 ° C and cross-linker was added to stabilize microcapsules. Tannic acid solution was added to the prepared microcapsule solution and left to stand for 10 hours. Microcapsule production was completed by washing, filtration and drying processes. Microcapsule production was carried out at a mixing speed of 3000 rpm (Genç, 2016). Table 1 shows the microcapsules and their content information.

**Table 1.** Prepared microcapsules (Genç, 2016)

Microcapsule code	Wall materials and their amounts (g)	Core materials and its amount
Microcapsule-0	Chitosa/sodium alginate 0.6 /0.3	n-icosane 1.35
Microcapsule-1	Chitosa/sodium alginate +nano clay 0.6 /0.3 + 1.2	n-icosane 3.15
Microcapsule-2	Chitosa/sodium alginate +nano clay 0.6 /0.3 + 2	n-icosane 4.35

## RESULTS AND DISCUSSIONS

To characterize microcapsules, the analyses such as Optical Microscope, Scanning Electron Microscopy (SEM), Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersed X-Rays (SEM-EDX), X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (SEM-EDX) TGA) were applied.

### Optical Microscope Analysis and Particle Size Measurement Results

The morphology of microcapsules produced images were examined by optical microscope. In addition, the average size of microcapsules was determined by using optical microscope images. Figure 1 shows the optical microscope images and particle size distribution graphs of the microcapsules. When the optical microscope images of the microcapsules are examined, it is seen that non-microencapsulated polymer structures are found but microcapsule production is realized. In addition, the presence of capsules with spherical shaped and smooth surface is observed. According to the particle size measurement graphs, the average size of the capsules varies between 0.55  $\mu\text{m}$  and 0.64  $\mu\text{m}$ .

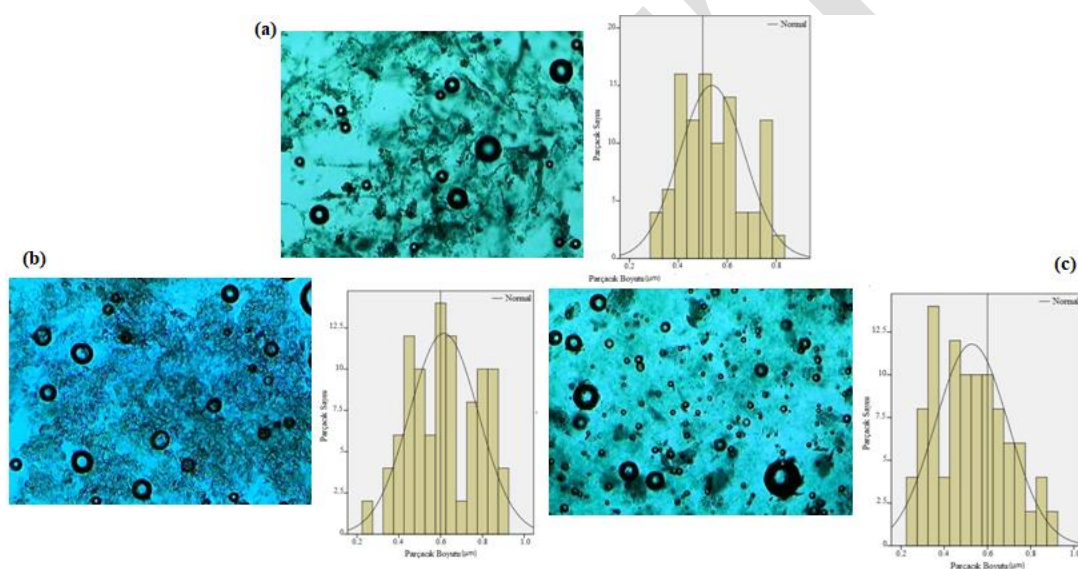


Figure 1. Optical microscope images (10X) and particle size distribution graphs of microcapsules (microcapsules-0 (a), microcapsules-1 (b) and microcapsules-2 (c))

### Scanning Electron Microscope (SEM) Analysis Results

Using SEM images, morphology and dimensions of microcapsules were examined in detail. Figure 2 shows the SEM images of the microcapsules. When SEM images of microcapsules are examined, it is seen that spherical form microcapsules are produced. It appears in the parts where the spherical form deteriorates due to the adhesion of the microcapsules. When particle sizes are examined, it is concluded that they have particle sizes below 1  $\mu\text{m}$  and have homogeneous size distribution. These findings are consistent with optical microscope and particle size measurement results.



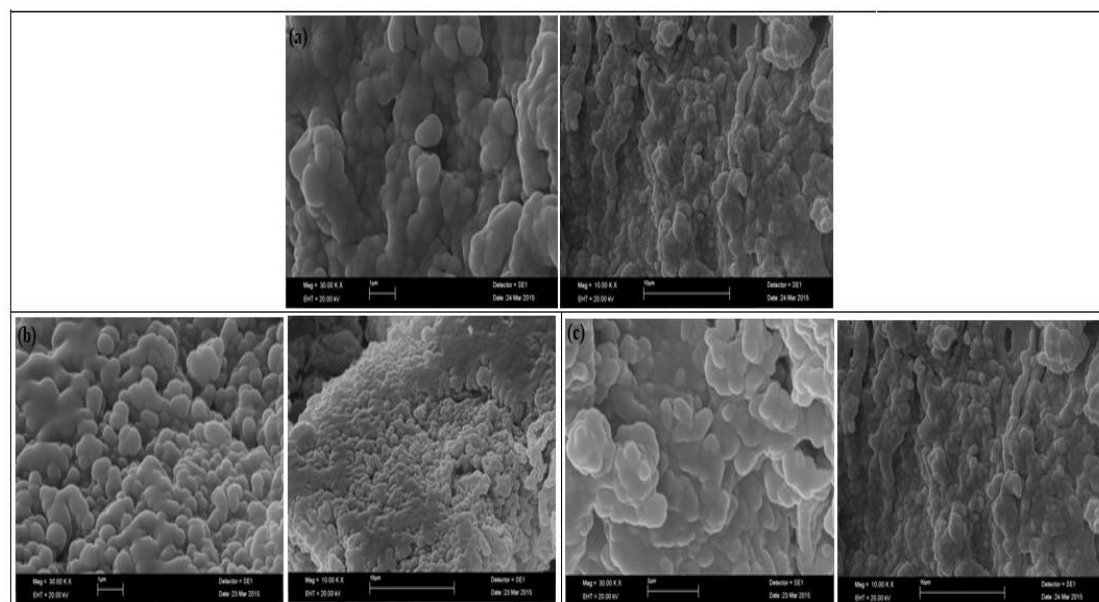


Figure 2. SEM images of microcapsules (microcapsules-0 (a), microcapsules-1 (b) and microcapsules-2 (c))

#### Scanning Electron Microscopy- Energy Dispersive X-Ray (SEM-EDX) Analysis Results

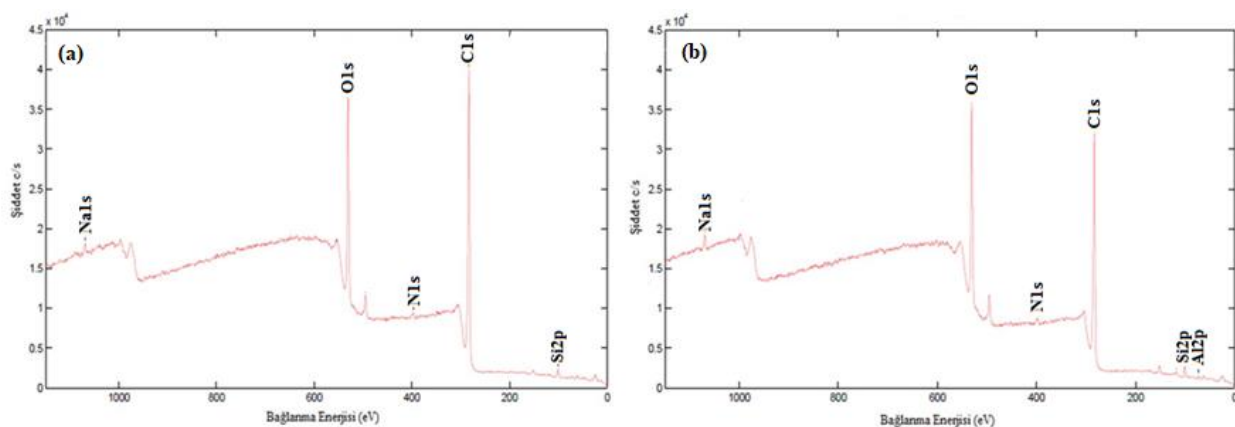
The presence of inorganic material (nano clay) in the structure of microcapsules was investigated by SEM-EDX analysis. Table 2 shows the SEM-EDX analysis results of the microcapsules. According to the elemental analysis of the chitosan / sodium alginate walled microcapsule, there are C (Carbon), O (Oxygen) and Na (Sodium) atoms in the structure. It was determined that microcapsules (Microcapsules-1 and Microcapsules-2) having nanoclay-reinforced chitosan / sodium alginate + nano clay wall structure also contain Al, Si and Mg elements. The presence of these elements proves the presence of nano clay in the microcapsule structure. In addition, as the amount of nano clay doped to the structure increases, the weight ratios of Si and Al elements in the microcapsule structure increase.

**Table 2.** SEM-EDX analysis results of microcapsules

Element	Weight %		
	Microcapsule-0	Microcapsule-1	Microcapsule-2
C	64.50	52.48	47.24
O	32.42	38.58	40.08
Na	3.08	3.18	3.1
Si	-	3.96	5.86
Al	-	1.48	2.23
Mg	-	-	0.74
Others	-	0.32	0.75
Total	100	100	100

#### X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Analysis Results

The microcapsules were characterized by XPS analysis to determine element components in the structure. Figure 3 shows XPS analysis graphs of microcapsules and Table 3 shows the elemental composition ratios and binding energy values for each element. According to the XPS analysis results, the presence of elements indicating the presence of nano clay is observed. In addition, the amount of Si detected in the microcapsule structure increased depending on increase in the amount of nano clay added during microcapsule production. Besides, presence of Al element in the microcapsule-2 structure containing more nano clay was detected. This is another proof of the increased nano clay presence in the microcapsule structure. As a result, all these findings prove the presence of nano clay in microcapsule structure. The findings of XPS analysis are consistent with the findings obtained in the SEM-EDX analysis



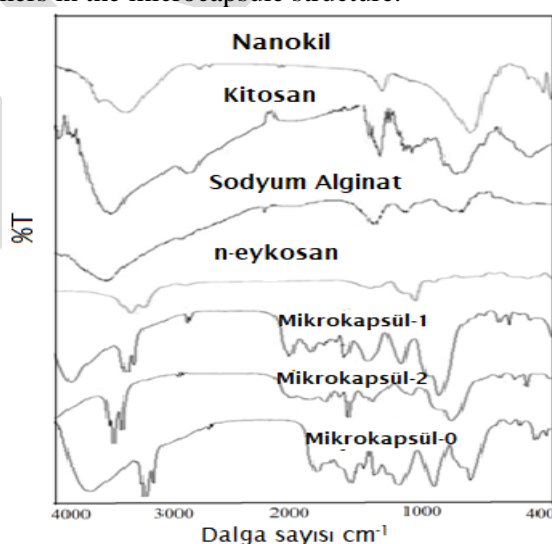
**Figure 3.** XPS analysis of microcapsule-1 (a) and microcapsule-2 (b)

**Table 3.** XPS analysis results for microcapsule-1 and microcapsule-2

Element	Binding energy (eV)	Atomic %	
		Microcapsule-1	Microcapsule-2
C (1s)	284.1	72.7	68.3
O (1s)	530.11	24.0	26.7
Si (2p)	101.9	1.6	2.0
N (1s)	400	1.1	1.3
Na (1s)	1071	0.6	1.0
Al (2p)	74	-	0.6

### Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy Analysis Results

The IR spectra of the microcapsules were examined to investigate the presence of core and wall materials in the microcapsule structure. Figure 4 shows the IR spectra of microcapsules and materials used in production. In the spectra of the microcapsules, peaks between 2916 and 2851  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic C-H stretching peaks of paraffin, indicating the presence of paraffin in the structure. The peaks at 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  wavelengths are the combination of O-H stretching peaks of chitosan and sodium alginate polymers, and N-H stretching peak of chitosan polymer. The peak at 1638  $\text{cm}^{-1}$  wavelength is the carbonyl peak of sodium alginate. These findings demonstrate the presence of polymers in the microcapsule structure.



**Figure 4.** IR spectra of microcapsules and basic materials

### Diferansiyel Taramalı Klorimetre (DSC) Analiz Sonuçları

Latent heat storage and releasing temperature and enthalpy (energy storage capacity) values of microcapsules were investigated by DSC analysis. DSC analysis were carried out in nitrogen atmosphere at a

heating / cooling ratio of 10 ° C / d between -10 / + 80 ° C. Figure 5 shows the DSC graphics of the microcapsules. According to the DSC curve of chitosan / sodium alginate walled microcapsules (Microcapsule-0), the microcapsules store 68.38 J/g energy at 33.85 ° C, release -70.85 J/g energy at 30.48 ° C. According to the DSC curve of Microcapsule-1 containing 1.2 g nano clay, the melting and solidification enthalpies of the microcapsules were 69.78 J/g and -65.48 J/g, respectively. Their heat storage and releasing temperatures are 37,13 ° C and 35,36 ° C. According to the DSC curve of microcapsule-2, it was concluded that microcapsules store 80.87 J/g at 37.15 ° C and emit -72.13 J/g at 35.48 ° C.

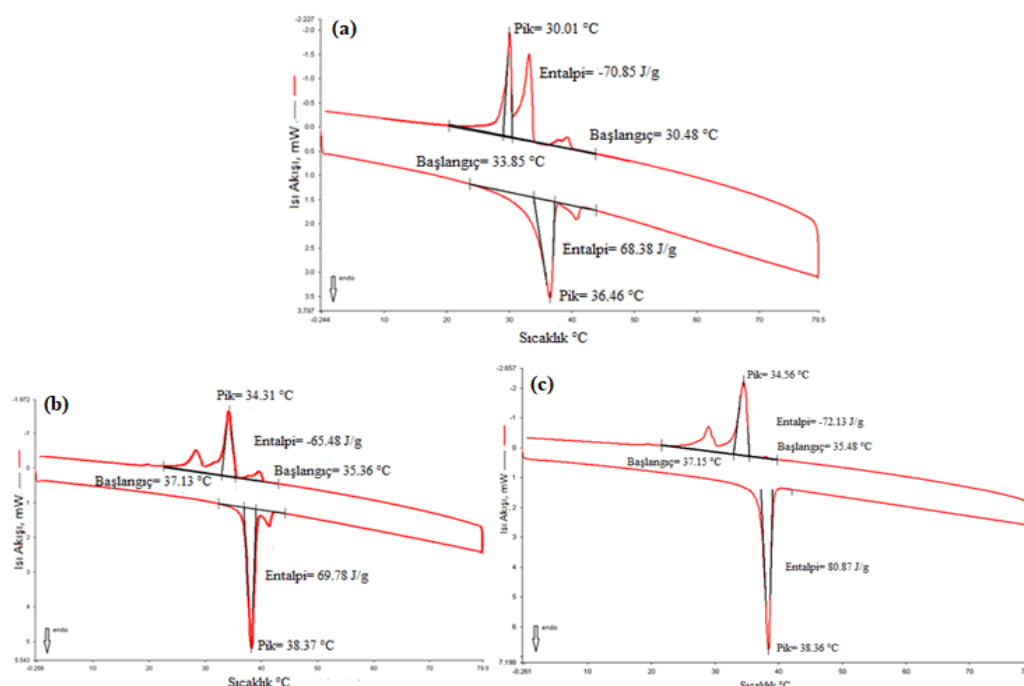


Figure 5. DSC curves for microcapsules (microcapsule-0 (a), microcapsule-1 (b) and microcapsule-2 (c))

The findings obtained from the DSC curves are summarized in Table 4. It is seen from table that microcapsules have high heat storage capacity. It was also concluded that the nano clay particles added to the microcapsule wall structure did not adversely affect the enthalpy value of the microcapsules. In fact, increase in the amount of nano clay seems to increase the enthalpy value slightly.

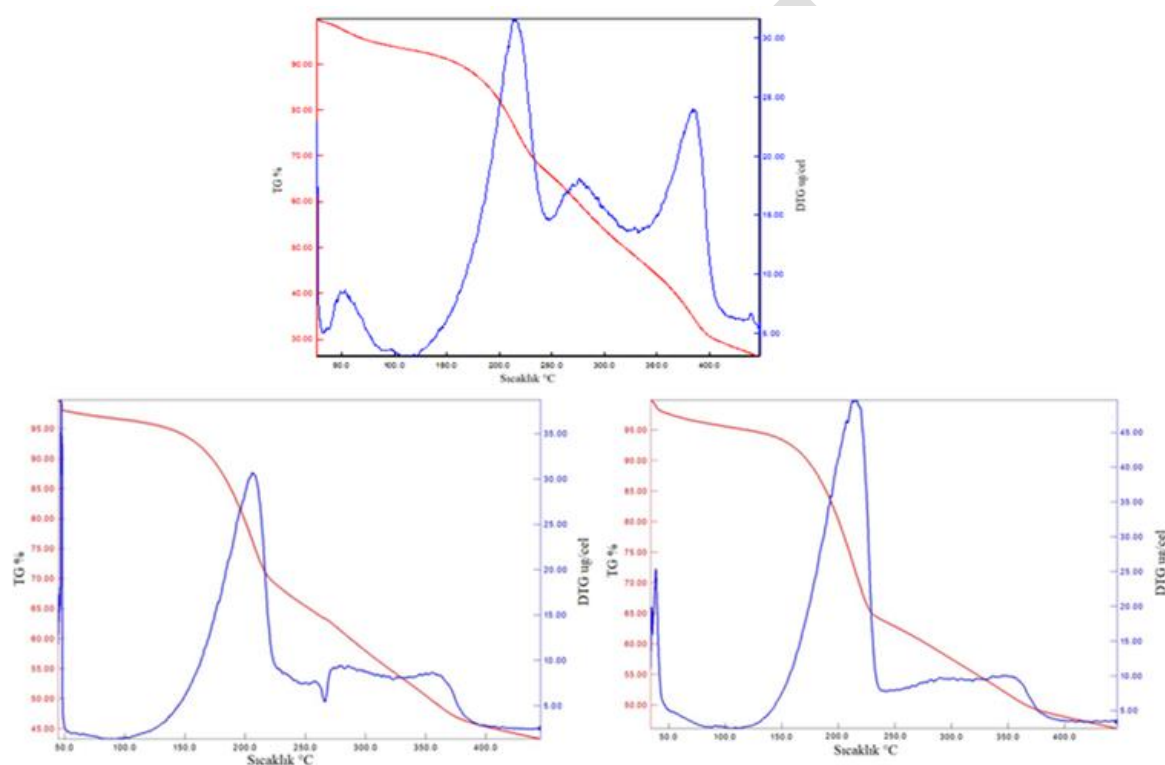
**Table 4.** DSC data of microcapsules

Microcapsule	Melting Temperature °C	Melting Enthalpy J/g	Crystallization Temperature °C	Crystallization Enthalpy J/g
Microcapsule-0	33.85	68.38	30.48	-70.85
Microcapsule-1	37.13	69.78	35.36	-65.48
Microcapsule-2	37.15	80.87	35.48	-72.13

### Thermogravimetric Analysis (TGA) Results

Thermal stability of microcapsules was investigated by thermogravimetric analysis. In TGA analysis, the decomposition behavior of the sample at increasing temperature and the temperatures at which they lose weight are determined. The analysis was carried out at temperature range of 0-450 ° C, at heating rate of 10 ° C / d in nitrogen atmosphere. Figure 6 shows the TGA curves of the microcapsules. The decomposition temperature ranges, weight loss and the amount of the substance remaining at the end of analysis are summarized in Table 5. According to the TGA curve of microcapsule-0, the degradation of the microcapsule occurs in three stages and the first degradation occurs in the range of 50-150 ° C. The mass loss at this stage is 10% and results from evaporation of water. The second decomposition step takes place in the range of 150-240 ° C, where the total

mass loss is determined to be 22%. As explained in the literature, the loss of mass in this range is due to the removal of n-eicosane which is used as phase-changing substance (Basal vd, 2011; Demirbağ, 2014). The last mass loss resulting from decomposition of microcapsule wall materials arisen between 240-390 ° C with weight loss of 22%. In addition, 30% of the microcapsule weight remains at the end of degradation. When the TGA curve of microcapsule-1 is examined, it is seen that the degradation occurs in three steps. The first decomposition step carried out at 50-150 ° C and the substance lost 7% of its weight. The second decomposition step was between 150 ° C and 220 ° C and it was observed that microcapsules lost 22% of their weight. The third stage decomposition taken place between 220-380 ° C and microcapsules lost 26% of their weight as a result of the decomposition of the microcapsule wall polymers. At the end of decomposition, the remaining amount was determined as 45%. According to the TGA curve of Microcapsule-2, the decomposition occurs in three steps. The first one taken place at 50-150°C with a mass loss of 7%. Microcapsules lost their weight of 27% in second step decomposition between the 150-235°C. In the last step, microcapsules lost their weight of 16 %. The wight of 50% of microcapsules remained at the end of analysis.



**Figure 6.** TGA curves for microcapsules (microcapsule-0 (a), microcapsule-1 (b) and microcapsule-2 (c))

**Table 5.** Decomposition temperatures, weight losses and amounts of substance remaining of microcapsules at the end of decomposition

Microcapsule	Decomposition steps	Decomposition temperatures, °C	Weight loss %	Amount of substance remaining at the end of decomposition %
Mikrokapsül-0	1.	50-150	10	30
	2.	140-240	22	
	3.	240-390	38	
Mikrokapsül-1	1.	50-150	7	45
	2.	150-220	22	
	3.	220-380	26	
Mikrokapsül-2	1.	50-150	7	50
	2.	150-235	27	
	3.	235-375	16	

According to the TGA analysis of microcapsules having nano clay or not, there are no significant differences in decomposition step and temperature. However, the amount of residual at the end of the decomposition increased for microcapsules including nano-clay. The more amount of the residue was interpreted as increasing the thermal resistance.

## **CONCLUSIONS**

In this study, microcapsule production was realized by adding nano clay particles to the microcapsule wall consisting of an anionic and cationic polymer pair. As a result, it was found that the nano clay added to the wall structure did not adversely affect the microcapsule enthalpy values and even enthalpy value increased with increase in the amount of nano clay. It has also been found that the addition of nano clay particles to the microcapsule wall structure increases the thermal resistance of the capsule. When the findings obtained were evaluated, it was concluded that nano clay doped chitosan/sodium alginate walled microcapsules having latent heat storage and releasing property were successfully produced by the complex coacervation method.

## **ACKNOWLEDGMENT**

This work was supported by SDU BAP with project number 4288-YL1-15. The authors would like to thank Süleyman Demirel University, Scientific Research Projects Coordination Unit.

## **REFERENCES**

- Alay S 2010. Isıl Enerji Depolama Özellikli Mikrokapsüller İçeren Akıllı Tekstil Ürünlerinin Geliştirilmesi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora tezi, 202 pp.
- Demirbağ S 2014. Kompleks Koaservasyon Metodu ile Isı Depolama ve Güç Tutuşur Özellikli Mikrokapsül Üretimi ve Tekstil Uygulamaları. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 123 pp.
- Genç E 2016. Tekstil Uygulamaları İçin Fonksiyonel Duvarlı Mikrokapsül Üretimi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 137 pp.
- Mattila HR 2006. Intelligent Textiles and Clothing. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 506 pp.
- Mondal S 2008. Phase Change Materials for Smart Textiles-an Overview. Applied Thermal Engineering, 28: 1536-50.
- Özkayalar S 2019. Çift Duvarlı Faz Değiştiren Madde Çekirdekli Nano ve Mikrokapsüllerin Üretimi ve Tekstil Uygulaması. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 162 pp.
- Pielichowska K, Pielichowski K 2014. Phase Change Materials for Thermal Energy Storage. Progress in Materials Science, 65: 67-123.
- Farid MM, Khudhair AM, Razack SAK, Hallaj S 2004. A Review on Phase Change Energy Storage: Materials and Applications, Energy Conversion and Management, 45: 15971615.

## Electrochemistry: past and present

Semra Bilgiç

Ankara University, Faculty of Science, Department of Physical Chemistry, 06100 Beşevler, Ankara, Turkey

e-mail: bilgic@science.ankara.edu.tr

### Özet

Elektrokimya terimi elektriksel olayları tanımlamak için 19. yüzyılın sonu ve 20. yüzyılda kullanıldı. Özellikle 20. yüzyılda elektrokimya bilim ve teknolojinin özel bir dalı olarak kurulmuştur ve bugün elektroliz, elektroanalitik kimya, elektroorganik kimya, elektrosentez, elektrokimyasal kinetik, elektrokimyasal termodinamik, metallerin korozyonu, elektrokaplama, elektroçökme, elektropolimerizasyon, elektroforez, sonoelektrokimya, nanoelektrokimya ve yakıt hücreleri gibi bir çok alanda önemli bir rol oynar. Modern elektrokimya 1805 yılında İtalyan kimyacı Luigi V. Brugneteli tarafından icat edildi. Michael Faraday elektrokimyasal ayrışmanın etkilerini incelemeye başladı ve 1832 yılında elektrokimyanın iki yasasını buldu. 1888 yılında Nernst voltaik hücrenin elektromotor kuvvetinin teorisini geliştirdi. 1875 yılında William Ostwald (1909 yılının Nobel ödüllüsü) elektrokimyada ve kimyasal dinamiklerde özel deneyleriyle deneysel çalışmalarına başladı. Katalizörün ilk modern tanımını, elektriksel ve iletkenlik ve organik asitlerin elektrolitik ayrışması çalışmalarını 1894'te yaptı. 1922 yılında polarografi doğdu. Heyrovski ve Japon meslektaşısı Mazuso Shikata polarografik eğrileri otomatik kaydeden ilk aleti geliştirdi. Voltmetrinin başlaması analitik kimyada her gün kullanılması kolaylığını getirdi. Belçikalı kimyacı M. Pourbaix 1959 yılında Pourbaix diyagramı olarak bilinen ve korozyon araştırmalarında kullanılan potansiyel/pH diyagramını icat etti. 1960 ve 1970'li yıllarda teori ve aletlerde bilgisayarın girilmesi ve kontrol sistemlerinin yer aldığı bir çok ilerlemeler görüldü. Bu ilerlemeler duyarlılık ve yeni analitik yöntemler geliştirdi. Her geçen gün artan önemiyle nanoelektrokimya son yıllarda elektrokimyanın önemli bir alanıdır. Elektrokimya alanındaki ilerlemeler günümüz teknolojisine önemli veriler katmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** elektrokimya, tarih, bilim.

### Abstract

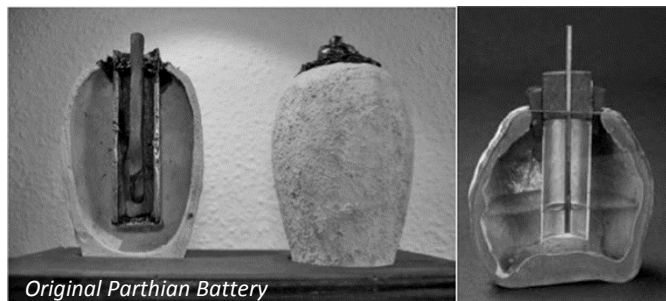
The term of electrochemistry was used to describe an electrical phenomenon in the late 19th and 20th centuries. Particularly in the 20th century, electrochemistry was established as a special branch of science and technology and today it plays a significant role in many areas, such as electrolysis, electroanalytical chemistry, electroorganic chemistry, electrosynthesis, electrochemical kinetics, electrochemical thermodynamics, corrosion of metals, electrocoatings, electrocoagulation, electropolymerization, electrophores, sonoelectrochemistry, nanoelectrochemistry as well as fuel cells. Modern electrochemistry was invented by an Italian chemist, Luigi V. Brugneteli, in 1805. Michael Faraday began to investigate the effects of electrochemical decomposition and founded two laws of electrochemistry in 1832. In 1888, Nernst developed the theory of electromotive force of the voltaic cell. In 1875, William Ostwald (1909 Nobel Laureate) started his experimental works with special emphasis on electrochemistry and chemical dynamics. He gave the first modern definition of a catalyst and is especially renowned for his contributions to the electrical conductivity and electrolytic dissociation of organic acids in 1894. In 1922, the 'polarography' was born. Heyrovski and his Japanese colleague Mazuso Shikata developed the first instrument for the automatic recording of polarographic curves. The beginning of voltammetry was facilitated for everyday use in analytical chemistry. Belgian chemist M. Pourbaix invented in 1959 the potential/pH diagram known as Pourbaix diagram, used in corrosion researches. The 1960s and 1970s saw many advances in theory and instrumentation, introduction of computer, and control systems were also included. These advancements improved sensitivity and created new analytical methods. With its importance increasing day by day, nanochemistry in the field of electrochemistry is subject to numerous researches in recent years. Advances in electrochemistry lately add important data into today's technology.

**Keywords:** electrochemistry, history, science.

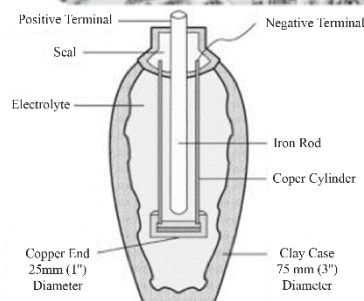
## Parthian Battery - The earliest form of batteries and the birth of electrochemistry

While constructing a railway in 1936 near Baghdad, workers uncovered what appeared to be a “prehistoric battery”, also known as the “Parthian Battery”. The object dates back to the Parthian empire and is believed to be 2,000 years old!

The battery consisted of a clay jar that was filled with a vinegar solution into which an iron rod surrounded by a copper cylinder was inserted.

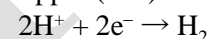


Original Parthian Battery

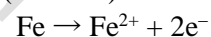


This device could produce 1.1 to 2.0 volts of electricity.

Hydrogen formation at the copper (0 V) :



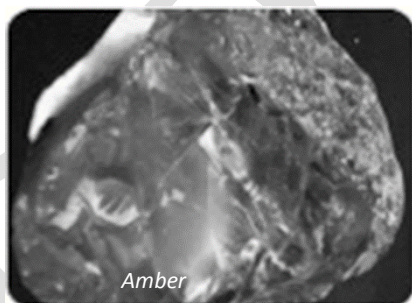
Iron dissolution at the rod (-0.44 V):



## Thales – Gilbert - Electrostatic and the discovery of electrodynamics

Electricity as electrostatic was reported at 600 BC by Greek philosopher Thales based on earlier observations of a mysterious force exerted on sheep when their wool was rubbed, and caused light materials to move against falling direction.

The same basic idea prevailed up to the 18<sup>th</sup> century in spite of better knowledge of materials and modes of rubbing, such as using spinning spheres instead of rubbing by hand.



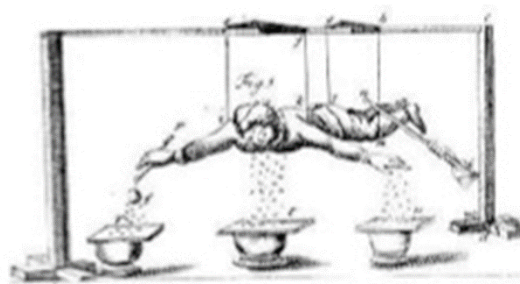
Amber



“Electricity” derived from the Greek word “ἤλεκτρον (electron)” for amber.

During this period, materials were classified to those that can be electrified and those that cannot. Besides electrostatics, the magneto-static force was also observed, and used for navigation. It was Gilbert (in his monumental book “The Magnet”, 1600), who suggested distinguishing between magneto-statics and electrostatics.

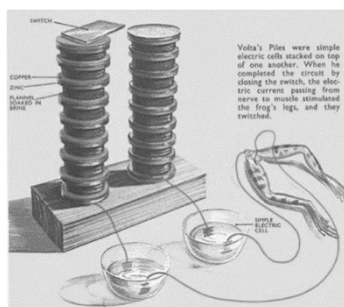
<i>Magnetism vs. Electricity according to Gilbert</i>	
<b>Magnetism</b>	<b>Electricity</b>
Can be applied to Iron and loadstone alone	Acts on many materials
Act through water	Extinguished by humidity
<b>Permanent</b>	<b>Temporary</b>
Not activated by rubbing	Activated by rubbing



## Luigi Galvani – Alessandro Volta - Voltaic pile

In 1800, Alessandro Volta invented the first electric battery, which was known as the “voltaic pile”

The idea came from Luigi Galvani (1737-1798), as he was dissecting a frog, when its leg began to twitch - which he called “animal electricity”.

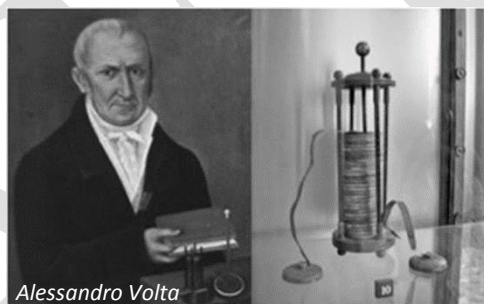
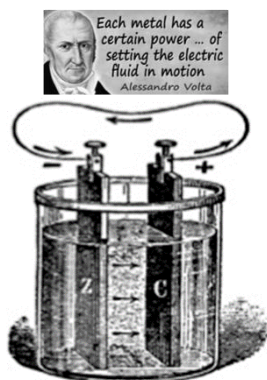


The history of Electrochemistry contains major advances of technology that helped define both industrial applications and daily life in the twenty-first century.

“Galvani believed that the twitching was due to some type of electrical action in the vicinity.”

Volta later tried to duplicate this experiment.

Volta's pile changed the world and made its creator an international celebrity. A basic measure of electricity—the volt—was named in his honor.



## Benjamin Franklin - Kite experiment

Benjamin Franklin had studied the chemical production of electricity and the effects of electricity on chemicals.

His famous “kite experiment” is a scientific experiment in which a kite with a pointed, conductive wire attached to its apex is flown near thunder clouds to collect electricity from the air and conduct it down the wet kite string to the ground.

The experiment's purpose was to uncover the unknown facts about the nature of lightning and electricity, and with further experiments on the ground, to demonstrate that lightning and electricity were the result of the same phenomenon.

It was proposed and may have been conducted by Benjamin Franklin with the assistance of his son William Franklin.

Franklin's kite experiment was performed in Philadelphia in June 1752, according to the account by Priestley.

Franklin described the experiment in the Pennsylvania Gazette in October 19, 1752, without mentioning that he himself had performed it.

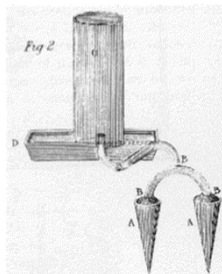
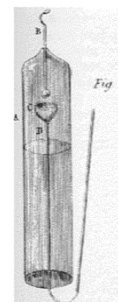


## Humphry Davy - First electrolysis



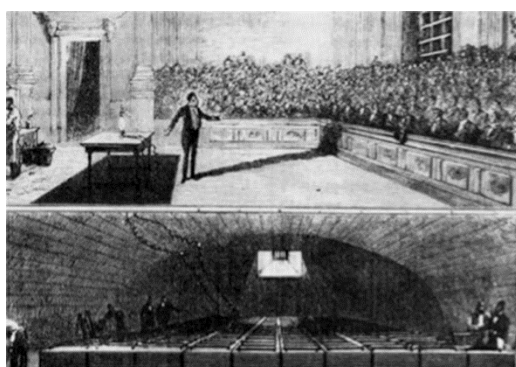
Sir Humphry Davy (1778-1825) used electricity as a source of energy for some of his investigations involving chemicals. He decomposed water by electrolysis and was responsible for isolating many metals in a pure form, including the reactive metals; sodium and potassium.

Humphry Davy's "apparatus for electrizing potassium in gases." The components are labeled: "A, the glass tube; B, the wire negatively electrified; C and D, the cup and wire positively electrified."



Humphry Davy's "apparatus for decomposing water out of the contact of air." The components are labeled: "AA, the cones containing the water; BBB, the tubes for conveying the gas. C and D, the pneumatic apparatus."

## Humphry Davy's presentation on light!



*Humphry Davy demonstrates his new electric light for members of the Royal Institution of London, circa 1809.*

The electrochemist Humphry Davy demonstrated lights of both kinds in the early 1800s. At the age of only twenty-two, Davy was made a lecturer at the new Royal Institution in London.

He was a dazzling speaker whose lecture-demonstrations soon became major social events in London for both women and men!

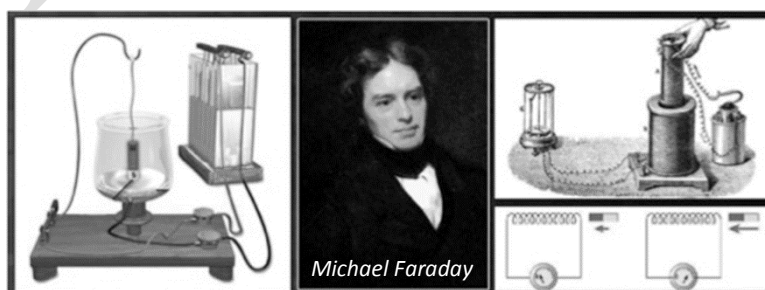
In an 1802 lecture he showed how we can cast light by passing an electric current through a platinum strip. In 1809 he demonstrated how to impose a large voltage across the air gap between two carbon electrodes to create a brilliant light.

The brightness of his light, powered by a huge number of Voltaic piles situated in the basement immediately below the lecture hall, absolutely stunned the audience.

(Note how the light is connected to the Voltaic piles.) It took very little time for the Voltaic piles (batteries) to be drained, however, at the time of this demonstration, electric light was more a scientific curiosity than a practical solution.

## Michael Faraday

Davy's student and successor, Michael Faraday had studied the relationship between the electricity and magnetism. He invented the first electromotor in 1821 and first dynamo in 1831.



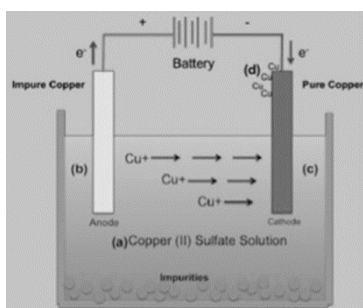


### Faraday's Laws of Electrolysis

Faraday's laws of electrolysis relate the amount of liberated mass at an electrode to the quantity of electricity passing through the electrode. In an electrolytic cell, metal at an electrode's surface is dissolved into an electrolyte or deposited on an electrode by the application of electricity. Faraday's first law states that the amount of current passed through an electrode is directly proportional to the amount of material liberated from it.

$$m \propto \text{Quantity of electricity}, \quad Q \Rightarrow m = Z \cdot Q$$

Faraday's second law states that the mass of two substances that are liberated from electrodes, given the same applied electrical charge, is proportional to the molecular weights of the two substances. An important industrial application of Faraday's law is electroplating, where a material is coated with a thin metallic layer to prevent corrosion or abrasion.



As well as discovering these laws of electrolysis, Michael Faraday is also responsible for popularizing terminologies such as electrode, ion, anode, and cathode.

### William Grove

Following the discovery of alkali and alkaline earth metals by electrolysis of molten salts (Humphry Davy), this gave rise later to the Hall-Herault cell for aluminium and to electrolytic metallurgy. The reverse reaction, recombination of hydrogen and oxygen in a fuel cell to generate electricity came about 1839 through the collaboration of Christian Schonbein and William Grove.

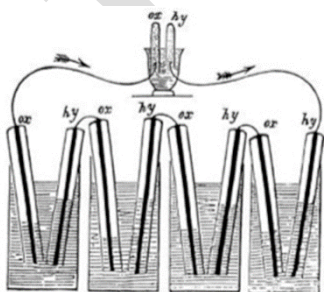
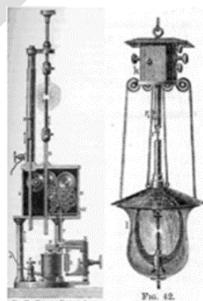
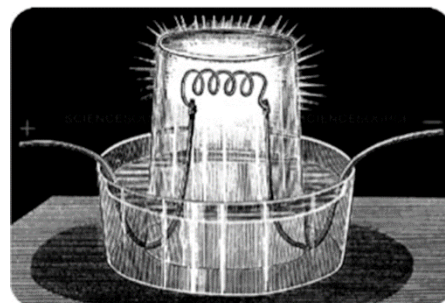


Illustration by Grove of a series connection of fuel cells operating an electrolysis cell



Two typical 19<sup>th</sup>-century arc lights



Grove's Incandescent Lamp, made 40 years before Edison's!

Say "light bulb," and Edison's name comes to mind –Edison's alone. It really got rolling just after 1800–almost eighty years before Edison's invention.

Two kinds of electric lamps competed through the 19th century. One was the incandescent lamp, whose light is created by passing an electric current through a filament. The other was the arc light, created by an electric arc leaping the gap between two electrodes.

## Characteristics of an electrochemical cell

To complete an electrical circuit, two half cells are necessary, with two electrodes, an anode and a cathode both in contact with an electrolyte, as well as an external connection between them.

It is immediately obvious that the system is non-Ohmic. In place of a linear current/voltage characteristic, the current rises exponentially with potential from the equilibrium point, in accordance with the Tafel equation:

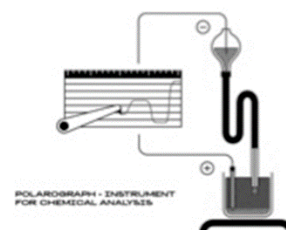
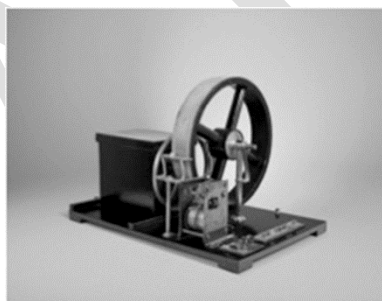
$$i = nFk \exp\left(\pm \alpha nF \frac{\Delta V}{RT}\right)$$

where the plus sign under the exponent refers to an anodic reaction, and a minus sign to a cathodic reaction,  $n$  is the number of electrons involved in the electrode reaction,  $k$  is the rate constant for the electrode reaction,  $R$  is the universal gas constant,  $F$  is the Faraday constant and  $\Delta V$  is the potential applied relative to the equilibrium.

## Jaroslav Heyrovsky – Dropping mercury electrode & Polarography

In 1922, Jaroslav Heyrovsky carried out his pioneering experiment with a dropping mercury electrode. Since then, the studies by using dropping mercury electrode is very important methods in electrochemistry, especially in electroanalytical chemistry.

Polarography is an analytical method, which allows quantitative and qualitative analysis of the compounds in a solution simultaneously.



The polarographic device is an apparatus used in the electrochemical analysis of presence and concentration of unknown reducible or oxidizable substances. In general, polarography is a technique in which the electric potential is varied in a regular manner between two sets of electrodes (indicator and reference) submerged in an electrolytic solution. The resulting polarization curve shows “waves.” The height of the wave indicates the concentration of the dissolved substance, while the position of the wave shows the kind of substances analysed.

## Butler-Volmer equation

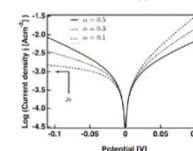
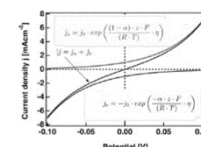
The Butler–Volmer equation also known as Erdey-Grúz–Volmer equation, is one of the most fundamental relationships in electrochemical kinetics. It describes how the electrical current on an electrode depends on the electrode potential, considering that both a cathodic and an anodic reaction occur on the same electrode.

Butler–Volmer equation:

$$j = j_0 \cdot \left\{ \exp \left[ \frac{\alpha_a z F}{RT} (E - E_{eq}) \right] - \exp \left[ - \frac{\alpha_c z F}{RT} (E - E_{eq}) \right] \right\}$$

More compact form:

$$j = j_0 \cdot \left\{ \exp \left[ \frac{\alpha_a z F \eta}{RT} \right] - \exp \left[ - \frac{\alpha_c z F \eta}{RT} \right] \right\}$$

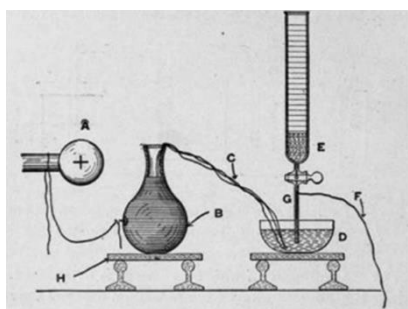


$j$ : electrode current density, A/m<sup>2</sup> (defined as  $j = I/S$ )

$j_0$ : exchange current density, A/m<sup>2</sup>  
 E: electrode potential, V  
 $E_{eq}$ : equilibrium potential, V  
 T: absolute temperature, K  
 z: number of electrons involved in the electrode reaction  
 F: Faraday constant  
 R: universal gas constant  
 $\alpha_c$ : so-called cathodic charge transfer coefficient, dimensionless  
 $\alpha_a$ : so-called anodic charge transfer coefficient, dimensionless  
 $\eta$ : activation overpotential (defined as  $\eta = E - E_{eq}$ )

### Ostwald and Nernst's Experiment – Nernst Equation

German chemist and physicist Walther Hermann recipient of the 1920 Nobel Prize in chemistry, “in recognition of his work in thermochemistry.”



Ostwald and Nernst's Experiment in Static Induction to Show the Presence of "Free Ions." A, positive knob of electrical machine; B, glass flask covered with tinfoil; C, wet strings connecting the glass flask and the vessel D, both containing dilute sulphuric acid; E, burette drawn out into a fine capillary, G, through the side of which



In electrochemistry, the Nernst equation is an equation that relates the reduction potential of an electrochemical reaction (half-cell or full cell reaction) to the standard electrode potential, temperature, and activities (often approximated by concentrations) of the chemical species undergoing reduction and oxidation.

The Nernst equation for an electrochemical half-cell is:

$$E_{red} = E_{red}^{\theta} - \frac{RT}{zF} \ln Q = E_{red}^{\theta} - \frac{RT}{zF} \ln \frac{Q_{red}}{Q_{ox}}$$

For a complete electrochemical reaction (full cell), the equation can also be written as:

$$E_{cell} = E_{cell}^{\theta} - \frac{RT}{zF} \ln Q_r$$

The Nernst equation is frequently expressed in terms of base-10 logarithms (i.e., common logarithms) rather than natural logarithms, in which case it is written, for a cell at 25°C:

$$E = E^{\theta} + \frac{0,059 V}{z} \log_{10} \frac{Q_{ox}}{Q_{red}}$$

Nernst performed a series of electrochemical studies from which, at the age of twenty-five, he arrived at his well-known equations. These equations described the concentration dependence of the potential difference of galvanic cells, such as batteries, and were of both great theoretical and practical importance.

Nernst started with the investigation of the diffusion of electrolytes in one solution. Then he turned to the diffusion at the boundary between two solutions with different electrolyte concentrations; he determined that the osmotic pressure difference would result in an electric potential difference or electromotive force (emf). Next he divided both solutions into two concentration half-cells, connected to each other by a liquid junction, and measured the emf via electrodes dipped into both solutions. The data supported his first equation where the emf was proportional to the logarithm of the concentration ratio.

Finally, he investigated galvanic cells where a redox reaction (e.g.,  $Zn + 2Hg^{+} \rightarrow Zn^{2+} + 2Hg$ ) was divided such that oxidation ( $Zn \rightarrow Zn^{2+} + 2e^{-}$ ) and reduction ( $2Hg^{+} + 2e^{-} \rightarrow 2Hg$ ) occurred at the electrodes in two half-cells. By combining this with Helmholtz's law, which related thermodynamics to the emf of electrochemical cells, and van't Hoff's equation, which related chemical equilibria to thermodynamics, Nernst derived his second equation for galvanic cells. Supported by many measurements, the equation described the emf of galvanic cells as a function of the concentration of all substances involved in the reaction.

Nernst's formulation of the third law of thermodynamics was originally an ingenious solution to a crucial practical problem in chemical thermodynamics, namely, the calculation of chemical equilibria and the course of chemical reactions from thermal data alone, such as reaction heats and heat capacities. Based on the first two laws of thermodynamics and van't Hoff's equation, chemical equilibria depended on the free reaction

enthalpy  $\Delta G$ , which was a function of both the reaction enthalpy  $\Delta H$  and the reaction entropy  $\Delta S$  according to the Gibbs-Helmholtz equation.

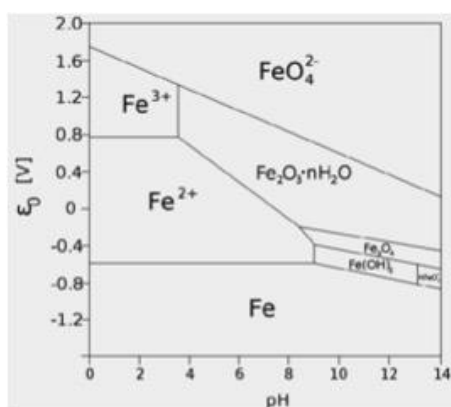
The problem was that, although enthalpy values could be calculated from thermal measurements, entropy values required data at the absolute zero of temperature, which was practically inaccessible. Guided by theoretical reasoning and then supported by a huge measurement program at very low temperatures, Nernst in 1906 suggested his heat theorem. According to a later formulation, it stated that all entropy changes approach zero at the absolute zero.

The theorem not only allowed the calculation of chemical equilibria, it was also soon recognized as an independent third law of general thermodynamics with many important consequences. One such consequence was that it is impossible to reach the absolute zero. Another consequence was that one could define a reference point for entropy functions, such that the entropies of all elements and all perfect crystalline compounds were taken as zero at the absolute zero.

Nernst made numerous other important contributions to physical chemistry. For example, his distribution law described the concentration distribution of a solute in two immiscible liquids and allowed the calculation of extraction processes. He also formulated several significant theories, such as those on the electrostriction of ions, the diffusion layer at electrodes, and the solubility product. In addition, he established new methods to measure dielectric constants and to synthesize ammonia, on which the German chemist Fritz Haber later successfully followed up.

### Marcel Pourbaix – Corrosion Science

Pourbaix performed his most well-known research at the University of Brussels, studying corrosion. His biggest achievement is the derivation of potential-pH, better known as “Pourbaix Diagrams”. Pourbaix Diagrams are thermodynamic charts constructed using the Nernst equation and visualize the relationship between possible phases of a system, bounded by lines representing the reactions that transport between them. They can be read much like a phase diagram.



In 1963, Pourbaix produced “Atlas of Electrochemical Equilibria”, which contains potential-pH diagrams for all elements known at the time. Pourbaix and his collaborators began preparing the work in the early 1950s. This study is very valuable for researchers working on corrosion.

The 1960s and 1970s saw many advances in theory and instrumentation, introduction of computer, and control systems were also included.

These advancements improved sensitivity and created new analytical methods. With its importance increasing day by day, nanochemistry in the field of electrochemistry is subject to numerous researches in recent years.

### News in Electrochemistry

The beginning of scientific understanding of electricity and magnetism, which initiated the production of the electric power and the industrial revolution in the late 19th century, can be traced back to the 16th century. However, the term of electrochemistry was used to describe an electrical phenomenon in the late 19th and 20th centuries.

Particularly in the 20th century, electrochemistry was established as a special branch of science and technology and today it plays a significant role in many areas, such as electrolysis, electro analytical chemistry, electroorganic chemistry, electrosynthesis, electrochemical kinetics, electrochemical thermodynamics, corrosion of metals, electrocoatings, electrocoagulation, electropolymerization, electrophores, sonochemistry, nanoelectrochemistry as well as fuel cells.

Advances in Electrochemistry lately add important data into today's technology.

## References

- Alessandro Volta GAA 2015. *Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences*, Retrieved.
- Bard AJ, Faulkner LR 2001. *Electrochemical methods Fundamentals and applications*. 2nd ed. Wiley, New York.
- Bockris JOM, Reddy AKN 1988. *Modern Electrochemistry*. 2nd ed., vol 1, Plenum Press, New York.
- Burek J, Zima J 2003. Eight Years of Polarography - History and Future. *Electroanalysis*, 15: 467-472 .
- Hamann CH, Hammett A, Vielstich W 1998. *Electrochemistry*. Wiley WCH.
- Heyrovski J, Kuta J 1966. *Principles of Polarographs*. Academic Press, New York.
- Mendelssohn K 1973. *The World of Walther Nernst: The Rise and Fall of German Science*. London: Macmillan.
- Schofield MJ 1998. *Fundamentals of Electrodeics*. 2nd edn. Plenum Press, New York.
- Seeber R, Zanardi C, Inzelt G 2015. Links Between Electrochemical Thermodynamics and Kinetics. *Chem Texts*, 1: 1-18.
- Zuman P 2006. Principles of Applications of Polarography and Voltammetry in the Analysis of Drugs. *J. Pharm. Sci.*, 3: 97-115.

## Atmosferik Korozyon

Semra Bilgiç

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizikokimya Bölümü, 06100, Beşevler, Ankara, Türkiye

e-mail: bilgic@science.ankara.edu.tr

### Özet

Korozyon metal ve alaşımların çevreleriyle kimyasal ve elektrokimyasal etkileşimleri sonucu bozunmalarıdır. Çevremize baktığımızda korozyonun pek çok örneğini görürüz. Demir üzerinde oluşan pas, gümüş yüzeyindeki kararma, bakır ve pirinç üzerindeki yeşil renkli patina oluşumu korozyon olayının sadece bir kaçıdır. Atmosferik korozyon, korozyon olayının pek çok çeşidinden biridir. Atmosferik korozyon diğer korozyon çeşitlerinden gerek harcanan para gerekse kaybedilen malzeme bakımından en etkin olanıdır. Çevremizi saran hava bütün metal ve alaşımlar için az ya da çok koroziftir. Atmosferik korozyonu oluşturan en önemli etken havadaki nem ve oksijendir. Bunun yanı sıra iklim koşulları, yerel koşullar ve mevsimlere göre havadaki miktarları değişen kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>), karbon dioksit, hidrojen sülfür, amonyak ve çeşitli katı parçacıklar korozyon hızına etki ederler. Atmosfer; kırsal, endüstri ve deniz atmosferi olarak sınıflandırılırsa atmosferik korozyonun derecesi daha iyi anlaşılabilir. Bunlardan en az korozif olan kırsal atmosferdir. Endüstri atmosferindeki korozyon kırsal atmosferdekenden 50–100 kat fazladır. Deniz atmosferi için bu oran 400–500 dolayındadır. Deniz atmosferinde sodyum klorür (tuz), endüstri bölgeleri ve kömürle ısınmanın yoğun olduğu yerleşim alanlarında kükürt bileşikleri havayı kirleten en önemli koroziflerdir. Havayı en tehlikeli biçimde kirleten madde SO<sub>2</sub> gazıdır. SO<sub>2</sub>, kömür ve yağların yanmasıyla baca gazlarından havaya karışır. Yakıt harcanması soğuk havalarda daha çok olduğundan havadaki SO<sub>2</sub> miktarı ve dolayısıyla korozyon hızı sonbahar ve kış aylarında daha fazladır. Havadaki nem miktarı korozyona etki eden bir diğer faktördür. Atmosferik korozyonda nemin etkili olmaması için bağıl nemin % 50–70 değerinin altında tutulması gerekir.

**Anahtar kelimeler:** korozyon, atmosfer, nem, zararlı gazlar.

### Abstract

Corrosion is the degradation of metals and alloys as a result of chemical and electrochemical interactions with their environment. When we look around us we say many examples of corrosion. Formation of rust on iron and steel and other corrosion products, darkness on silver, the formation of green patina on copper and brass can be given as a few examples. Atmospheric corrosion is one of many types of corrosion. Atmospheric corrosion is one of the most effective in terms of both spent money and lost material. The surrounding air is more or less corrosive to all metals and alloys. The most important factor that causes atmospheric corrosion is moisture and oxygen in the air. IN addition to this, sulfur dioxide, carbon dioxide, hydrogen sulfide, ammonia and various solid particles, which vary in the air according to climatic conditions, local conditions and seasons, affect corrosion rate. If atmosphere is classified as rural, industrial and marine atmospheres, the magnitude of atmospheric corrosion can be better understood. The least corrosive is the rural atmosphere. Corrosion in industrial atmosphere is 50–100 times higher than in rural atmosphere. For the marine atmosphere this ratio is around 400–500, Sodium chloride (salt) in the marine atmosphere sulfur compounds are the most important corrosives to pollute air in industrial areas and areas where coal heating is intense. The most dangerous pollutant in the air is SO<sub>2</sub> gas. SO<sub>2</sub>, mixed with flue gases into the air by combustion of coal and oils. The amount of SO<sub>2</sub> in the air and therefore the corrosion rate is higher in autumn and winter, as fuel expenditure is higher in cold weather. The amount of moisture in the air is another factor affecting corrosion. Relative humidity should be kept below 50–70% in order not to be effective in atmospheric corrosion.

**Keywords:** corrosion, atmosphere, moisture, harmful gases.

### Korozyon Nedir?

Korozyon genel olarak metal ve alaşımların çevreleriyle etkileşerek bozunmaları olarak tanımlanır. Korozyon elektrokimyasal bir olaydır ve metal yüzeyi ile metalin etkileştiği sulu elektrolit arasındaki elektron transferine dayanır.

Demir ve çelik üzerinde oluşan pas ve diğer korozyon ürünleri, gümüş yüzeyindeki kararma, bakır ve pirinç üzerinde görülen yeşil renkte patina, uçaklardaki çatlaklar, otomobil, gemi ve çeşitli araçlardaki tahribatlar korozyon için sadece birkaç örnektir.



Korozyon kimya, petrokimya, inşaat, otomotiv, demiryolları, denizcilik gibi çeşitli sektörler için kaçınılmaz ve tehlikeli bir olaydır.

Korozyon; kaynakları ve ürünleri tüketir, üretimi durdurur ve çeşitli kazalara neden olur.

Korozyon pek çok ekonomik kayıplar oluşturur. Korozyon endüstrideki yatırımlar ve üretimi olumsuz etkiler.

Tahminlere göre yıllık korozyon maliyeti ülkelerin gayri safi milli hasıllarının % 3,5–5,5 değerleri arasındadır.

Her yıl üretilen demirin % 20'sinin korozyonla yok olduğu tahmin edilmektedir.

Korozyonun pek çok türü vardır. Bunlar:

- Genel Korozyon
- Çukur (Çukurcuk) Korozyonu
- Taneler Arası (Tane Sınırları) Korozyonu
- Atmosferik Korozyon
- Yorulma Korozyonu
- Mikrobiyolojik (Mikrobiyal) Korozyon
- Aralık Korozyonu
- Erozyon Korozyonu
- Filiform Korozyon (İplikçik Korozyonu)
- Çatlak Korozyonu

### **Atmosferik Korozyon**

Atmosferik korozyon havadaki nem ve kirlilikler nedeniyle maddelerin bozunmaları olarak tanımlanır. Atmosferik korozyon nemli koşullarda oluşan bir korozyon türüdür. Buna göre atmosferik korozyon yağmur, çiy, nem ve eriyen kar gibi elektrolitlerin varlığında oluşan elektrokimyasal bir olay olarak da tanımlanabilir.

Atmosferik korozyon gerek harcanan para gerekse kaybedilen malzeme bakımından etkisi en büyük olan korozyon türüdür. Atmosferik korozyondan koruma maliyeti diğer bütün korozyon türlerinden koruma maliyeti toplamının % 50'sidir.

Atmosferik korozyon kuleler, köprüler, endüstriyel tesisler için çok önemlidir. Özellikle beton yapılarda ve köprülerde malzeme dizaynı, metal ve çevreleri arasındaki etkileşimlerin kontrolünü gerektiren mühendislik alanında büyük öneme sahiptir.

Atmosferik korozyonun etkisi coğrafi bölgeler ve yerel koşullara bağlıdır. Coğrafi bölgeler iklim koşullarına göre

- ılıman
- tropik



▪ kutup

bölgeleri olarak

Yerel koşullar

- Deniz
- Endüstri
- Kıy
- Kent

iklimi olarak sınıflandırılır.

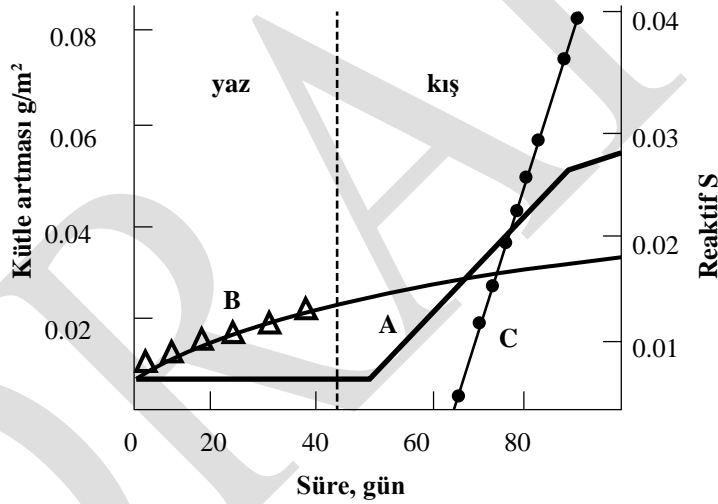
Deniz ve kıyı bölgelerinde atmosferde korozyona neden olan kirlilik tuz ve nemle birlikte artış gösterir. Deniz kıyısındaki korozyonun iç bölgelerdeki korozyondan fazla olmasının nedeni deniz kıyısında havadaki tuz ve nem miktarının fazla olmasıdır.

Örneğin; deniz kıyısından 24 m uzakta bulunan bir çelik levhanın 240 m uzakta bulunan bir levhadan 12 kat daha hızlı korozyona uğradığı belirlenmiştir.

Aynı örneğin deniz kenarındaki korozyon hızı çöl bölgelerinden 400–500 kat daha fazladır.

Korozyon yerden yüksekliğe de bağlıdır. Atmosferin üst kısımlarında havadaki tuz miktarı ve korozyon hızı artar.

Korozyon hızı mevsimlere de bağlıdır. Yaz aylarında atmosfere bırakılan bir örnek ile kış aylarında atmosfere bırakılan bir örneğin belli bir süre sonraki korozyon hızları aynı değildir.



Şekil 1. Bakırın korozyonu üzerine korozyon testine başlama mevsiminin etkisi:

A) Kükürtün etkisi B) Yazın dışarı konulan örnek C) Kışın dışarı konulan örnek

Bu grafik korozyon hızı üzerine mevsimlerin etkisini göstermektedir.

### Gazların Atmosferik Korozyona Etkisi

Atmosferdeki en tehlikeli kirletici kükürt dioksittir (SO<sub>2</sub>).

- Havadaki SO<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>S'in havadaki oksitlenmesinden

Kükürt içeren yakıtların yanmasıyla oluşur.

Yakıt harcaması soğuk mevsimlerde daha çok olduğundan havadaki SO<sub>2</sub> miktarı ve dolayısıyla korozyon hızı sonbahar ve kış aylarında daha fazladır.

Atmosferde korozyona neden olan bir diğer kirletici kükürtlü hidrojen (H<sub>2</sub>S) dir. H<sub>2</sub>S, kükürtlü organik bileşiklerin çürümesinden veya anaerobik koşullarda sülfat indirgeyici bakteri etkisinden oluşur. H<sub>2</sub>S, hızlıca SO<sub>2</sub>'ye yükseltgenir. Etkisi SO<sub>2</sub>'den daha az olmakla birlikte, Cu ve Ag'm lekelenmesi veya renginin değişmesine neden olur.

Doğal ve yapay kaynaklardan gelen azot bileşikleri özellikle amonyum bileşiklerinin pirinç üzerinde çatlaklar oluşturarak korozyona neden oldukları gözlenmiştir.

Amonyum sülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve havada amonyak (NH<sub>3</sub>) sodyum klorür (NaCl) ve magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>) gibi deniz tuzları da atmosferik korozyona neden olurlar.

**Tablo 1.** Katışkıların bölge ve mevsimlere göre atmosferdeki konsantrasyonları

		<i>Katışkıların tipik derişimleri (mg/m<sup>3</sup>)</i>	
	Endüstri Bölgeleri	:	Kış 350 Yaz 100
	Kükürt dioksit	:	Kış 100 Yaz 40
Kükürt trioksit	Kükürt dioksit miktarının yaklaşık % 1 i		
Kükürtlü hidrojen	Endüstri Bölgeleri	:	1.5 – 90
	Kentler	:	0.5 – 1.7 İlk baharda ölçülen değerler
	Kırsal Bölgeler	:	0.15 – 0.45
Amonyak	Endüstri Bölgeleri	:	4.8
	Kırsal Bölgeler	:	2.1
Klorür	Endüstri Kara Böl.	:	Kış 8.2 Yaz 2.7
(Hava örneğinden)	Kırsal Kıyı Böl.	:	Yıllık ortalama 5.4
Klorür	Endüstri Kara Böl.	:	Kış 7.9 Yaz 5.3
(Yağmur örneğinden)	Kırsal Kıyı Böl.	:	Kış 57 Yaz 18
	(Bu değerler mg/l olarak)		
Duman Tanecikleri	Endüstri Bölgeleri	:	Kış 250 Yaz 100
	Kırsal Bölgeler	:	Kış 60 Yaz 15

### Atmosferik Korozyona Etki Eden Diğer Faktörler

#### Su Buharı (Nemlilik)

Su buharı miktarı iklim bölgeleri, mevsimler ve günün saatlerine bağlı olarak değişir.

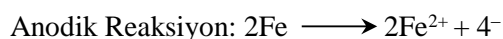
Su buharı korozyon tepkimeleri korozyonda önemli rolü olan elektrolit çözeltilerini oluşturan temel maddedir ve havadaki miktarı bağıl nemlilik olarak verilir.

$$\text{Bağıl nemlilik} = \frac{\text{Havadaki su buharı basıncı}}{\text{Aynı sıcaklıkta hava içindeki doymuş su buharı basıncı (\%)}} \times 100$$

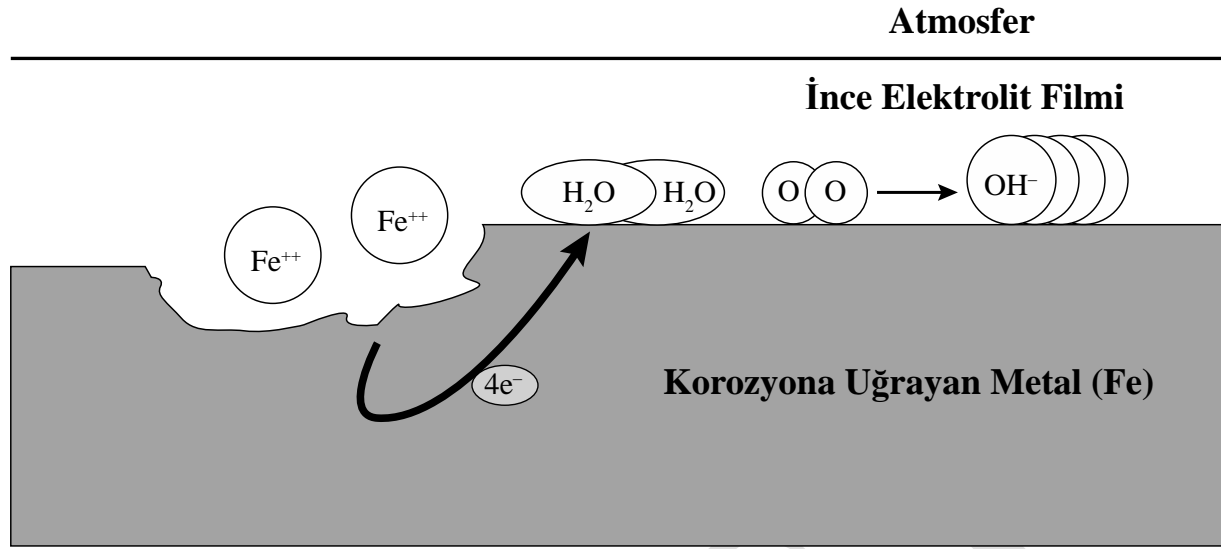
Elektrolit çözeltisi içinde atmosferde çözünmüş oksijen katodik tepkime vericisidir. Kirli havadaki bağıl nemliliğin artmasıyla korozyon olayı yürüeyebilir.

Sıcaklık donma noktasının altında ise örneğin çelik paslanmaz, çünkü su ancak sıvı halde bulunursa korozyon olur.

Korozyon olaylarında elektrolit içinde çözünmüş oksijen katodik tepkime verici olarak etki eder. Elektrolit çözeltisi ince bir film veya damlacık şeklindedir. Bu nedenle de oksijenin hava/elektrolit ara yüzeyinden çözelti/metal ara yüzeyine difüzyonu hızlıdır.



Katodik Reaksiyon:  $O_2 + 2H_2O + 4e^- \longrightarrow 4OH^-$



### Atmosferik Korozyondan Korunma

1. Hava nemliliğini azaltmak
2. Kolay buharlaşan inhibitörler kullanmak
3. İnorganik ve organik kaplamalar
4. Olanaklı olduğunca korozyona dayanıklı metaller kullanmak
5. Boyama (Zn + ZnO) uygulamak

### References

- Abdul-Wahab S, Bakheit C, Siddiqui RA, Al Alawi SM 1968. Atmospheric Corrosion of Metals. *J. Corros. Sci. Eng.*, 15: 1-22.
- Doruk M 2014. *Metalik Malzemeler ve Korozyon*. Korozyon Derneği Yayını, Poyraz Ofset, Ankara.
- Leygraf C, Walinder IO, Tidblad J, Graedel T 2016. *Atmospheric Corrosion*. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Lloyd GO 1990. Silver Jubilee Review: 25 Years of Research in Atmospheric Corrosion. *B. Corros. J.*, 25: 30-33.
- Marcillo M, Almeida E, Marocos M, Rosales B 2001. Atmospheric Corrosion of Copper in Ibero-America. *Corrosion*, 57: 967-980.
- Marcillo M, Chico B, de la Fuente D, Almeida E, Joseph G, Rivero S, Rosales B 2004. Atmospheric Corrosion of Reference Metals in Antarctic Sites. *Cold Regions Sci. Tech.*, 40: 165-178.
- Ramirez Reyes JI, Uruchurtu-Chavarin J, Genesca J, Longaria-Ramirez J 2012. Evaluation of Atmospheric Corrosion in Orizaba, Mexico. *Atmosfera*, 25: 52-55.
- Rosales BM, Vera R, de Rincon OT, Sarli AD, Valenzuela JAR and Tidblad J 2012. Atmospheric Corrosion. *Int. J. Corros.*, Article ID, 174240, pp. 1-16.
- Tullmin M, Roberge PR 2000. *Atmospheric Corrosion*. Uhlig's Corrosion Handbook, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Üneri S 2011. *Korozyon ve Önlenmesi*. Korozyon Derneği Yayını, Poyraz Ofset, Ankara.

## Antileishmania etkili bazı bitkiler

Fusun TEMAMOĞULLARI\*

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa / Türkiye

\*Sorumlu Yazar: farmafto@gmail.com

### Özet

Leishmaniasis zoonotik paraziter bir hastalıktır. Leishmaniasis ülkemizde Güneydoğu ve Akdeniz bölgelerinde görülmektedir. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve istenmeyen etkilerinin olması antileishmania etkili çeşitli bitki özütlerinin tercihine artmasına neden olmuştur. Tedavide bitkilerin özütü veya esansiyel yağları kullanılmaktadır. Dünyada ve ülkemizde Leishmaniasis tedavisinde çukurova fener otu (*Physalis angulata L.*), kekik (*Thymus vulgaris L.*), sarımsak (*Allium sativum*), ve peygamber süpürgesi (*Artemisia annua*) kullanılmaktadır. Bu derlemede Leishmaniasis tedavisinde kullanılan bu bitkiler hakkında bilgi verilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Çukurova fener otu, kekik, sarımsak, peygamber süpürgesi, leishmaniasis, tedavi

### Some plants having antileishmanial effects

Harran University, Department of Pharmacology and Toxicology, Şanlıurfa/Turkey

\*Corresponding author e-mail: farmafto@gmail.com

### Abstract

Leishmaniasis is a zoonotic parasitic disease. Leishmaniasis is observed in Southeast and Mediterranean regions in our country. Development of drug resistance and adverse effects against drugs used in the treatment of this disease caused facilitation of the choices various plant extracts having antileishmanial effect. In treatment, essential oils and extracts of plants are used. In the world and in our country cutleaf groundcherry (*Physalis angulata L.*), thymus (*Thymus vulgaris L.*), garlic (*Allium sativum*) and of sweet wormwood (*Artemisia annua*) are used in leishmaniasis treatment. In this review, you will be given information about plants that are used in the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** Cutleaf groundcherry, thymus, garlic, sweet wormwood, leishmaniasis, treatment.

### GİRİŞ

Leishmaniasis (L) protozoer paraziter bir hastalıktır. Hastalık enfekte dişi tatarcıklar tarafından bulaştırılır. Leishmaniasis'in kutanöz, visseral ve mukokutanöz olmak üzere üç farklı tipi vardır (Harman, 2015). Bu hastalık Afrika, Asya ve Latin Amerika'da daha çok kötü beslenen, barınma problemlili, bağışıklık sistemi zayıf, parazitsiz ve mültecileri etkilemektedir. 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, Irak, Pakistan, Peru, Tunus, Yemen ve Suriye olmak üzere 10 ülkede yüksek oranda kutanöz leishmaniasis görüldüğünü rapor etmiştir. Yine aynı raporda Dünya'da 2016 yılında 1713 kutanöz leishmaniasis'in ithal olduğu ve özellikle Türkiye'de 1089 vaka sayısı ile çok yüksek oranda hastalığın ithal olduğu belirlenmiştir (Anon, 2019). Eroğlu ve Özgöztaş (2019) 'ın kutanöz leishmaniasis ile ilgili yaptığı araştırmada Gaziantep Leishmaniasis tanı ve tedavi merkezine 2012 yılından önce 13 vaka olduğu ancak 2012 yılından sonra Türkiye 'ye sığınmacıların gelmesi ile vaka sayısının 900 olduğunu belirlenmiştir. Hastalığın tedavisinde 1929 yılından buyana 5 değerli antimon kullanılmaktadır. Antimon'un yan etkilerinin görülmesi, ilaca karşı parazitte direnç gelişmesi, ilacın yüksek fiyatlı olması, enjeksiyon yerinde ağrının oluşması tedavideki en önemli problemlerdendir. Hastalığın tedavisinde ayrıca miltefosin, amfoterisin B, paromomisin, ketokonazol ve flukokonazol da kullanılmaktadır. Ancak, bu ilaçların etkinlik oranı ve yan etkilerinin değişken olması kullanılabilirliğini sınırlamıştır (Maleki ve ark., 2018). Tedavide ilaç kullanımı ile ilgili sıkıntılar antileishmania etkili çeşitli bitki özütlerinin tercihine artmasına neden olmuştur. Dünyada ve ülkemizde Leishmaniasis tedavisinde çukurova fener otu (*Physalis angulata L.*), kekik (*Thymus vulgaris L.*), sarımsak (*Allium sativum*), ve peygamber süpürgesi (*Artemisia annua*) kullanılmaktadır. Bu derlemede Leishmaniasis tedavisinde kullanılan bu bitkiler hakkında bilgi verilecektir.

### **Çukurova Fener Otu (*Physalis angulata* L)**

Patlıcangiller ailesindedir. Bitki tropik ve subtropik bölgelerde bulunan birçok ülkede yetişir tedasında (DeOlivera ve ark., 2017). Türkiye 'de Adana, Mersin ve Şanlıurfa illerinde yetişmektedir (Kaya ve ark., 2000; Bükün ve ark., 2005). Farmakolojik olarak karaciğer hastalıkları, tümör ve Trypanosoma cruzi tedasında (DeOlivera ve ark., 2017); antiparazitik, yangı önleyici, antimikrobiyal, gebelik önleyici, bağışıklık sistemini baskılayıcı, astım önleyici, iştetici, tümör önleyici, sıtma ve leishmani karşı kullanılmaktadır Bitki içeriğinde hem leishmaniasis hem de sıtmaya karşı etkili fisalin bulunur (Tariq ve ark., 2016; De Silva ve ark., 2018). Fisalin'in B, D, G ve F olmak üzere 4 farklı çeşidi olduğu ve fisalin B ve F'nin kutanöz leishmaniasis'e etkili olduğu gösterilmiştir (Guimaraes ve ark., 2009). Doza bağlı olarak çukurova fener otunun sulu özütünün L. amazonensis'in hücre içi ve dışı formlarının gelişimini engellediği belirlenmiştir. (Da Silva ve ark., 2015).

### **Kekik (*Thymus vulgaris* L)**

Ballıbabagiller ailesindedir. Beyaz çiçekli keskin kokulu çok yıllık bitkidir. Ülkemizde yaygın yetişir (Kaya, 2008). Yapısında timol, karvakrol gibi uçucu yağlarla tanen bulunur (Baytop, 1984). İran'da deri leishmaniasis 'e karşı rutin tedavide kullanılan Glucantime ile hidroalkolik kekik özütünün ülserasyon üzerine etkisi karşılaştırıldığında kekiğin daha etkili tedavi sağladığı belirlenmiştir (Nilforoushadeh ve ark., 2008). Malatyalı ve ark. (2009) 'larının Mersin (*Myrtus communis*) ve kimyon (*Cuminum cyminum*) ile kekik (*Thymus vulgaris*) yağlarının Leishmania promastigotları üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada Kekik yağının antileishmaniasis etkili olduğu belirlenmiştir.

### **Sarımsak (*Allium sativum*)**

Zambakgiller ailesindedir (Bahmani ve ark., 2017). Çiçekleri yeşilimsi beyaz veya pembe, otsu köklü ve boyu 25-100 cm. 'e kadar ulaşan bir kültür bitkisidir. Sarımsak yapısında allisin, alliin, ajoene, dialil disülfid, dialil trisülfid, S-allil sistein, S-allilmerkaptosistein ve vitaminler (Niasin, A, B1 ve B2) içerir ( Ayaz ve Alpsoy, 2007; Foroutan-Rad ve ark., 2017). Sarımsak içeriğinde bulunan allisin, alliin ve ajoene'nin antileishmaniasis etkili olduğuna dair çeşitli çalışmaların olduğu belirtilen derlemede farklı sarımsak ekstraktları ve sarımsak ürünlerinin özellikle de organosülfür bileşiklerin Leishmaniasis türlerine karşı sitotoksik etkili olduğu in vivo, in vitro ve klinik testlerle kanıtlandığı belirtilmiştir (Foroutan-Rad ve ark., 2017). Sarımsak özütü immun sisteme etki ederek *Leishmania major* üzerinde Leishmaniasidal etkisi belirlenmiştir (Gahavari ve ark., 2011). Farelerde kutanöz leishmaniasis'e karşı allisin 'in etkil olduğu rapor edilmiştir (Shamsi ve ark., 2018).

### **Peygamber süpürgesi (*Artemisia annua*)**

Bileşikgiller ailesinde bulunan bitki yapısında artemisinin içerir. Artemisia bitki cinsinin pekçok çeşidi kura veya yarı kurak iklimin hüküm sürdüğü kuzey ve güney yarım kürede yetişir (Yalçınkaya ve ark., 2017). Artemisinin Leishmania donovani üzerinde apoptozise yol açarak etki ettiği belirlenmiştir (Sen ve ark., 2007). Bitkinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağında bulunan başlıca kamfor ve  $\beta$ -karyofillen'nin visseral leishmaniasis'e karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Islamuddin ve ark., 2014). Peygamber süpürgesi bitkisinin yaprak tozlarının in vitro ve in vivo olarak insanda kutanöz leishmaniasis komplikasyonsuz tedavi potansiyeli olduğu rapor edilmiştir (Mesa ve ark., 2017).

### **Kaynaklar**

- Anon 2019. Leishmaniasis, Situation and trends. [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/)
- Ayaz E, Alpsoy HC 2007. Sarımsak (*Allium sativum*) ve geleneksel tedavide kullanımı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31: 145-149.
- Bahmani M, Abbasi N, Hosseini M, Rafieian-Kopaei M 2017. Concise review: Medicinal plants are effective against leishmaniasis. *Biomedical Research and Therapy*, 4(11): 1775-1784.
- Baytop T 1984. Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün). İstanbul Üniversitesi. Vol. 40 s:253
- Bükün B 2005. Weed flora changes in cotton growing areas during the last decade after irrigation of Harran plain in Sanliurfa, Turkey. *Pakistan J. Bot*, 37: 667-672.
- De Oliveira LFG, Pereira BAS, Gilbert B, Corrêa A L, Rocha L, Alves CR 2017. Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. *Phytochemistry reviews*, 16(2): 219-233.
- Da Silva RRP, Da Silva B J, Rodrigues A P D, Farias L H S, Da Silva M N, Alves DT V, Bastos GNT, Do Nascimento JLM, Silva EO 2015. In vitro biological action of aqueous extract from roots of *Physalis angulata* against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 249:1-10.
- Da Silva B J M, Pereira S W G, Rodrigues APD, Do Nascimento JLM, Silva EO 2018. In vitro antileishmanial effects of *Physalis angulata* root extract on *Leishmania infantum*. *Journal of integrative medicine*, 16(6), 404-410.

- Eroglu F, Ozgoztasi O 2019. The increase in neglected cutaneous leishmaniasis in Gaziantep province of Turkey after mass human migration. *Acta tropica*, 192:138-143.
- Foroutan-Rad M, Tappeh K H, Khademvatan S 2017. Antileishmanial and Immunomodulatory Activity of *Allium sativum* (Garlic) A Review. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(1): 141-155.
- Gharavi M J, Nobakht M, Khademvatan S H, Bandani E, Bakhshayesh M, Roozbehani M 2011. The effect of garlic extract on expression of INF $\gamma$  and inos genes in macrophages infected with *Leishmania major*. *Iranian journal of parasitology*, 6(3): 74.
- Guimaraes E T, Lima MS, Santos L A, Ribeiro I M, Tomassini T B, Ribeiro dos Santos R, Soares M B 2009. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(1): 84-87.
- Harman M 2015. Kutanöz Leishmaniasis. *Turkish Journal of Dermatology*, 9:168-176.
- Islamuddin M, Chouhan G, Want M, Tyagi M, Abdin M, Sahal D, Afrin F (2014) Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against visceral leishmaniasis. *Front Microbiol* 5:1–15
- Kaya S 2008. Tıbbi botanik ve tıbbi bitkiler. Medisan Yayın Serisi, 68: 69-232.
- Kaya M, Yıldırım A, Uygur FN 2000. A New Record for the Flora of Turkey *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Turkish Journal of Botany*, 24(5):93.
- Malatyali E, Özçelik S, Gürsoy N 2009. Kekik (*Thymus Vulgaris*), Kimyon (*Cuminum Cyminum*) Ve Mersin (*Myrtus Communis*) Bitkilerinden Elde Edilen Yağların İn Vitro Antileishmanial Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66(1), 7-13.
- Maleki M, Yousefi M, Tabassi SAS, Rakhshandeh H, Bazzaz SMM, Haghighi G, Hamed SS, Rezaee SA, Haghighi F 2018. Effects of a Traditional Iranian Remedy on Cutaneous Leishmaniasis. *Health Scope*, 7(3):1-6.
- Mesa LE, Vasquez D, Lutgen P, Vélez ID, Restrepo AM, Ortiz I, Robledo SM 2017. In vitro and in vivo antileishmanial activity of *Artemisia annua* L. leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(1), 52-60.
- Nilforoushzadeh MA, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A, Saberi S, Siadat AH, Mahmoudi M 2008. Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. *J Vector Borne Dis*, 45(4), 301-6.
- Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M 2007. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of medical microbiology*, 56(9), 1213-1218.
- Shamsi M, Abbasi N, Mohajer A, Hoseini M, Rafieian-Kopaei M 2018. The most important native medicinal plants effective against cutaneous leishmaniasis in mouse. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 8(2), P1-P7.
- Tariq A, Adnan M, Amber R, Pan K, Mussarat S, Shinwari Z K 2016. Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants against *Plasmodia* and *Leishmania* parasites. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 15, 52:1-13.
- Yalcinkaya E, Özgüç S, Aydınalp A, Zeybek U 2017. Antikanser aktivite araştırmalarında *Artemisia annua* l. Bitkisinin önemi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41(3): 1-8.

## Yılan sokması tedavisinde kullanılan bazı tıbbi bitkiler

Füsun TEMAMOĞULLARI\*

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa / Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:farmafto@gmail.com

### Özet

Özellikle kırsal kesimlerde yaşayan insan ve hayvanlarda akrep sokması ile karşılaşılabilir. İnsanlar gerek kendileri gerekse hayvanlarının tedavileri için geleneksel olarak tıbbi bitkilerden yararlanmışlardır. Dünya'nın birçok yerinde yılan sokmasına karşı çeşitli bitkilerin meyve, yaprak veya bitkinin tamamı kullanılmaktadır. Dünyada de yılan sokması tedavisinde gavur pancarı (*Arum dioscoridis*), limon (*Citrus limon*), pelin otu (*Artemisia absinthium*) ve zakkum (*Nerium oleander*) uygulanmaktadır. Bu derlemede yılan sokması tedavisinde kullanılan bitkiler hakkında bilgi verilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Yılan sokması, Tıbbi bitkiler

### Some plants used in snake bite treatment

Harran University, Department of Pharmacology and Toxicology, Şanlıurfa/Turkey

\*Corresponding author e-mail: farmafto@gmail.com

### Abstract

Especially the people and animals living in rural areas can expose to snake bite. The people benefited different medical plants traditionally in both the treatments of own or their animals. Fruit, leaf or whole part of various plants are widely used in the world against snake bite. Infidel beet (*Arum dioscoridis*), lemon (*Citrus limon*), wormwood (*Artemisia absinthium*) and oleander (*Nerium oleander*) were administered in snake bite in the world. In this review you will be given information about plants that are used in the treatment of snake bite

**Keywords:** Snake bite, medical plants

### Giriş

Yılan sokması tropik ve subtropik ülkelerde hala halk sağlığını tehdit etmektedir. Dünyada 160 ülkede 300 den fazla çeşitli zehirli yılan yaşamaktadır. Dünyada her yıl 5 milyon kişi yılan sokmasına maruz kaldığı ve bunun 2.7 milyonun zehirlendiği sonuç olarak her yıl 81.000-138.000 kişinin öldüğü rapor edilmiştir. Dünyada pek çok insan antivenom bulamadığı veya antivenom ücretini ödeyemediği tespit edilmiştir (Anon, 2019).

Yılan zehrinin içeriği yılanın yaşına, mevsime ve beslenmesine göre değişiklik gösterir. Zehir bezlerinde enzimatik ve enzimatik olmayan zehirli bileşikler karışım halinde depolanır (Gomes, 2010). Zehir kesesinde pıhtılaşmayı önleyici enzimler, ribonükleaz, deoksiribonükleaz, endonükleaz, asetilkolinesteraz, ATPaz, fosfodiesteraz ve nükleosidaz gibi çeşitli enzimler bulunur (Gomez, 2010; Kaya, 2014).

Hastane şartlarına erişimin olmadığı yerlerde yılan sokmasına maruz kalan insanlar tedavi amaçlı çeşitli bitkiler kullanmak zorunda kalmıştır. Dünya da ve Türkiye de halk yılan sokması tedavisinde çeşitli bitkilerden yararlanmışlardır. Bu derlemede ülkemizde yetişen Dünya da zehirli yılan sokmalarının tedavisinde kullanılan bazı bitkiler: limon, yılanıyastığı ve zakkum hakkında bilgi verilecektir.

### Limon (*Citrus limon*)

Sedefotugiller ailesindedir. Limon ağacı kışın yaprak dökmeyen ve beyaz çiçek açan bir ağaçtır. Yapısında hesperidin, uçucu yağlar vitamin C, meyve asitleri, pektin ve müsilaj bulunur (Kaya, 2008). Kolombiya'nın kuzeydoğusunda yılan sokması tedavisinde limon kullanılmaktadır (Arias ve Ramón-Laca, 2005). Olgun limon meyvelerinin etanol özütünün çukur engerek (*Bothrops atrox*) zehri verilen farelerde zehre bağlı oluşan hemorajik etki ve ölüme karşı önemli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Otero, 2000a,b). İnsanlarda yılan zehrine karşı antidot olarak limonun kullanılabilmesi gösterilebilirse genel tedavide kullanılan seruma alternatif sağlanabilir.

### **Yılanyaştığı (*Arum dioscoridis*)**

Yılanyaştığıgiller ailesindedir. Çok yıllık otsu bitki içeriğinde glikosaponin, müsilai, konisin adlı alkaloid, kalsiyum oksalat ve nişasta bulundurur (Kaya, 2008; Yipel ve Yarsan, 2016). Türkiye’de 10 kadar çeşidi bulunur. Ülkemizde yaygın olarak Yılanyaştığı, Gavurpancarı, Sarmalık ve Yılanpancarı ismi ile bilinir (Baytop,1999a). Bitkinin kök ve yaprakları yılan sokmasında merhem şeklinde kullanılır (Tuzlaç ve Aymaz, 2001).

### **Pelin Otu (*Artemisia absinthium*)**

Ülkemizde birçok çeşidi bulunan bitki, bileşikgiller ailesindedir. Aromatik kokulu çiçekli çok yıllık bir bitkidir. Bitkinin yaprakları grimsi veya beyazımsı yeşil parçalıdır. Pelin otu ülkemizde Kuzey, Güney ve İç Anadoluda yetişir. Bitki içeriğinde ester yağları, karoten, vitamin C, sesquiterpen laktonlar (artabsin, absinthin ve anabsinthin) ve tujon bulunur (Baytop, 1999b; Meherremov, 2009; Aberham ve ark., 2010). Nalbantsoy ve ark.'ları (2013) Osmanlı engereğinin zehrine karşı pelinotunun etkili olduğunu ve diğer zehirli yılanların zehirlenmelerinde de denenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

### **Zakkum (*Nerium oleander*)**

Zakkum boyu 4 metreye ulaşan her zaman yeşil olan bir çalılıktır. Zakkum kuraklık ve böceklere dayanıklı olması nedeniyle yaygın görülür. Yaprakları 10 ile 22 cm uzunlukta ince, kenarları düz, kısa saplı, koyu veya gri yeşil renkli, bazı kültürlerinde yapraklar beyaz veya sarı renklidir. Yapraklar bir saptı üçlü gruplar halinde kösele sertliğindedir. Çiçekler 2-6 cm çaplı, beş taç yapraklı ve dalların uçlarında büyük kümeler halinde bulunur. Yaz mevsimi boyunca beyaz, pembe ve kırmızı çiçekler açar.400 farklı kültürü bulunması çiçeklerinin farklı (açık pembe, lila, somon rengi, kayısı rengi, bakır, turuncu gibi) renklerinin görülmesine neden olur. Meyvesi uzun dar kapsüllü 10-12 cm uzunlukta 6-8 mm çapında; içi açıldığında kabarık tohumludur. Meyve kültür bitkilerinde nadir görülür. Bitkini dallarının kırılması veya kesilmesi sırasında beyaz yoğun bir sıvı akar. Zakkum yalnızca Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde görülen çalılıktır. Zakkum, kalp kasında birikme özelliğine sahip kalp glikozidleri içeren zehirli bir bitkidir. Başlıca zehirli kimyasal bileşik digital etkiye benzer kalp glikozidleri oluşturur. En çok neriin(neriosit) ve oleandrin'nin (oleandrosit) yanı sıra digitoksigenin, oleogenin,, diginosit, folinerin, rosagenin, kornevin, pseodokoranin, rutin ve kornetin içerir (Temamoğulları, 2016). Zakkum yaprağı yılan sokması tedavisinde kullanılmaktadır (Gomes ve ark.ları, 2010).

### **Kaynaklar**

- Aberham A, Cicek SS, Schneider P, Stuppner H 2010. Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC–solid phase extraction– nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(20): 10817-10823.
- Anon 2019 Snakebite envenoming <https://www.who.int/snakebites/disease/en/>
- Arias BA, Ramón-Laca L 2005. Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1): 89-95.
- Baytop T 1999a. *Türkiye’de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri. S:361-362.
- Baytop T 1999b. *Türkiye’de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri. S:313.
- Gomes A, Das R, Sarkhel S, Mishra R, Mukherjee S, Bhattacharya S, Gomes A 2010 Herbs and herbal constituents active against snake bite.48:865-878.
- Kaya S 2008 Tıbbi botanik ve tıbbi bitkiler. *Medisan Yayın Serisi*, 68: 244.
- Kaya S 2014 Yılanlar, Zehirli Hayvanlar ve Zehirleri. Veteriner Toksikoloji, Medisan yayınevi, S:445.
- Meherremov S 2009 Pelin Otu (*Artemisia absinthium* L.)-Üzerlik (*Peganum harmala* L.) Karışımının Sıçanlardaki Embriyotrop Etkisinin Araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 15 (2): 211-215
- Otero R, Nu’nez V, Jimenez SL, Osorio RG, Garica ME, Diaz A 2000a Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part II. Neutralization of lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 505–511.
- Otero R, Nu’nez V, Barona J, Fonnegra R, Jimenez SL, Osorio ’ RG, Saldarriaga M, Diaz A 2000b Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III. Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 233–241.
- Tuzlac E, Aymaz PE 2001 Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia*, 72(4), 323-343.
- Yipel M, Yarsan E 2016 Kedi ve köpekler için zehirli bitkiler. Evcil hayvanlarda zehirli bitkiler ve Türkiye’de dağılımları. Nobel Kitapevi, S: 220.



## First record of subgenus *Neotrichoppia* (Acari: Oribatida) in Turkey

Merve Yaşar<sup>1\*</sup>, Şule Baran<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sakarya University, Faculty Arts and Sciences, Department of Biology, Sakarya, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: merve.yasal@ogr.sakarya.edu.tr

### Abstract

The genus *Neotrichoppia* Subías and Iturrondobeitia, 1980, was not previously recorded in Turkey. In this study identification of the first recorded species *Neotrichoppia (Confinoppia) confinis confinis* (Paoli, 1908) is provided. Morphological feature and distribution of the species are also given.

**Keywords:** Acari, Oribatid, *Neotrichoppia*, systematic, first record, Sakarya, Geyve, Türkiye.

### INTRODUCTION

*Neotrichoppia* belongs to Oppiidae family. The characteristic feature of *Neotrichoppia* is five pairs of genital setae, costula present, crista absent, rostrum rounded, sensillus slightly fusiform, mostly unilaterally ciliated. *Neotrichoppia* is located only in the Palearctic region. It contains 3 sub-genera, 8 species and 1 sub-species. *Neotrichoppia (Neotrichoppia)* and *Neotrichoppia (Ancestroppia)* are contained only one species (Subías 2018).

### MATERIALS AND METHODS

Soil, moss and litter samples were taken from 40° 28' 68,9" N - 30° 15' 97,7" E and 40° 28' 67,4" N - 30° 16' 06,3" E coordinate points in Geyve district of Sakarya province. The samples were placed in Berlese funnels and kept for 7 days. Samples were extracted under stereo microscope and bleached with lactic acid. Light microscopy and scanning electron microscopy pictures were taken and species were studied. The terminology was used Balogh (1992).

### RESULTS and DISCUSSION

Oppioidea Sellnick, 1937

Oppiellinae Seniczak, 1975

*Neotrichoppia* Subías e Iturrondobeitia, 1980

*N. (Confinoppia)* Subías y Rodríguez, 1986

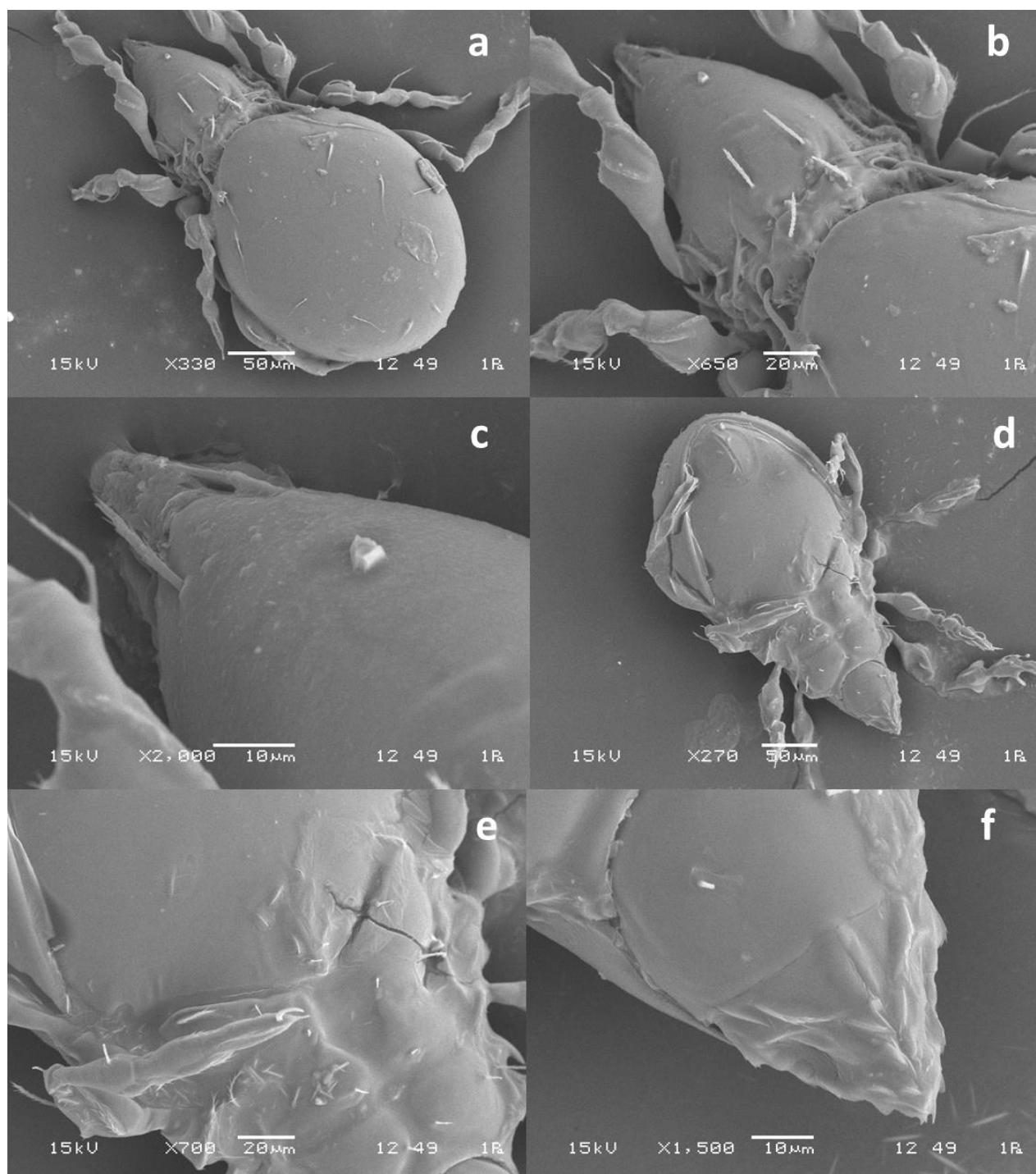
*Neotrichoppia (Confinoppia) confinis* (Paoli, 1908)

*Neotrichoppia (Confinoppia) confinis confinis* (Paoli, 1908)

The body length is 300 µm and the width is 175 µm. Rostrum is rounded. Rostrum setae is straight and serrated with a length of 20 µm. Lamellar setae and Interlamellar setae have equal length and equal distance. Sensillus lanceolate shaped with unilaterally 11 long, end to the shortened ciliate. Exobothridial setae long, setiform and spineless. Notogaster is oval shape. It has ten pairs of setiform thin notogaster setae. c2 setae is stronger than other notogaster setae. The epimer region setae formula is 3-1-3-3. The ventral region have five pairs of genital setae and two pairs of anal setae (Figure 1). All legs have one claw.

The key to the identification of the *Neotrichoppia* sub-genera is given below.

- 1 Aggenital area with one setae .....3  
2 Aggenital areas have more setae .....*Neotrichoppia*  
3 Notogaster with 13 pairs of setae..... *Ancestroppia*  
4 Notogaster with 10 pairs of setae .....*Confinoppia*



**Figure 33.** *Neotrichoppia (Confinoppia) confinis confinis* a.) dorsal b.) prodorsum c.) rostrum region d.) ventral e.) epimeral region f.) mentum and rutellum view

The body measurements of our specimens are consistent with the Paoli (1908) and Bernini (1973). *Neotrichoppia (Confinoppia) confinis* is separated from *N.(C.) confinis tenuiseta* according to the shape of the exobothridial setae. The exobothridial setae of the *Neotrichoppia (Confinoppia) confinis* is long and not barbed, while *N.(C.) confinis tenuiseta* short and barbed. c2 setae of *N. (Confinoppia) confinis confinis* strong and barbed, while *N.(C.) confinis tenuiseta* thin, not barbed and rest of the notogaster.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We wish to thank Prof. Dr. Fatih Üstel and Semih Yücel in Metallurgical and Materials Engineering Department of Sakarya University for scanning electron microscopy investigations

## **REFERENCES**

- Balogh, J. Balogh, P. (1992). The Orihatid mites genera of the world, 2 vol. The Hungarian Natural History Museum. Budapest. 263 pp., 375 pp.
- Bernini, F. (1973). Notulae Oribatologicae VII. Gli Oribatei (Acarida) dell'isolotto di Basiluzzo (Isole Eolie). *Lavori della Società Italiana di Biogeografia*, 3: 355-480.
- Paoli, G. (1908). Monografia del genere *Dameosoma* Berl. e generi affini. *Redia*, 5: 31-91.
- Subías, L. S. (2018) Listado sistemático, sinonímico y biogeográfico de los ácaros oribátidos (Acariformes: Oribatida) del mundo (excepto fósiles). *Graellsia*, 60 (número extraordinario) 3–305.

## Physical Properties and Characterization of Chitosan Films with Rosemary Extract

Nilay Kahya\*, Alara Yolaç, F. Bedia Erim

Istanbul Technical University, Faculty of Science and Letters,  
Department of Chemistry, Istanbul/Turkey

\*kahyan@itu.edu.tr

### Abstract

In this study, chitosan films were prepared and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract was included to films in an attempt to enhance the physical properties of the films. All chitosan films were cross-linked by sodium tripolyphosphate solutions. Rosemary extract modified chitosan films were characterized by various methods. Antioxidant, optical, swelling and water vapor permeability of films were investigated. Modification of pure chitosan films with rosemary extract gained the films significant UV barrier property and increased antioxidant properties. Gravimetric swelling experiments of chitosan films showed that the rosemary extract decreased film' swelling ability. Moreover, water vapor permeability tests resulted that the addition of rosemary extract into chitosan film solutions helped to decrease the permeability of the chitosan films. In conclusion, rosemary extract provided improved physical properties to pure chitosan films which are proposed to be candidate materials in food packaging applications in further.

**Keywords:** Biopolymer; Chitosan; Cross-link; Rosemary.

### INTRODUCTION

Polysaccharides are macromolecules composed of many monosaccharides linked together by glycoside bonds. Chitosan, a polysaccharide based polymer, is deacetylated derivative of chitin, which is the second most abundant polysaccharide in nature just after cellulose. Chitosan is mostly obtained from the exoskeleton of crustacean shells. It is a natural polysaccharide consisting of (1→4) linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine units. Chitosan has been investigated in various studies in terms of its nontoxic, biodegradable and biocompatible characteristics. Chitosan has recently gained a great attention in food industries due to its antibacterial and antioxidant properties. Besides, non-toxic, biodegradable, and good film-forming properties of chitosan provide an advantage for food industries. Recently, many researchers benefit from chitosan' good biopolymer properties by combining this polysaccharide with plant extracts (Kalaycıoğlu et al., 2017).

Rosemary is one of these plants which has been interested in terms of its polyphenol content. It has been reported that rosemary (*Rosmarinus officinalis*) contains many biologically active polyphenolic compounds, including rosmarinic acid and carnosic acid (Borrás-Linares et al., 2014). For this reasons, in this present study, chitosan films cross-linked by tripolyphosphate ion were composed by different amounts of water extract of rosemary to determine the effect of the incorporation of this plant to the films. Following the production of films, the rosemary extract incorporated type chitosan films were then evaluated by characterization techniques with regard to their antioxidant and physical properties by comparison with pure chitosan film.

### MATERIALS AND METHODS

#### Materials

Low molecular weight chitosan (with a degree of deacetylation 75–85%, viscosity 20–300 cP) and sodium tripolyphosphate were purchased from Sigma-Aldrich. Acetic acid (99%) and glycerol (≥99.5%) were obtained from Merck. Commercial dried samples of rosemary were from a local market in Istanbul.

#### Preparation of Films

A stock chitosan solution was prepared in 1% (v/v) aqueous acetic acid solution. In order to prepare the pure chitosan film, a certain amount of chitosan solution was taken from the stock solution and the total volume was completed to 25 mL with acetic acid solution after addition of glycerol. Chitosan solution was stirred to obtain a homogeneous solution and sonificated 5 minutes to remove bubbles before casting the film solutions onto plastic Petri dishes. The films were dried in oven.

In order to prepare rosemary extract included film solutions, firstly, certain amounts of dry plant was extracted in boiling water for 15 minutes. The extracts were filtered from 0.45 µm pore sized cellulose acetate

microfilters. The certain volume of these plant extract solutions was taken and added to the necessary amount of chitosan solution which were provided from the stock chitosan solution. Following the addition of plasticizer, the final volume of this film solution was completed with 1% acetic acid solution to 25 mL. The producing steps were same with pure chitosan film preparation. All chitosan films were cross-linked in sodium tripolyphosphate solutions and dried at room temperature.

## RESULTS and DISCUSSION

The antioxidant activity of films was determined by the commonly used DPPH method. It was resulted that an increasing amount of rosemary in chitosan film formulation provided to chitosan films a significant antioxidant activity. The highest antioxidant activity was reached by the highest amount of the rosemary plant containing extract modified chitosan film. Light transmittance experiments were done between 200 and 800 nm wavelength. It was observed that both chitosan and rosemary extract modified chitosan films are transparent in visible region. The incorporation of rosemary did not affect the transparency of the films significantly. All chitosan-based composite films showed remarkable transparency at visible range. On the other hand, the increased amount of rosemary in chitosan films helped to chitosan films to gain UV barrier property. Ionically cross-linked chitosan films were treated to swelling experiments in distilled water and it was observed that rosemary extract decreased the swelling of films in a reasonable level. Besides, to determine the water vapor permeability of films, the films were treated in certain temperature and humidity conditions. Rosemary extract incorporated chitosan films permeability decreased step by step with the increment of plant in film formulation.

## CONCLUSION

In conclusion, the physical properties of rosemary extract modified chitosan films' properties were investigated in this study. The plant extract incorporation to chitosan films provided a remarkable enhancement to the antioxidant activity of pure chitosan films. Moreover, light transmission experiment, swelling test and water vapor permeability investigation of chitosan films showed that the rosemary extract added to chitosan films enabled to enhance the physical property chitosan films with comparison to pure chitosan films. Hereby, rosemary extract modified chitosan films of this study are recommended to be a food coating material as an application field.

## REFERENCES

- Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, Arráez-Román D, Švarc-Gajić J, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. 2014. Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11): 20585–20606.
- Kalaycıoğlu Z, Torlak E, Akın-Evingür G, Özend İ, Erim FB. 2017, Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract, *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 882-888.

## Technological importance of asteroid mining

Senem Çabuk<sup>1\*</sup>, Nazım Çabuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara University, Faculty of Science, Department of Astronomy and Space Sciences, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Ankara University, Faculty of Engineering, Department of Physics Engineering, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: secabuk@ankara.edu.tr

### Abstract

With the ever-growing demands of the population and the ever-growing world of consumption and technology, the resources of the planet Earth are limited. According to Cohen (2007), some of the Earth's major resources, such as metals and minerals needed to develop the technology and food industries, may be depleted within the next 40-50 years, based on known terrestrial reserves and increased consumption. For industrial and technological development of humanity, new discoveries are needed in future realization as well as future discoveries. Asteroids are celestial bodies of scientific importance to reveal the formation, chemical composition and evolution of the Solar System. As the name implies, "Near Earth Asteroids", metal have been found to be potentially close to possible because they are sufficiently close and can be found in precious metals and minerals. The reservoirs of important substances such as water, metals and semiconductors can be found in these celestial bodies. Although the Asteroids and the Earth are composed of the same elements, the Earth's relatively stronger gravity has attracted all the heavy elements to its core over time. An asteroid rain deprived of such valuable elements results in the formation of gold, cobalt, iron, manganese, molybdenum, nickel, osmium, palladium, platinum, rhenium, radium, ruthenium and tungsten elements (from the core to the surface). Today, these metals are extracted from the Earth's crust and are required for economic and technological advancements. Therefore, the geological history of the Earth can be a very good step for the future of asteroid mining.

**Keywords:** Asteroid mining, REEs, technology, metals.

### 1. INTRODUCTION

Asteroids are celestial bodies that are of fundamental scientific importance for uncovering the formation, composition and evolution of the solar system (Badescu 2013). Mining an asteroid is a concept that even predates space programs, as an idea initially proposed in the early 20th century by Konstantin Tsiolkovsky. Recent analysis suggests that specially Near-Earth Asteroids (NEAs) are close enough and could contain billions of dollars worth of precious metals and minerals. Reservoirs of important substances such as water, metals and semiconductors can be found in these celestial bodies.

The extraction of volatiles is currently the most realistic near-term asteroid mining application. Therefore, several concepts for extraction and supply of water were developed recently (Badescu 2013). These concepts consider water extraction for refueling of spacecraft, radiation shielding, and potable water for life support systems in outer space (Hellgren 2016).

In the last twenty years, a vast amount of data and results from space missions have been collected. Observations from spacecraft are mainly used to complement theories and findings which were deduced from ground based asteroid data (Badescu 2013). Although a fullscale exploitation of space resources has not been achieved yet, some minimal asteroid samples have been retrieved for analysis and testing on earth. The number of discovered NEAs goes beyond 15000, with an average of 30 new asteroids discovered per week (<https://www.nasa.gov/planetarydefense/faq/>). However, estimates from ground based observations do not guarantee the accurate composition of asteroid candidates. Therefore, spacecraft are required for in-situ measurements complementing the data and establishing a clear candidate for exploitation. Current missions for asteroid mining consider spacecraft prospection as a first step before the extraction process. Prospection itself usually falls into three different phases (Badescu 2013): discovery, remote characterization, local characterization. These last two characterization phases are endeavors currently pursued by asteroid mining companies using small spacecraft (<https://www.planetaryresources.com/missions/arkyd-301/>). However, recent advances in the miniaturization of spacecraft components and mining equipment may allow for a more cost effective and reliable approach to mine NEAs overall (Calla vd. 2018).

In this article we briefly discussed the need for asteroid mining for materials required by technology.

## 2. WHAT IS AN ASTEROID?

Asteroid, any of the many small rocky or metallic objects in the Solar System, mostly lying in a zone (the asteroid belt) between the orbits of Mars and Jupiter; also known as a minor planet. They range in diameter from almost 1000 km for Ceres down to less than 10 m for the smallest so far detected. The total mass of all asteroids is  $4 \times 10^{21}$  kg, about one-twentieth the mass of the Moon (Oxford, A Dictionary of Astronomy, 2018). They are made from different kinds of rock and metals, with the metals being mostly Ni and Fe. Some of them called "minor planets" but they are smaller than the planets or their moons. Since Chladni (1794) published "On the Origin of the Pallas Iron and Others Similar" to it, and on "Some Associated Natural Phenomena" and made plausible the hypothesis that rocks could fall from the sky, the definition of the word meteorite has remained essentially unchanged, as reflected in the ten quotations given above. Nearly all modern reference works use a similar definition. Meteorites are almost always defined to be solid bodies that have fallen through the Earth's atmosphere and landed on the Earth's surface (Rubin A.E. and Grossman J.N., 2010).

## 3. CLASSIFICATION OF ASTEROIDS

The first more complete asteroid taxonomy was based on a synthesis of polarimetry, radiometry, and spectrophotometry, using a survey of 110 asteroids [1]. The defined a class C for dark carbonaceous objects, a class with the label S for siliceous objects, and X for objects that did not fit either class. This system has the disadvantage that it was not detailed enough and is based on the exclusion principle. The groundwork for the most complete taxonomy, that significantly expands the previous taxonomy has been proposed by Tholen (Tholen 1984).

Asteroids are divided into three categories according to their structure.

### 3.1. C-Type

C-type (carbonaceous) asteroids are the most common variety, forming around 75% of known asteroids. They are distinguished by a very low albedo because their composition includes a large amount of carbon, in addition to rocks and minerals. They occur most frequently at the outer edge of the asteroid belt, 3.5 astronomical units (AU) from the Sun, where 80% of the asteroids are of this type, whereas only 40% of asteroids at 2 AU from the Sun are C-type. The proportion of C-types may actually be greater than this, because C-types are much darker (and therefore less detectable) than most other asteroid types except and others that are mostly at the extreme outer edge of the asteroid belt (Binzel vd. 1989).

The C symbol in the asteroid species represents carbon and the surface of such asteroids is almost as black as coal. This type of asteroid contains large amounts of rock and metals, as well as large amounts of carbon molecules. They are very similar in composition to carbonaceous 'chondrite' meteorites. Hydrated minerals are present in C-type asteroids. These meteorites are thought to be fragmented during collisions between C-type asteroids.

### 3.2. S-Type

Accounts for about 17 percent of known asteroids. Relatively bright with an albedo of 0.10-0.22. Composition is metallic iron mixed with iron- and magnesium-silicates. S-type asteroids dominate the inner asteroid belt (<https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/text/asteroids.txt>).

The S-asteroid class includes a number of distinct compositional subtypes [designated S(I)-S(VII)] which exhibit surface silicate assemblages ranging from pure olivine (dunites) through olivine-pyroxene mixtures to pure pyroxene or pyroxene-feldspar mixtures (basalts). S-asteroid absorption bands are weaker than expected for pure silicate assemblages, indicating the presence of an additional phase, most probably FeNi metal, although the abundance of metallic or feldspar components is not well constrained. The diversity within the S-class probably arises from several sources, including the coexistence of undifferentiated, partially differentiated, and fully differentiated objects within the general S-asteroid population and the exposure of compositionally distinct units from within metamorphosed and partially and fully differentiated parent bodies (Gaffey 1993). These asteroids have abundant Fe, Ni, Mg, Mo, Al, Ti and Co elements on their surface. In addition, Au, Pt and Ra are also very abundant. Because its composition resembles our planet, It is possible to build structures in space without taking material from Earth.

### 3.3. M-Type

M-type asteroids are asteroids of partially known composition; they are moderately bright (albedo 0.1–0.2). Some are made of nickel–iron, either pure or mixed with small amounts of stone. These are thought to be pieces of the metallic core of differentiated asteroids that were fragmented by impacts and are thought to be the source of iron meteorites. M-type asteroids are the third most common asteroid type (Rivkin vd. 2000). M-type spectra are flat to reddish and usually devoid of large features, although subtle absorption features longward of 0.75  $\mu\text{m}$  and shortward of 0.55  $\mu\text{m}$  are sometimes present (Bus and Binzel 2000).

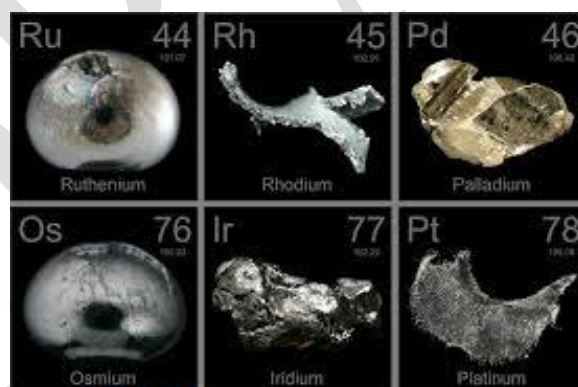
16 Psyche is the largest M-type asteroid. 21 Lutetia, probably non-metallic object, was the first M-type asteroid to be imaged by a spacecraft when the Rosetta space probe visited it on July 10, 2010. Another M-type asteroid, 216 Kleopatra, was imaged by radar by the Arecibo Observatory in Puerto Rico and has a dog bone-like shape (Lupishko vd. 1982).

## 4. ASTEROID MINING

Asteroid mining offers the possibility to revolutionize supply and availability of many resources vital for human civilization. Analysis suggests that Near-Earth Asteroids (NEA) contain enough volatile and high value minerals to make the mining process economically feasible. Considering possible applications, specifically the mining of water in space has become a major focus for near-term options. Most proposed projects for asteroid mining, however, involve spacecraft based on traditional designs resulting in large, monolithic and expensive systems (Calla 2018).

Asteroid mining has been proposed as an approach to complement Earth-based supplies of rare earth metals and supplying resources in space, such as water. However, existing studies on the economic viability of asteroid mining have remained rather simplistic and do not provide much guidance on which technological improvements would be needed for increasing its economic viability. Both, in-space resource provision such as water and return of platinum to Earth are considered (Hein vd. 2018).

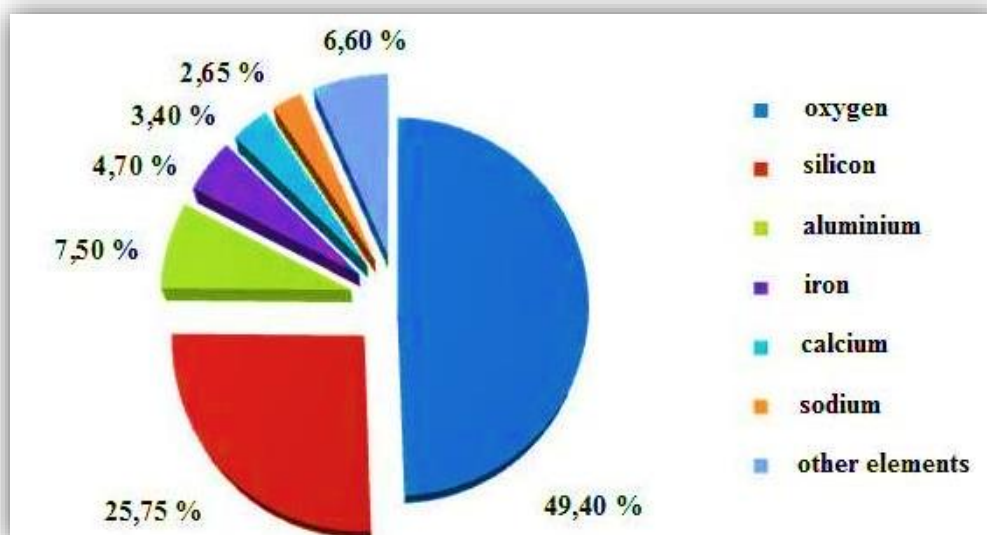
Existing research on asteroid mining has mainly looked into its economic viability technological feasibility, cartography of asteroids and legal aspects. More recently, environmental arguments for asteroid mining have been made, in particular with regards to platinum group metals (Hein vd. 2018).



**Figure 1.** Platinum Group Metals (PGMs)

Although the asteroids and Earth were composed of the same elements, the relatively stronger gravity of the Earth attracted all the heavy elements to its core in its molten youth more than four hundred years ago. An asteroid rain, deprived of such valuable elements, produces gold, cobalt, iron, manganese, molybdenum, nickel, osmium, palladium, platinum, rhenium, radium, ruthenium and tungsten (in a flow from the core to the surface) (Brenan ve McDonough 2009). Today, these metals are extracted from the Earth's crust and are essential for economic and technological advances. Therefore, the geological history of the Earth can be a very good stage for the future of asteroid mining.





**Figure 2.** Percentage distribution of elements on earth (Helešicová M., 2014)

Earth-approaching asteroids could provide raw materials for space manufacturing. For certain asteroids the total energy per unit mass for the transfer of asteroidal resources to a manufacturing site in high Earth orbit is comparable to that for lunar materials. For logistical reasons the cost may be many times less. Optical studies suggest that these asteroids have compositions corresponding to those of carbonaceous and ordinary chondrites, with some containing large quantities of iron and nickel; others are thought to contain carbon, nitrogen, and hydrogen, elements that appear to be lacking on the moon. The prospect that several new candidate asteroids will be discovered over the next few years increases the likelihood that a variety of asteroidal resource materials can be retrieved on low-energy missions (O'Leary 1977).

## 5. WHY IS ASTEROID MINING NEEDED?

The exploitation of asteroids, and in particular Near Earth Asteroids (NEAs) has been repeatedly proposed as a source of resources for Earth and space (Lewis 1996). Ross (2001), distinguishes between metals and volatiles as resources along with their use in a variety of applications such as construction, life support systems, and propellant. In particular, volatiles have received attention for inspace use, due to their relative ease of extraction. For example, Calla et al. (2018) explored the technological and economic viability of supplying water from NEAs to cislunar orbit.

Only resources with a high value to mass ratio are interesting, due to the high cost of returning such material. Therefore, high-value metals such as rare earth metals and in particular the subgroup of platinum group metals have been the subject of mining studies (Andrews vd. 2015). The supply of rare earth metals is crucial for many "green technologies" such as fuel cells, catalyzers, high capacity batteries, and solar cells. More accessible than the Moon, near-Earth asteroids are comprised of natural resources that will accelerate humanity's exploration and development of deep space.

The rare earth elements (REE) form the largest chemically coherent group in the periodic table. Though generally unfamiliar, the REE are essential for many hundreds of applications. The versatility and specificity of the REE has given them a level of technological, environmental, and economic importance considerably greater than might be expected from their relative obscurity.

**Table 1.** 10 most valuable asteroids according to (Asteroid Database and Mining Rankings) database

Name	Type	a (AU)	e	Value (\$)	Est. Profit (\$)	$\Delta v$ (km/s)	MOID (AU)	Group
Davida	C	3.165	0.188	>100 trillion	>100 trillion	11.145	1.593070	MBA
Chicago	C	3.890	0.024	>100 trillion	>100 trillion	11.704	2.782950	OMB
Alauda	B	3.192	0.017	>100 trillion	>100 trillion	12.758	2.120800	MBA
Diotima	C	3.066	0.036	>100 trillion	>100 trillion	11.224	1.942490	MBA
Palma	B	3.150	0.259	>100 trillion	>100 trillion	11.988	1.446870	MBA
Winchester	C	3.006	0.339	>100 trillion	>100 trillion	10.423	1.088250	MBA
Kreusa	C	3.167	0.158	>100 trillion	>100 trillion	10.791	1.704160	MBA
Stereoskopia	C	3.376	0.119	>100 trillion	>100 trillion	10.768	1.978950	OMB
Chiron	Cb	13.669	0.380	>100 trillion	>100 trillion	11.922	7.471030	CEN
Siegena	C	2.900	0.169	>100 trillion	>100 trillion	11.557	1.440160	MBA

High-technology and environmental applications of the rare earth elements (REEs) have grown dramatically in diversity and importance over the past four decades. As many of these applications are highly specific, in that substitutes for the REEs are inferior or unknown, the REEs have acquired a level of technological significance much greater than expected from their relative obscurity. Although actually more abundant than many familiar industrial metals, the REEs have much less tendency to become concentrated in exploitable ore deposits. Consequently, most of the world's supply comes from only a few sources (Haxel vd. 2002).

The diverse nuclear, metallurgical, chemical, catalytic, electrical, magnetic, and optical properties of the REEs have led to an ever-increasing variety of applications. The material required by all technological devices to be developed in these areas will not be able to meet the needs of the growing population. At this point, demands can be met by asteroid mining.

Extraterrestrial resources should be the basic sources of materials for the development of humankind civilization in space as well as they could replace the Earth's resources when they would be exhausted. They can be obtained from the planets, their moons or asteroids, primarily NEOs but also from the asteroid belt. Taking into account the homogenous spatial distribution of metallic grains (proved by author's microscopic observations) and knowing the amount of FeNi minerals in rocks with H chondrite composition, the amount of potential FeNi resources on H parent bodies can be calculated. It was estimated that the iron resources from Hebe's FeNi minerals would cover 1.3 million years of terrestrial mining production whereas nickel resources would last for approximately 100 million years. A small NEO asteroid like (143624) 2003 HM16 (2 km in diameter) has resources comparable with 15 months of mining iron production and over 100 years of nickel production at present rate (Blutstein vd. 2018).

## CONCLUSION

We need to learn about the mineral ratios of asteroids and those that are future economically valuable raw materials. In this context, the Hayabusa (Fujiwara et al. 2006) and Stardust (Brownlee et al. 2006) projects returned material samples from the S-type NEO Itokawa and comet 81P / Wild2 to the Earth and took more samples, respectively. These tasks (eg Hayabusa-2: Saiki et al. 2013; OSIRIS-REx: Lauretta et al. 2012) are currently under development and are not intended to generate economic profit. The approximate number of metal-rich asteroids has been investigated for a very long time.

Although it will reduce employment within the traditional labor-intensive mining industry, it will also provide the opportunity for a technological development boost that will spawn entirely new job sectors. Society will also benefit from new capabilities arising from increased access to previously rare materials (Welch 2010).

There are more than 16,000 asteroids close to Earth. Asteroids serve as a station for life in space and include resources to carry a new journey and the continuation of the human generation to different planets.

## REFERENCES

- Badescu, V. 2013. Asteroids: Prospective Energy And Material Resources, Springer Science & Business Media.
- Binzel, R.P., Farinella, P., Zappala, V. and Cellino, A. 1989. Asteroid rotation rates-Distributions and statistics. IN: Asteroids II; Proceedings of the Conference, Tucson, AZ, Mar. 8-11, 1988 (A90-27001 10-91). Tucson, AZ, University of Arizona Press, 1989, p. 416-441.
- Blutstein, K., Przylibski, T.A., and Łuszczek, K. 2018. Zawartość minerałów FeNi w chondrytach H jako wskaźnik zasobności pozaziemskich skał rudonośnych w wybrane metale Concentration of FeNi minerals in H chondrites as an indicator of extraterrestrial ore-bearing rocks wealth in selected metals *Przeł'd Geologiczny*, vol. 66, nr 12.
- Brenan, J.M. and McDonough W.F. 2009. Core Formation And Metal–Silicate Fractionation of Osmium And Iridium From Gold. *Nature Geoscience*, vol 658.
- Brownlee, D., Tsou, P., Aléon, J., Alexander, C.M. O.'D., Araki, T., Bajt, S., Baratta, G.A., Bastien, R., Bland, P., and Bleuet, P. 2006. Comet 81P/Wild 2 Under a Microscope. *Science*, Volume 314, Issue 5806, pp. 1711.
- Bus, S. J., and Binzel, R.P. 2002. Phase II of the Small Main-Belt Asteroid Spectroscopic Survey. A Feature-Based Taxonomy. *Icarus*, Volume 158, Issue 1, p. 146-177.
- Calla, P., Fries, D. and Welch C. 2018. Asteroid Mining With Small Spacecraft And Its Economic Feasibility. *Acta Astronautica*, eprint arXiv:1808.05099.
- Cohen, M. 2007. Networks of Absolute Calibration Stars for SST, AKARI, and WISE. The Future of Photometric, Spectrophotometric and Polarimetric Standardization, ASP Conference Series, Vol. 364, Proceedings of a conference held 8-11 May, 2006 in Blankenberge, Belgium. Edited by C. Sterken. San Francisco: Astronomical Society of the Pacific, 2007., p.333.
- Haxel, G.B., Hedrick, J.B. and Orris, G.J. 2002. Rare Earth Elements—Critical Resources for High Technology. U.S. Geological Survey Fact Sheet 087-02.
- Hellgren, V. 2016. Asteroid Mining: A Review Of Methods And Aspects. B.S. thesis, Lund University.
- Lauretta, D. S., Barucci, M. A., Bierhaus, E. B., Brucato, J. R., Campins, H., Christensen, P. R., Clark, B. C., Connolly, H. C., Dotto, E., and Dworkin, J. P. 2012. The OSIRIS-REx Mission — Sample Acquisition Strategy and Evidence for the Nature of Regolith on Asteroid (101955) 1999 RQ36. Asteroids, Comets, Meteors 2012, Proceedings of the conference held May 16-20, 2012 in Niigata, Japan. LPI Contribution No. 1667, id.6291.
- Norton, O.R. 2002. The Cambridge Encyclopedia of Meteorites. The Cambridge Encyclopedia of Meteorites, by O. Richard Norton, pp. 374. ISBN 0521621437. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- O'Leary, B. 1977. Mining the Apollo and Amor Asteroids. *Science*, Volume 197, Issue 4301, pp. 363-366.
- Rubin, A.E., and Grossman, J.N. 2010. Meteorite And Meteoroid: New Comprehensive Definitions. *Meteoritics & Planetary Science* 45, Nr 1, 114–122.

- Tholen, D. J. 1984. Asteroid Taxonomy From Cluster Analysis Of Photometry. Ph.D. Thesis, University of Arizona, Tucson, 1984, 166 pp.
- Welch, C. Yi, S., and Lasslop, A., 2010. Asteroid mining Technologies Roadmap and Applications (ASTRA). International Space University.

DRAFT

## Nitrik asit çözeltilerinde malahit cevherinin liç koşullarının yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyonu

Zümra Bakıcı Tanaydın<sup>1\*</sup>, Mehmet Kayra Tanaydın<sup>1</sup>, Nizamettin Demirkıran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye.

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: cheamicalengineer@gmail.com

### Özet

Oksitli bir bakır cevheri olan malahitten hidrometalurjik yöntemle bakır ve bileşiklerini üretmek için cevher ilk olarak liç işlemine tabi tutulur ve bünyesindeki bakır sulu çözeltilere alınır. Daha sonra uygun yöntemler yardımıyla çözeltideki bakır metalik halde veya bileşikleri halinde elde edilebilir. Bu çalışmada, bakır bileşiklerini üretmek amacıyla malahit cevherinin nitrik asit çözeltilerindeki çözünürlüğü için optimum koşullar yanıt yüzey yöntemiyle (YYY) belirlenmiştir. Malahitin çözünme verimi üzerinde etkileri olan nitrik asit derişimi, reaksiyon sıcaklığı, katı/sıvı oranı ve karıştırma hızı parametreleri bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve bu parametre değerlerini optimize etmek için yanıt yüzey yöntemlerinden (YYY) biri olan merkezi kompozit tasarım (MKT) uygulanmıştır. Deneysel bulgulara çoklu regresyon analizi yapılmış ve cevherdeki bakırın en yüksek miktarda çözeltilere geçtiği şartları veren model denklemi oluşturulmuştur. Nitrik asit derişimi, reaksiyon sıcaklığı, katı/sıvı oran ve karıştırma hızı için optimum değerler olarak sırasıyla 0.5 M, 50°C, 0.004 g/mL ve 600 rpm belirlenmiştir. Belirtilen optimum koşullar altında 120 dk reaksiyon süresi sonunda cevherdeki bakırın % 99'unun çözünerek çözeltilere geçtiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Malahit, liç, nitrik asit, yanıt yüzey yöntemi, optimizasyon.

### Optimization of leaching conditions of malachite ore by response surface method in nitric acid solutions

#### Abstract

In order to produce copper and its compounds by hydrometallurgical method from malachite, which is an oxide copper ore, the ore is first leached and the copper is taken into the aqueous solution. The copper in the solution can then be obtained in metallic form or as compounds by suitable methods. In this study, the optimum conditions for the solubility of malachite ore in nitric acid solutions in order to produce copper compounds were determined by response surface method. Nitric acid concentration, reaction temperature, solid / liquid ratio and mixing speed parameters having effects on dissolution efficiency of malachite were selected as independent variables and central composite design (CCD), one of the response surface methods (RSM), was applied to optimize these parameter values. Multiple regression analysis was carried out to the experimental findings and a model equation was created which gave the conditions where the copper in the ore passes to the highest amount of solution. Optimum values for nitric acid concentration, reaction temperature, solid / liquid ratio and stirring speed were determined as 0.5 M, 50 ° C, 0.004 g / mL and 600 rpm, respectively. It was found that at the end of the 120 min reaction time under the optimum conditions, 99% of the copper in the ore dissolved and passed into solution.

**Keywords:** Malachite, leaching, nitric acid, response surface method, optimization.

#### GİRİŞ

Bakır, insanlık tarihinde çeşitli alanlarda kullanılan en eski metaldir. İlk çağlarda insanlar bakır günlük hayatlarında süs eşyası ve el sanatlarında kullanmış olup, bunun yanı sıra elektrik ve ısı iletkenliğinin iyi olması, parlak ve güzel rengi, işlenebilirliğinin kolay olması, geri kazanımı en fazla olan metal olması, katalizör olarak kullanılması da bakır geniş bir alanda kullanımını sağlamıştır. Bakırın kullanım alanının fazla olması bakıra olan talebi arttırmış ve bu talep arttıkça bakır cevheri rezervlerinin azalması kaçınılmaz olmuştur. Bu nedenle artan talebi karşılamak üzere yeni bakır üretim yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Tanaydın, 2010),(Kökeş, 2013).

Bakır yaygın olarak sülfürlü ve oksitli bakır cevherlerinden pirometalurjik ve hidrometalurjik yöntemlerle üretilir[3]. Pirometalurjik yöntemlerin maliyetinin yüksek olması, yüksek sıcaklık gerektirmesi, kuru ortam sağlanması gerektiği ve bundan dolayı yüksek oranda SO<sub>2</sub> gazı oluşumu ile doğaya zararlı etkisi, hidrometalurjik işlemlerin ise sulu ortamda yapılması, boru hatları ile malzeme ve kimyasal taşınımı, kullanılan kimyasalın hem cevherden elde edilebilmesi hem de yüksek saflıkta arıtıldıktan sonra tekrar



### Deneyel dizayn ve optimizasyon

Maksimum bakır liçinin optimum işlem koşulları cevap yüzey yöntemi (CYY) kullanılarak merkezi kompozit dizayn (MKD) tasarımı ile belirlenmiştir. Regresyon analizi, istatistiksel analizler ve optimizasyon Design Expert 6.0 yazılımıyla yapılmıştır. Yapılan literatür taraması sonucu sıcaklık, karıştırma hızı, katı/sıvı oranı ve nitrik asit konsantrasyonu bakır liçi üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu dört parametre bağımsız değişken olarak seçilmiş ve beş seviyeli olarak belirlenmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin bakır liçi üzerine (bağımlı değişken) etkileri incelenmiştir. Toplam 30 deneme cevap değişkenini tahmin etmek için kullanılmıştır. Dizayn için merkez değerler sıcaklık 40 °C, konsantrasyon 0.35 M, karıştırma hızı 475 rpm ve katı/sıvı oranı 0.007 g/mL olarak seçilmiştir. Seçilen bağımsız parametreler ve onların seviyeleri Tablo 2’de verilmiştir. Liç süresi 120 dakika tüm deneyler için sabit tutulmuştur.

**Tablo 2.** Deneyel Dizayn Parametreleri

Bağımsız parametreler	Notasyon	Bağımsız değişkenlerin seviyeleri				
		-2	-1	0	+1	+2
Sıcaklık , (°C)	A	20	30	40	50	60
Konsantrasyon, (mol/L)	B	0.05	0.2	0.35	0.5	0.65
Karıştırma hızı, (rpm)	C	225	350	475	600	725
Katı/sıvı oranı, (g/mL)	D	0.001	0.004	0.007	0.01	0.013

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Tablo 3’de cevap değişkeni olan bakır liçinin yüzdesini belirlemek için deneylerde kullanılan bağımsız değişkenler ve bu bağımsız değişkenlerin gerçek değerleri gösterilmiştir.

Design Expert yazılımı yardımıyla elde edilen ANOVA (varyans) analizi sonuçları Tablo 4’de verilmiştir. Önerilen modeldeki etkin parametre sayısı oldukça fazla olduğu söylenebilir. A,B,C,D, AD, BD, A<sup>2</sup> ve B<sup>2</sup> terimlerinin 0.05’den küçük olduğu yani bu model için önemli olduğu görülmektedir. Model terimlerinin 0.05’den büyük olan değerleri önemli sayılmamaktadır. A,B,C,D parametrelerinin lineer etkileri, A ve B’nin üstel etkileri, AD ve BD’ nin ise birbiriyle etkileşimlerinin model denkleminde önemli olduğu tablodan görülmektedir.

Liç işleminde bakırın çözünmesi için modeldeki varyasyon miktarının bir ölçümü olan R<sup>2</sup> (0.9595) ve modeldeki değişim miktarı ölçümünü düzeltilmiş terimler ile ifadesini sağlayan R<sup>2</sup><sub>adj</sub>(0.9217) değerlerinin oldukça yüksek olması model uyumunun oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

**Tablo 3.** Dizayn Matrisi ve Deneylerin Sonuçları

Deney sırası	A: Sıcaklık (°C)	B:Konsantrasyon (mol/L)	C:Karıştırma hızı (rpm)	D:Katı/sıvı oranı (g/mL)	%Cu
1	50	0.2	350	0.004	80
2	50	0.5	350	0.01	65
3	20	0.35	475	0.007	77
4	50	0.5	600	0.004	98
5	30	0.2	350	0.004	65
6	50	0.5	350	0.004	95
7	40	0.35	475	0.007	76
8	30	0.5	600	0.004	92
9	40	0.35	475	0.013	60
10	30	0.5	350	0.01	72
11	40	0.35	725	0.007	82
12	40	0.35	475	0.007	79
13	30	0.2	600	0.004	69
14	40	0.35	475	0.001	98
15	50	0.2	600	0.01	68
16	40	0.35	225	0.007	72
17	50	0.2	350	0.01	66
18	50	0.2	600	0.004	86
19	30	0.5	350	0.004	83

20	60	0.35	475	0.007	92
21	40	0.35	475	0.007	77
22	30	0.2	350	0.01	60
23	50	0.5	600	0.01	74
24	30	0.2	600	0.01	63
25	40	0.05	475	0.007	42
26	40	0.35	475	0.007	79
27	40	0.65	475	0.007	85
28	40	0.35	475	0.007	79
29	30	0.5	600	0.01	72
30	40	0.35	475	0.007	74

Bulunan sonuçların istatistiksel değerlendirmesinden sonra bakırını maksimize eden şartlar optimize edilmiştir. Nitrik asit çözeltisinin oksitli bakır cevheri olan Malahitin çözünmesinde bakırın en yüksek miktarda çözeltiye geçtiği şartlar; liç sıcaklığı 50 °C, nitrik asit konsantrasyonu 0.5 mol/L, katı/sıvı oranı 0.004 g/mL ve karıştırma hızı 600 rpm olarak bulunmuştur. Bu şartlar altında liç süresi 120 dk tutularak malahit cevherinden bakırın liç verimi %99 olarak bulunmuştur.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada, malahit cevherinin nitrik asit çözeltilerindeki çözünürlüğü yüzey yanıt yöntemiyle incelenmiş ve cevherdeki bakırın davranışı belirlenmiştir. Cevherin liç işlemi üzerine asit derişimi, reaksiyon sıcaklığı, karıştırma hızı, katı/sıvı oranı etkileri bakırın çözünürlüğü izlenerek tespit edilmiştir. İncelenen bütün deneysel parametrelerin bakırın çözünmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Asit derişimi, sıcaklık, karıştırma hızı, katı/sıvı oranı parametrelerinin her biri bakırın çözünmesinde lineer etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre nitrik asit çözeltilerinin malahit cevherinden bakırını çözmek amacıyla kullanılabilceği söylenebilir.

**Tablo 4.** Nitrik Asit Çözeltisi Kullanılarak Malahit Cevherinden Bakır Liçi İçin ANOVA Değerleri

Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestleşme Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Prob>F
Model	4360.88	14	311.49	25.38	<0.0001 Önemli
A-Sıcaklık	315.37	1	315.37	25.70	<0.0001
B-Konsantrasyon	1365.04	1	1365.04	111.23	<0.0001
C-Karıştırma hızı	135.37	1	135.37	11.03	<0.0047
D-Katı/sıvı oranı	1751.04	1	1751.04	142.68	<0.0001
AB	52.56	1	52.56	4.28	0.0562
AC	1.56	1	1.56	0.13	0.7262
AD	126.56	1	126.56	10.31	<0.0058
BC	3.06	1	3.06	0.25	0.6246
BD	115.56	1	115.56	9.42	<0.0078
CD	5.06	1	5.06	0.41	0.5304
A <sup>2</sup>	81.03	1	81.03	6.60	<0.0214
B <sup>2</sup>	342.03	1	342.03	27.87	<0.0001
C <sup>2</sup>	0.67	1	0.67	0.055	0.8185
D <sup>2</sup>	3.24	1	3.24	0.26	0.6148
Atık	184.08	15	12.27		
Saf Hata	21.33	5	4.27		
R <sup>2</sup>	0.9595	-	-	-	-
R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>	0.9217	-	-	-	-



## **KAYNAKLAR**

- Haghighi, H. K., Moradkhani, D., Sedaghat, B., Najafabadi, M. R. Behnamfard, A 2013. Production of copper cathode from oxidized copper ores by acidic leaching and two-step precipitation followed by electrowinning. *Hydrometallurgy*, 133: 111–117.
- Kökeş, H 2013. Oksitli bakır cevherlerinden hidrometalurjik yöntemle bakır sülfat kristalleri üretimi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Tanaydın, M 2010. Oksitli bakır cevherlerinden bakır üretimi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, Türkiye.
- Uzun, E 2015. Kalkopirit Konsantresinden hidrometalurjik yöntemle katodik bakır üretimi. Doktora Tezi, Karabük Üniversitesi, Karabük, Türkiye.

DRAFT

## Amonyak/amonyum nitrat çözeltilerinde malahit cevherinden bakır ve çinko liçinin yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyonu

Zümra Bakıcı Tanaydın<sup>1\*</sup>, Ahmet Baysar<sup>2</sup>, Nizamettin Demirkıran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye.

<sup>2</sup>İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: cheamicalengineer@gmail.com

### Özet

Endüstride en çok kullanılan katalizörlerden birisi Cu/ZnO katalizörüdür. Bu katalizörün üretiminde genellikle yüksek saflıktaki bakır ve çinko bileşikleri kullanılır. Oksitli bir bakır cevheri olan malahit, kaynağına bağlı olarak bakırdan başka alüminyum ve çinko gibi diğer metalleri de barındırabilir. Esas olarak bakır üretiminde kullanılan malahit, bünyesindeki diğer metaller için de değerlendirilebilir. Bu çalışmada, çinko içeren malahit cevheri kullanılarak Cu/ZnO katalizörünün üretilmesi hedeflenmiştir. Bunun için ilk olarak cevher liç işlemine tabi tutularak bünyesindeki bakır ve çinko katı fazdan sulu çözelti ortamına alınmıştır. Çözücü olarak amonyak/amonyum nitrat tampon çözeltileri kullanılmıştır. İstenilen Cu/Zn mol oranına sahip çözeltiler elde etmek üzere bakır ve çinko çözünürlüğü için optimum liç koşulları belirlenmiştir. Liç işleminde amonyak, amonyum nitrat ve pH bağımsız değişken olarak seçilmiş ve parametre değerlerini optimize etmek için yanıt yüzey yöntemlerinden (YYY) biri olan iki faktörlü tam faktöriyel merkezi kompozit tasarım (MKT) uygulanmıştır. Parametrelerinin etkilerini görebilmek için deneysel bulgulara çoklu regresyon analizi yapılmış ve cevherdeki bakırın en yüksek ve çinkonun ise en düşük miktarda çözeltilmeye geçtiği şartları veren model denklemleri elde edilmiştir. Optimum liç koşulları pH için 10.6, amonyak derişimi için 4 M ve amonyum nitrat derişimi için ise 0.18 M olarak belirlenmiştir. Bu deney şartlarında malahit cevherindeki bakır ve çinkonun sırasıyla % 97.14 ve % 63.20 oranında çözeltilmeye alındığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Malahit, merkezi kompozit tasarımı, bakır, çinko, liç, katalizör.

### Optimization of copper and zinc leaching from ammonia/ammonium nitrate solutions from malachite ore by response surface methods

#### Abstract

One of the most widely used catalysts in the industry is Cu / ZnO catalyst. In the production of this catalyst, high purity copper and zinc compounds are generally used. Malachite, which is an oxide copper ore, may contain other metals, such as aluminum and zinc, other than copper, depending on the source. The malachite, which is mainly used in the production of copper, can also be used for other metals. In this study, it is aimed to produce Cu / ZnO catalyst by using zinc containing malachite ore. For this purpose, the ore was first leached and copper and zinc were taken from solid phase to aqueous solution. Ammonia / ammonium nitrate buffer solutions were used as solvent. Optimum leaching conditions for copper and zinc solubility were determined to obtain solutions with the desired Cu / Zn molar ratio. In the leaching process, ammonia, ammonium nitrate and pH were chosen as independent variables and two factor full factorial central composite design (CCD), one of the response surface methods (RSM), was applied to optimize parameter values. In order to see the effects of the parameters, multiple regression analysis was performed on the experimental findings and the model equations giving the conditions where the copper in the ore was the highest and the zinc in the lowest amount were obtained. Optimum leaching conditions were determined as 10.6 for pH, 4 M for ammonia concentration and 0.18 M for ammonium nitrate concentration.. It was determined that copper and zinc in malachite ore were taken into solution at 97.14% and 63.20% respectively.

**Keywords:** Malachite, central composite design, copper, zinc, leaching, catalyst.

#### GİRİŞ

Kimyasal üretim proseslerinin pek çoğunda ekonomik bir şekilde üretim yapabilmek amacıyla katalizör olarak adlandırılan kimyasal maddeler kullanılır. Katalizörler, bir reaksiyon sisteminde meydana gelen reaksiyonlardan birinin diğerlerine göre hızlanmasını sağlayarak seçici bir şekilde istenen ürünün elde edilmesini sağlarlar. Bu tip kimyasal maddelerin en önemli özellikleri aktivite ve seçicilik olduğundan, bir reaksiyonda katalizörler bu özelliklerden biri veya her iki özelliği için kullanılabilir (Lloyd, 2011).

Heterojen katalitik proseslerde çoğunlukla geçiş metallere oksitleri katalizör olarak kullanılırlar. Çeşitli üretim proseslerinde kullanılmak üzere farklı metal oksit katalizörler geliştirilmiştir. Bu katalizörler arasında Cu/Zn oksit katalizörleri yüksek katalitik aktivitelerinden, uzun ömürlü olmalarından, katalizör zehirlerine karşı yüksek dirençlerinden, oldukça düşük reaksiyon sıcaklığı ve basıncında kullanılabilirliklerinden dolayı farklı proseslerde uygulama alanı bulmuşlardır. Endüstride karbon monoksit gazının hidrojenasyonu ile metanol sentezi, metanol buhar reforming prosesi, yüksek molekülü alkol sentezi, su gazı shift reaksiyonu, dimetil eter üretimi, alken üretimi, yüksek kalorili sentetik doğal gaz üretimi gibi reaksiyonlarda Cu/Zn oksit katalizörleri kullanılmaktadır (Budiman ve ark., 2013), Aslan (2005).

Bakır/çinko oksit ikili katalizörlerin üretiminde bakır ve çinkonun saf haldeki farklı bileşikleri kullanılabilir. Bu bileşiklerin üretilmelerinde temel ham madde kaynağı bakır ve çinkonun oksitli/karbonatlı cevherleri malahit ( $\text{Cu}(\text{OH})_2\text{CuCO}_3$ ) ve smitsonit ( $\text{ZnCO}_3$ ) cevherleridir. Bu cevherlerin hidrometalurjik metotla işlenmesi sonucunda bakır ve çinko metalik olarak üretilebileceği gibi bileşikleri formunda da elde edilebilir.

Hidrometalurji, sulu çözeltilerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar vasıtasıyla metal ve bileşiklerinin üretilmesi ile ilgili metotları kapsayan bir prostedir. Hidrometalurji alanında yapılan çeşitli akademik çalışmalarda, metal ve bileşiklerinin elde edilmesinde zenginleştirilmiş cevherin veya ham cevherin liç yöntemleri ile elde edilmesi planlanmaktadır. Ancak geleneksel liç yönteminden metal kazanımında etkin olan parametreler belirlenerek tek bir parametre değişkeni olarak incelenirken diğer parametreler sabit tutulmakta ve böylece etkin parametrelerin birbiri ile etkileşimi ortaya koyulamamaktadır. Parametrelerin birbiriyle etkileşimlerini ortaya koymak için geliştirilmiş matematiksel ve istatistiksel yöntemler kullanılmaktadır (Turan, 2011),(Altınay, 2008), (Tanaydın,2007).

Bu istatistiksel yöntemlerin en başında cevap yüzey yöntemleri (CYY) gelmektedir. CYY, deneysel tasarımın önemli bir dalıdır, bu yöntemin temeli çok sayıda giriş değişkeni (bağımsız değişken) ve bunlara bağlı bir ya da birkaç cevap değişkeni (bağımlı değişken) arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. CYY'nin uygulanmasının amacı, elde edilecek cevapları önceden öngörebilecek, sistemi ifade edebilen uygun model bulmak ve optimum işletme koşullarını belirlemektir. CYY, denemelerin dizayn edilmesi, model geliştirilmesi (regresyon analizi), varyans analizi (ANOVA) ve optimizasyon gibi kısımlardan oluşmaktadır (Akçiçek, 2007).

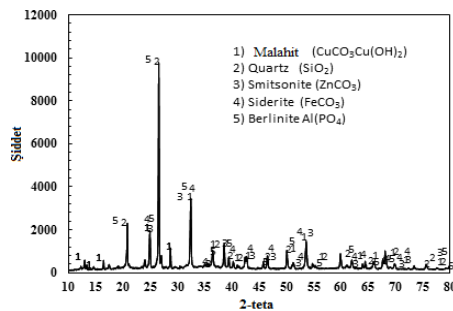
Bu çalışmada çinko içeren malahit cevherinin sulu amonyak/amonyum nitrat çözeltilerinde çözündürülmesinde cevap yüzey yöntemi kullanılarak pH ve amonyak derişimi ve amonyum nitrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda bakır çözünürlüğünün en yüksek ve çinko çözünürlüğünün ise en düşük olduğu optimum liç koşulları belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada bakır ve çinko kaynağı olarak kullanılan malahit cevheri Tunceli ilinden temin edilmiştir. Cevher çeneli kırıcıda kırılarak, değirmende öğütülmüştür. Farklı parçacık boyutları elde etmek için standart elekler kullanılarak -30+40, -40+60, -60+80, -80+100,-100+120 mesh fraksiyonlarına ayrılmıştır. Malahit cevherinin kimyasal analizi Tablo1'de verilmiştir. Cevherin mineralojik analizi X-ışınları difraksiyonu (XRD) ile analizi yapılmış ve difraktogramı Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Malahit Cevherinin Kimyasal Analizi

Bileşen	Cu	Zn	Fe	Diğerleri
Değer,%	5	17	14	64



Şekil 1. Çalışmada kullanılan malahit cevherinin XRD modeli

Çözünme deneyleri atmosfer basıncında mekanik bir karıştırıcı, sıcaklık kontrol birimi ve soğutucu, pH elektrotu ve amonyak/amonyum nitrat tampon çözeltisi kullanılarak 1L'lik ceketli cam reaktörde yapılmıştır. Belirlenen derişimlerde amonyak/amonyum nitrat çözeltisinin 500 mL'si cam reaktöre konulmuş, istenen karıştırma hızı ve reaksiyon sıcaklığı elde edilince cevher reaktördeki çözeltiye ilave edilmiştir. Belirlenen aralıklarda 10mL çözelti alınarak santrifüjlenerek malahit cevherinden çözeltiye alınan bakır ve çinko konsantreleri kompleksometrik yöntemle analiz edilmiştir.

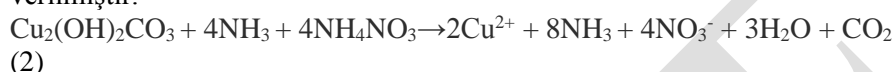
Yapılan bütün deneylerde karıştırma hızı 500 rpm, katı cevher/sıvı çözelti oranı 5/500 g/mL, sıcaklık 40 °C, parçacık boyutu -60+80 mesh ve süre 240 dk'da sabit tutularak pH ve amonyak derişimi belirlenerek Eşitlik (1)'e göre amonyum nitrat derişimi bulunmuştur.

$$\text{pH} = -\text{p}K_b - \log \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{Amonyum nitrat}]}, \quad (K_b(\text{NH}_3 \text{ için})=1.8 \cdot 10^{-5}) \quad (1)$$

Design Expert 6.0 yazılımıyla cevap yüzey yöntemlerinden 2 faktörlü tam faktöriyel merkez kompozit dizaynı kullanılarak dizayn edilen deneylerde liç verimini etkileyen pH, amonyak derişimi, amonyum nitrat derişimi bağımsız parametreler olarak seçilmiştir. Cevap değişkeni olarak çözeltiye alınan bakır ve çinko yüzdeleri bağımlı parametreler olarak belirlenmiştir. Çözeltideki bakır çözünürlüğünün en yüksek ve çinko çözünürlüğünün en düşük olduğu değerler optimum kriteri olarak seçilmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Malahitin ( $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuCO}_3$ ) amonyak/amonyum nitrat çözeltisi ile çözünme reaksiyonu Eşitlik (2)'de verilmiştir.



Tablo 2'de merkezi kompozit dizaynı ile hazırlanan deneysel çalışma şartları ve cevap değişkeni olarak belirlenen çözeltiye alınan bakır ve çinko yüzdeleri görülmektedir. Tablo 2'de görüldüğü gibi 5'i merkezde toplam 13 deney tasarlanmıştır. Bu deneylerde bağımsız değişkenlerin belirlenen şartlarda çözelti içine alınan bakır ve çinko yüzdeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Dizayn Expert 6.0 yazılımıyla tasarlanan ve değerlendirilen deneylerin bakır için ANOVA sonuçları Tablo 3'de görülmektedir. Prob>F değerinin 0.05'den küçük olan değerlerinin cevapta önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Tablo 3'de incelenen iki parametre için prob>F değerinin 0.05'den küçük olması modelde iki parametrenin de etkin olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre pH (A) ve amonyak derişiminin (B) ve buna bağlı olarak da amonyum nitrat derişiminin liç verimine lineer etkisi önemlidir. pH'nın model denkleminde etkisinin üstel olduğu da tablodan görülmektedir. Aynı zamanda pH ile amonyak derişiminin birbiriyle etkileşiminin önemli olduğu model tarafından önerilmektedir. ANOVA sonuçları quadratik modelin korelasyon katsayısı olan R<sup>2</sup> 0.9971 bulunması modelin cevaptaki değişikliği bakır için %99.71'ni açıklama yeteneğinde olduğunu gösterir. Aynı zamanda modeldeki değişim miktarı ölçümünü düzeltilmiş terimler ifadesinin R<sup>2</sup>adj. yüksek olması itibarıyla model uyumunun yüksek olduğu söylenebilir. Modeldeki standart sapmanın 0.36 olduğu görülmektedir.

**Tablo 2.** MKD Deneysel Tasarımı ve Elde Edilen Sonuçlar

Deney Sırası	A:pH	B:Amonyak derişimi (mol/L)	%Cu	%Zn
1	8.67	2.50	98.01	79.64
2	10.60	1.00	80.7	50.48
3	9.0	4.00	99.98	85.36
4	9.80	2.50	91.56	62.46
5	9.80	2.50	91.64	61.71
6	9.80	2.50	91.58	62.34
7	10.60	4.00	94.24	67.3
8	9.80	2.50	91.56	62.42
9	9.0	1.00	90.08	51.01
10	10.93	2.50	90.74	57.36
11	9.80	0.38	83.62	45.19
12	9.80	2.50	91.63	62.58
13	9.80	4.62	99.98	77.61

**Tablo 3.** Cu İçin ANOVA Değerleri

Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestleşme Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Prob>F
Model	307.94	5	61.59	487.99	<0.0001 önemli
A	43.95	1	43.95	348.25	< 0.0001
B	247.38	1	247.38	1960.13	< 0.0001
A <sup>2</sup>	14.36	1	14.36	113.78	0.0001
B <sup>2</sup>	0.15	1	0.15	1.23	0.3044
AB	2.24	1	2.24	17.71	0.0040
R <sup>2</sup>	0.9971				
R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub>	0.9951				
Std.Sapma:	0.36				
Artan	0.88	7	3.18		
Uyum eksikliği	0.88	3	7.27	62.09	<0.0001 önemli
Saf Hata	5.920E-003	4	0.12		

Çinko için ANOVA sonuçları Tablo 4’de görülmektedir. Tablo 4’de incelenen iki parametre için yine prob>F değerinin 0.05’den küçük olması model için önemli olduğu düşünülürse bu sonuçlara göre pH (A) ve amonyak derişiminin (B) liç verimine lineer etkisi önemlidir. pH’nın model denkleminde etkisinin üstel olduğu da tablodan görülmektedir. Aynı zamanda pH ile amonyak derişiminin birbiriyle etkileşiminin önemli olduğu model tarafından önerilmektedir. ANOVA sonuçları quadratik modelin korelasyon katsayısı olan R<sup>2</sup> 0.9864 bulunması modelin cevaptaki değişikliği çinko için %98.64’ü açıklama yeteneğinde olduğunu gösterir.

Deneysel çalışmanın istatistik değerlendirme sonrası sonuçlar optimize edilerek optimum liç koşulları, Design-Expert 6.0 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre bakır çözünürlüğünün en yüksek ve çinko çözünürlüğünün en düşük yüzdesini veren çözüm noktaları arasından deneysel uyumu yüksek olan iki çözüm noktası Tablo 5’te verilmiştir. Bu sonuçlara göre optimum noktalarda Design Expert 6.0 yazılımının verdiği tahmini değerler ile deneysel sonuçlar uyum sağlamaktadır.

## SONUÇ

Bu çalışmada, Cu/ZnO katalizörünü üretmek için malahit cevherinin amonyak/amonyum nitrat çözeltilerindeki çözünürlüğü incelenmiş, istenilen Cu/Zn mol oranına sahip çözeltiler elde etmek üzere bakır ve çinko çözünürlüğü için optimum liç koşulları belirlenmiştir. Cevherin liç işlemi üzerine pH, amonyak, amonyum nitratın etkileri, cevherdeki bakırın ve çinkonun çözünürlüğü izlenerek tespit edilmiştir. İncelenen bütün parametrelerin bakır ve çinkonun çözünmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip oldukları gözlemlenmiştir. Reaksiyon koşullarının kontrol edilmesiyle çözelti ortamına geçen bakır miktarının yüksek, çinko miktarının ise düşük seviyelerde tutulabileceği belirlenmiştir.

**Tablo 4.** Zn İçin ANOVA Değerleri

Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestleşme Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	Prob>F
Model	1620.9	5	324.02	101.86	<0.0001önemli
A	366.10	1	366.10	115.09	< 0.0001
B	1081.10	1	1081.10	339.87	< 0.0001
A <sup>2</sup>	43.29	1	43.29	13.61	0.0078
B <sup>2</sup>	7.75	1	7.75	2.44	0.1626
AB	116.10	1	116.10	36.50	0.0005
R <sup>2</sup>	0.9864				
R <sup>2</sup> <sub>adj.</sub>	0.9768				
Std. Sapma:	1.78				
Artan	22.27	7	3.18		
Uyum eksikliği	21.80	3	7.27	62.09	0.008 önemli
Saf Hata	0.47	4	0.12		

**Tablo 5.** MKD Tasarımının Optimizasyon Sonuçları.

Deney	pH	Amonyak derişimi (mol/L)	Tahmini		Deneysel	
			%Cu	%Zn	%Cu	%Zn
1	10.60	4.00	97.144	63.2138	94.24	67.3
2	9.00	1.00	90.662	53.9967	90.08	51.01

#### KAYNAKLAR

- Akççek, N 2007. Bilyalı değirmenlerde bazı öğütme parametrelerinin modellenmesi ve optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, Türkiye.
- Altınay, Ç 2008. Üzüm çekirdeğinden fenolik bileşiklerin basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye
- Aslan G 2005. Metal oksitler ile iyileştirilmiş alkan dehidrojenasyon ikili katalizörlerinin hazırlanması ve tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Budiman A., Ridwan M., Kim S. M., Choi J., Yoon C., Ha J.-M., Suh D., Suh Y.-W 2013. Design and preparation of high-surface-area Cu/ZnO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts using a modified co-precipitation method for the water-gas shift reaction. Applied Catalysis A:General 462-463:220-226.
- Lloyd Lawrie 2011. "Handbook of Industrial Catalysts" ISBN 978-0-387-24682-6.
- Tanaydın, M.K 2017. Malahit cevherinin perklorik asit çözeltilerindeki çözünürlüğünün incelenmesi. Çukurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi 32(3): 175-185.
- Turan, M.D. 2011. Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin (YYY) kullanımı. Madencilik 50 (3): 11-23.

## PBO (1,4 fenilen bisoksazolin) uyumlaştırıcısının indirgenmiş grafen oksit takviyeli poli(etilen tereftalat)/poli(bütülen tereftalat) kompozitlerinin özelliklerine etkisinin incelenmesi

Bedriye Ü. Durmaz<sup>1</sup>, Canan Öztürk<sup>2</sup>, Ayşe Aytac<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi, Kocaeli, Türkiye

\*aaytac@gmail.com

### Özet

İki veya daha fazla polimerin harmanlanması ve katkı ilavesi, istenen özelliklere sahip yeni malzemeler elde etmek için yararlı bir yöntemdir. Bu çalışmada, indirgenmiş grafen oksit (rGO) takviyeli poli(etilen tereftalat)/poli(bütülen tereftalat) (PET/PBT) karışımlarına uyumlaştırıcı eklenmesi ile arayüzey etkileşiminin ve kompozitlerin son özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. PET/PBT/rGO (70/30/1) karışımlarına uyumlaştırıcı olarak dört farklı oranda 1,4 fenilen bisoksazolin (PBO) eklenmiştir. Kompozitler laboratuvar ölçekli çift vidalı mini ekstruderde 260 °C’de harmanlanıp, enjeksiyon kalıplama cihazında kalıplanmıştır. Örneklerin karakterizasyonları için, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), çekme testi, termal iletkenlik ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Çekme testi sonuçları incelendiğinde en yüksek çekme dayanımı; % 4.0 PBO içeren kompozitte gözlenmiştir. Termal test sonuçları ise, kompozitlerin ısıl özelliklerinde önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Poli(etilen tereftalat), Poli(bütülen tereftalat), İndirgenmiş grafen oksit, Uyumlaştırma

### Investigation of the effect of PBO (1,4 phenylene bisoxazoline) compatibilizer on the properties of reduced graphene oxide reinforced poly (ethylene terephthalate) / poly (butylene terephthalate) composites

### Abstract

Blending of two or more polymers with the addition of additives is a useful method for obtaining new materials to having the desired properties. In this study, it was aimed to improve the interfacial interactions and final properties of reduced graphene oxide (rGO) reinforced poly (ethylene terephthalate)/poly (butylene terephthalate) (PET / PBT) composites by the addition of compatibilizer. 1,4 phenylene bisoxazoline (PBO) were used as the compatibilizer for PET / PBT / rGO (70/30/1) mixture at four different loading level. The composites were prepared in a laboratory scale twin screw mini extruder at 260 °C and molded in the injection molding machine. Differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), tensile test, thermal conductivity and scanning electron microscopy (SEM) were used for characterization of the samples. When tensile test results are examined, the highest tensile strength was observed in the composite containing 4.0 wt. % PBO. Thermal test results showed no significant change in thermal properties of composites.

**Keywords:** Poly (ethylene terephthalate), Poly(butylene terephthalate), Reduced graphene oxide, Compatibilization

### 1. GİRİŞ

Yüksek performanslı uygulamalar için iki veya daha fazla polimerin harmanlanması, istenen özelliklere sahip yeni malzemeler elde etmek için yararlı bir yöntemdir. Ticari termoplastik polyesterler olan PET ve PBT çeşitli mühendislik uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Mühendislik bileşenleri, otomotiv parçaları ve lif üretimi gibi geniş bir alana hitap eden PBT yüksek kristalizasyon hızı, düşük eriyik viskozitesi, iyi işlenebilirlik ve kalıplanabilirlik, elektriksel özelliklere sahiptir (Rajakumar and Nanthini 2011; Colonna et al. 2017). PET ise, yarı kristalin bir termoplastik olup iyi mekanik özellikleri, yüksek kimyasal direnci, ısıl eğilme sıcaklığı, rijitliği ve ekonomik oluşu ile öne çıkmaktadır. PET bu özellikleri sayesinde gıda ambalajı, tekstil lifi, film ve otomotiv, elektronik parçaları gibi kalıplanmış malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır. Fakat, PET’in işlenmesi düşük erime dayanımı ve yavaş kristallenme hızı nedeniyle zordur (Aravinthan and Kale 2005; Rajakumar and Nanthini 2011; Szostak 2004). PET ve PBT’nin harmanlanması bu iki polimerin dezavantajlarının giderilmesi ve yeni özellikler elde etmek amacıyla literatürde birçok kez çalışılmış ve saf polimerlere göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Amramova 1995; Aravinthan and Kale 2005; Szostak 2004). Amorf fazda uyumlu olan PET ve PBT karışımının nispeten düşük mekanik özellikleri, kırılma ve yalıtkan

olması kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır (Aravinthan and Kale 2005). Bu dezavantajları iyileştirmek ve malzemeye yeni kullanım alanları kazandırmak için yapıya çeşitli katkı ve dolgular eklenebilir. Son yıllarda karbon karası, karbon nanotüp ve grafen gibi çeşitli nano dolgular sıklıkla tercih edilmektedir (Xing et al. 2018).

Grafen(Gr) ve türevleri farklı nano dolgular içinde üstün özellikleri ve yapısı ile dikkat çekmektedirler. İki boyutlu bir malzeme olan grafen, kovalent bağlı karbon atomlarının altıgen bir kafes içerisinde sp<sup>2</sup> hibritleşmesi yaparak bir araya gelmeleri sonucu oluşur (Du and Cheng 2012). Gr'nin, grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) olarak iki farklı yapısından bahsedilebilir. GO yapısında oksijen temelli fonksiyonel gruplar içerir ve dolayısıyla GO'nin polimer matris ile etkileşimi ve dağılımı daha iyidir. Fakat bu fonksiyonel gruplar GO'yi elektriksel ve termal olarak yalıtkan hale getirebilmektedirler. Daha iletken bir grafen türevi elde etmek için GO çeşitli yöntemler ile indirgenerek hidrofobik özellikli rGO üretilmektedir. Gr geniş spesifik yüzey alanı, iki boyutlu geometrisi, iyi mekanik, ısı özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Polimer kompozitlerin mekanik, elektriksel ve ısı özelliklerini düşük yüklenme oranlarında bile iyileştirdiği görülmüştür (Allen, Tung, and Kaner 2010; Du and Cheng 2012). Ancak, polimerik kompozitlerin son özellikleri, matris ve takviye malzemesinin özelliklerinin yanında matris ve takviye fazı arasındaki arayüzey etkileşimlerinden ve rGO'nin matris içindeki homojen dağılımından da önemli ölçüde etkilenmektedir (Alexandrescu et al. 2017). Dolgu ile matris arasında güçlü bir etkileşim olduğu durumlarda dışarıdan kompozite uygulanan kuvvet etkili bir şekilde dolguya aktarılabilir ve böylece kompozitin mekanik özellikleri iyileşebilir. Ayrıca dolgu ve matrisin uyumlaşması ile birlikte, dağılımın da homojenleşmesi beklenir (Xing et al. 2018). Farklı polyester matrislere özellikle de PET yapısına Gr türevlerinin eklenmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (Awad and Khalaf 2018; Istrate et al. 2017; Xing et al. 2018). Xing ve ark. yaptıkları çalışmada GO karboksil ile fonksiyonelleştirildikten sonra yüzeyine PET aşlanmıştır. Ardından bu fonksiyonel GO, PET matrisine eklenmiştir. Çalışmada, taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri incelendiğinde GO'nin matris içinde topaklandığı görülmüştür (Xing et al. 2018). Genel olarak literatür incelendiğinde, rGO ve polimer matrisler arasında zayıf bir etkileşim olduğu bilinmektedir. Eklenen dolgu ile matris arasındaki arayüzey etkileşimini iyileştirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu işlemler dolguların ve matrisin fonksiyonelleştirilmesini, çeşitli plazma, radyasyon uygulamalarını ve uyumlaştırma ilavesini içermektedir (Alexandrescu et al. 2017; Awad and Khalaf 2018; Xing et al. 2018).

Uyumlaştırıcı ilavesi çoğu durumda ek bir fonksiyonelleştirme adımı gerektirmeyen, basit ve ekonomik bir yöntemdir. Burada ana fikir arayüzey enerjisinin düşmesi sonucu yapışmanın artmasıdır. Uyumlaştırıcılar fonksiyonel gruplara sahip bifonksiyonel kimyasallardır ve köprüleme etkisi ile dolgu ile matris arasındaki etkileşimi iyileştirdiği düşünülmektedir (Mittal and Chaudhry 2015; Diez-Pascual et al. 2009). Uyumlaştırıcı, seçiminde malzemenin PET/PBT karışım matrisi ve kullanılan rGO ile muhtemel bağ yapabilecek fonksiyonel gruplar içermesine dikkat edilmiştir. Bu çalışmada, uyumlaştırıcı olarak 1,4 fenilen bisoksazolin (PBO) seçilmiştir. Bisoksazolinler polikondenzasyon polimerleri için etkin zincir uzatıcılar ve pek çok karışım için de reaktif uyumlaştırıcılardır. PBO polikondenzasyon polimerleri için köprüleme görevini karboksil uç gruplarını bağlayarak yerine getirmektedir (Böhme et al. 2007). Bu çalışmada, PET/PBT/rGO (70/30/1.0) karışımına 4 (0.5, 1.0, 2.0, 4.0) farklı oranda PBO eklenmiş ve elde edilen kompozitlerin mekanik, ısı ve morfolojik özellikleri incelenmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Malzemeler

PBT Eurotech firmasından Tecodur PB70 NL kodu ile alınmıştır. rGO, Hazerfen Kimya Malzeme ve Enerji Tek. San A.Ş'den, uyumlaştırıcı olarak kullanılan PBO ise, Santa Cruz Biotechnology firmasından temin edilmiştir.

### 2.2. Kompozitlerin Hazırlanması

Kompozitler, laboratuvar ölçekli çift vidalı ekstruder de eriyik harmanlama yöntemi ile hazırlanmıştır. Ekstruder kovan sıcaklığı 260 °C vida hızı 100 rpm ve karıştırma süresi 3 dk olarak belirlenmiştir. Eriyik olarak elde edilen karışım, 260 °C'lik ve 10 bar'lık enjeksiyon basıncına sahip bir laboratuvar ölçekli enjeksiyon kalıplama makinesinde 260 °C tabanca sıcaklığı, 10 bar'lık enjeksiyon basıncında oda sıcaklığında kalıplanmıştır. Hazırlanan kompozitlerin bileşimleri Tablo 1'de verilmiştir. Kompozitlerin karakterizasyonu için diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), termogravimetrik analiz (TGA), çekme testi, ısı iletkenlik ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır.



**Tablo 1.** Hazırlanan Karışımların Bileşimi

Bileşen	% Bileşim
PET/ PBT	70/30
(PET/PBT) / rGO	99(70/30)/1.0
(PET/PBT)/ rGO / <b>PBO</b>	98.5(70/30)/1.0/ <b>0.5</b>
(PET/PBT) / rGO / <b>PBO</b>	98(70/30)/1.0/ <b>1.0</b>
(PET/PBT) / rGO / <b>PBO</b>	97(70/30)/1.0/ <b>2.0</b>
(PET/PBT) / rGO / <b>PBO</b>	95(70/30)/1.0/ <b>4.0</b>

### 2.3 Karakterizasyon Yöntemleri

Termal özelliklerin incelenmesi TGA ve DSC cihazları ile gerçekleştirilmiştir. TGA analizi 10 °C/dk ısıtma hızı ile 25 °C - 750 °C aralığında N<sub>2</sub> atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Bozunma sıcaklıkları ve kütle kaybı belirlenmiştir. DSC ise, 10 °C/dk ısıtma hızı ile 25-270°C aralığında N<sub>2</sub> atmosferinde yapılmıştır. Camlı geçiş, erime sıcaklıkları, entalpileri ve kristalizasyon derecesi belirlenmiştir. Çekme testi, 5mm/dk çekme hızı ile Instron üniversal çekme testi cihazı ile yapılmıştır. SEM ile çekme deneyi numunelerinin kırılma yüzeyleri incelenmiştir. Ayrıca seçilen örneklerin oda sıcaklığında ısıl iletkenlik değerleri belirlenmiştir.

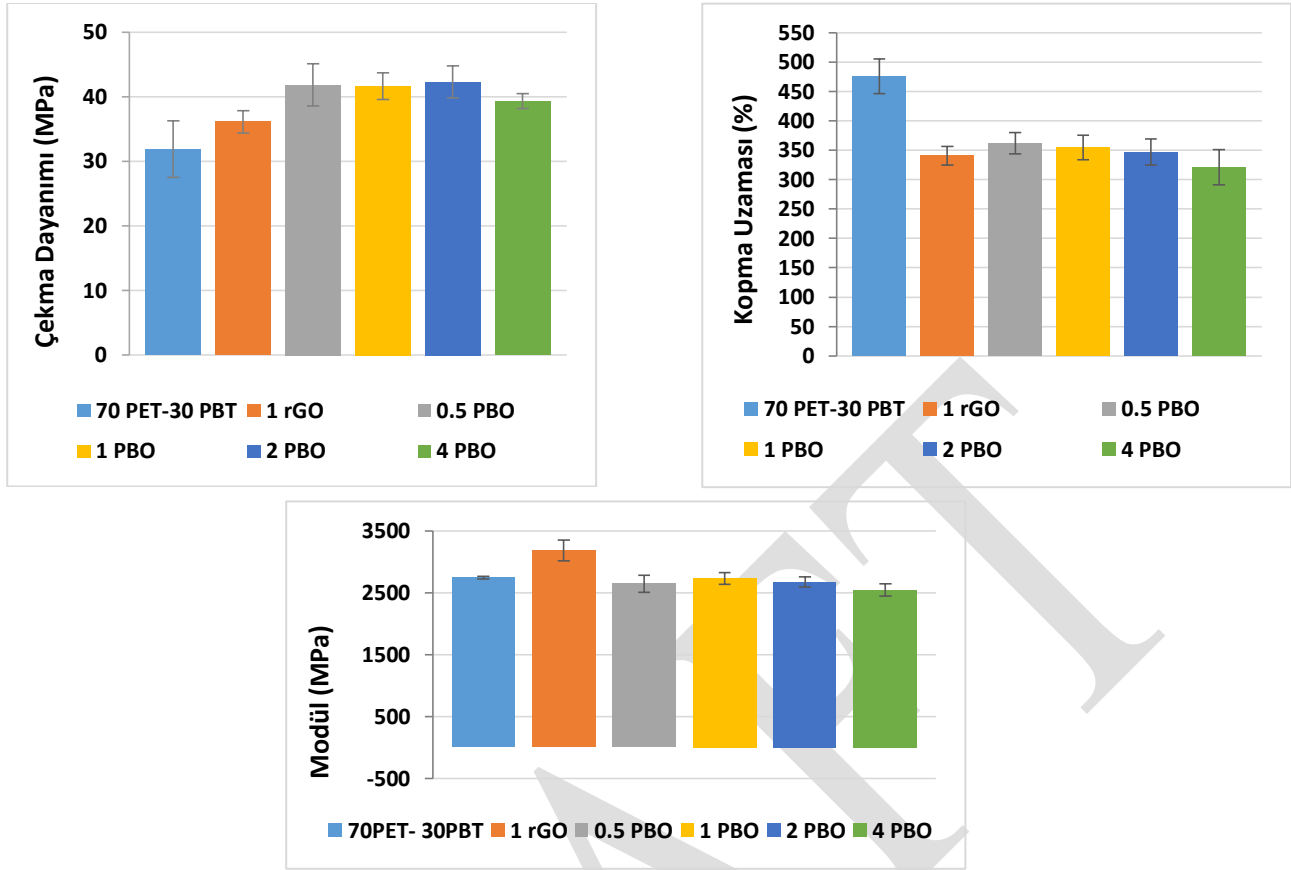
## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 3.1. Çekme testi

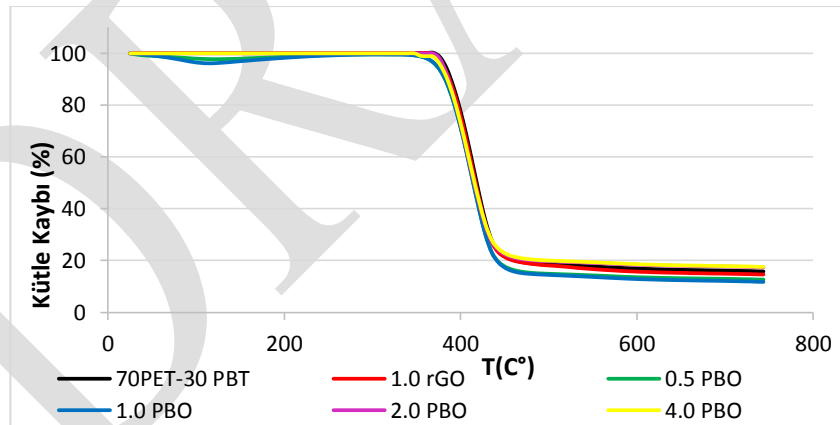
Kompozitlerin mekanik özellikleri Şekil 1’de verilmiştir. Çekme dayanımları incelendiğinde 70PET-30PBT karışımına rGO ve PBO eklenmesi ile artışlar olduğu görülmüştür. %1 rGO ilavesi ile çekme dayanımı %13 artış sergilerken, PBO eklenmesi ile de %22-32 aralığında artışlar olmuştur. Bu durum PBO’nun PET/PBT ve rGO arasındaki etkileşimini geliştirdiğini işaret etmektedir. %0.5-2 PBO içeren kompozitler yakın çekme dayanımı sergilerken %4 PBO içeren kompozitte bir miktar düşüş görülmüştür. Yüksek yükleme oranlarında katkının matrisin belirli bölgelerinde toplanması ile mekanik özellikler düşebilmektedir. Kopma uzamalarına bakıldığında ise matrisin uzaması %476 iken rGO eklenmesi ile %28’lik bir düşüş olmuştur. PBO içeren kompozitlerde de durum çok fazla değişmezken, rGO içeren kompozite göre %7 kadar artış sergilemişlerdir. 70PET-30PBT karışımının modülü rGO eklendiğinde %17 artmıştır. PBO içeren kompozitlerin modülü ise karışıma yakın değerler vermiştir.

### 3.2. Termogravimetrik analiz

Hazırlanan kompozitlerin ısıl kararlılıkları TGA ile belirlenmiştir. Sonuçlar, Şekil 2 ve Tablo 3’de verilmiştir. Şekil 2 incelendiğinde, tüm örnekler tek basamaklı bozunma göstermiştir. 70PET-30PBT karışımına rGO eklenmesi T<sub>onset</sub>, T<sub>max</sub> sıcaklıklarında ve kalıntı miktarlarında bir miktar düşüşe neden olmuştur. Kalıntı miktarları incelendiğinde %2-4 PBO içeren kompozitler en yüksek kalıntıyı vermişlerdir. T<sub>onset</sub> sıcaklığı PBO eklenmesi ile 5 °C kadar azalmıştır. Elde edilen sonuçlar PBO’nun kompozitin termal kararlılığını iyileştirmezken az da olsa düşürdüğünü işaret etmektedir.



Şekil 1. Örneklerin çekme testi sonuçları



Şekil 2. Hazırlanan örneklerin TGA eğrileri

Tablo 2. Hazırlanan örneklerin TGA verileri

Numune	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>endset</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)	Kalıntı <sub>850 °C</sub> (%wt.)
<b>70PET/30PBT</b>	385.1	439.1	415.3	15.8
<b>1.0 rGO</b>	384.1	435.9	412.6	14.6
<b>0.5 PBO</b>	383.3	435.4	408.9	12.6
<b>1.0 PBO</b>	382.3	435.0	408.9	11.8
<b>2.0 PBO</b>	380.2	434.4	409.0	17.4
<b>4.0 PBO</b>	381.2	434.9	407.3	17.6

### 3.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

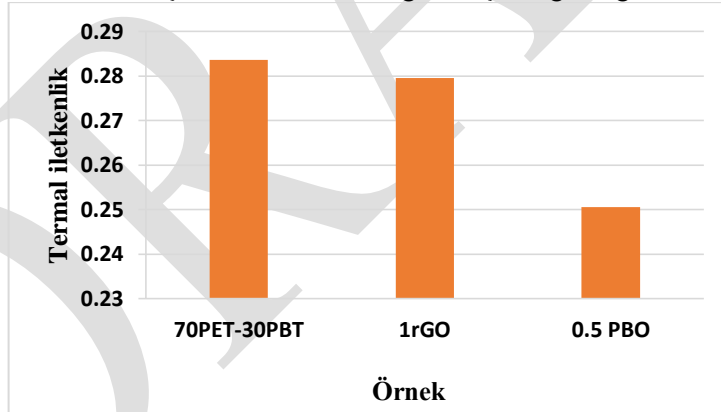
Kompozitlerin DSC testi sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. PET/PBT karışımının camı geçiş sıcaklığının ( $T_g$ ) rGO ilavesi ile 7 °C kadar azaldığı belirlenmiştir. Kompozite PBO katılması  $T_g$ 'yi artırmış ancak karışım değerine ulaştırmamıştır. En düşük  $T_g$  %4 PBO içeren kompozitte görülmüştür. Karışımın soğuk kristalizasyon sıcaklığı ( $T_c$ ) ve entalpisi ( $\Delta H_c$ ) rGO eklenmesi ile artmıştır. Yani rGO kristalizasyon sürecinde bir yavaşlamaya neden olmuştur. Yine bununla birlikte % kristalinite değeri de 1.0 rGO kompozitinde daha düşüktür. 1rGO kompozitine PBO eklenmesi ise  $T_c$  ve  $\Delta H_c$  değerlerini düşürmüş yani kristalizasyon sürecinin hızlanmasına katkı sağlamıştır. 1.0 rGO kompozitinin erime sıcaklığı karışıma göre düşüş gösterirken PBO eklenmesi ile yeniden karışım değerine yaklaşmıştır.

Tablo 3. Hazırlanan örneklerin DSC verileri

Numune	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_c$ (j/g)	$\Delta H_f$ (j/g)	%Kristalinite
70PET- 30PBT	69.56	108.54	253.41	14.92	30.64	17.87
1.0 rGO	62.81	117.22	244.5	29.50	36.78	8.36
0.5 PBO	65.16	110.46	253.31	24.90	33.71	10.18
1.0 PBO	65.12	102.21	252.57	20.85	29.57	10.16
2.0 PBO	58.38	101.35	251.19	20.92	29.38	9.91
4.0 PBO	53.54	103.05	248.90	26.32	32.39	7.27

### 3.4 Termal İletkenlik

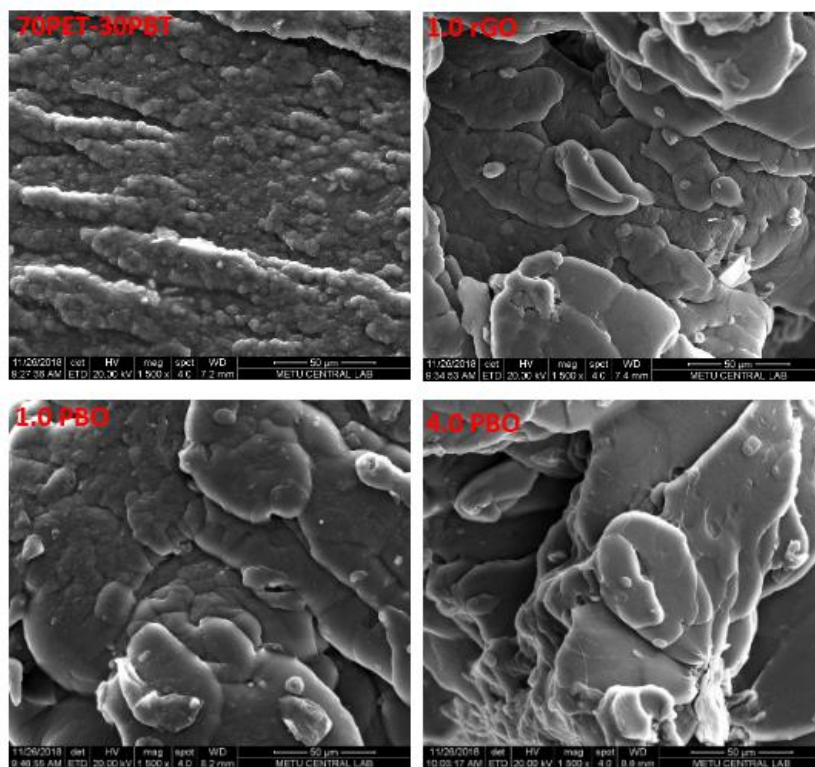
70PET-30PBT, 1.0 rGO ve 0.5 PBO örneklerine oda sıcaklığında ısı iletkenlik analizi uygulanmış ve sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. Grafik incelendiğinde polimer karışımı 0.283 iletkenlik gösterirken rGO eklenmesi bu değeri %3 düşürmüştür. 0.5 PBO ilavesi ile de ısı iletkenlik değeri daha da düşerek 0.25 olmuştur. Sonuçlar rGO ve PBO'nun 70PET-30PBT karışımının ısı iletkenliğini düşürdüğünü göstermektedir.



Şekil 3. Seçilen örneklerin ısı iletkenlikleri

### 3.5. Taramalı elektron mikroskobu

Seçilen örneklere kopma noktalarından SEM analizi uygulanmış ve x1500 büyütmedeki sonuçlar Şekil 4'te sunulmuştur. SEM görüntüleri incelendiğinde 70PET-30PBT'de çok belirgin bir faz ayrımının olmadığı görülmektedir. Bu polimerlerin yarı-karışılabilir oldukları söylenebilir. Karışıma 1.0 rGO ilavesi ile yapıda tabakalaşma olmuştur. Katmanlar şeklinde faz ayrımlarının da olması rGO ile polimer matrisin uyumsuz olduğuna işaret etmektedir. 1 PBO ilavesi ile daha bütün bir faz gözlenirken 4 PBO içeren yapıda belirgin bir değişim yoktur. Fakat daha fazla faz ayrımı olduğu söylenebilir.



#### 4. SONUÇ

Bu çalışmada PET/PBT/rGO kompoziti üzerine PBO uyumlaştırıcısının farklı oranlardaki etkileri incelenmiştir. Kompozite PBO eklenmesi ile çekme dayanımında artış bunun tersi olarak kopma uzamasında düşüş gerçekleşmiştir. Tüm kompozitler TGA’da tek basamaklı bozunma eğrisi göstermiştir. PBO içeren kompozitlerin daha düşük ısıl kararlılık sergilediği görülmüştür. TGA’da en yüksek % kalıntıyı %2 ve 4 PBO içeren kompozitler vermiştir. DSC sonuçlarına göre, PET/PBT karışımının rGO eklenmesi ile yavaşlayan kristalizasyon sürecinin PBO ilavesi ile tekrardan hızlandığı söylenebilir. En yüksek kristalinite değerine yine de ana matriste ulaşılmıştır. Isıl iletkenlik verileri, rGO ve PBO’nun 70PET-30PBT karışımının ısıl iletkenliğine olumlu bir etki sağlamadığını göstermiştir.

#### KAYNAKLAR

- Alexandrescu L, Sönmez M, Georgescu M, Nituica M, Ficai A, Trusca R, Gurau D, Tudoroiu L 2017. Polyamide/Polypropylene/Graphene Oxide Nanocomposites with Functional Compatibilizers: Morpho-Structural and Physico-Mechanical Characterization. *Procedia Structural Integrity*, 5: 675–82.
- Allen MJ, Tung VC, Kaner R B 2010. Honeycomb Carbon : A Review of Graphene. *Chemical Reviews*, 110: 132–45.
- Amramova N. 1995. Amorphous Poly ( Ethylene Terephthalate ) / Poly ( Butylene Terephthalate ) Blends : Miscibility and Properties. *Polymer*, 36 (4): 801–8.
- Aravinthan G, Kale DD 2005. Blends of Poly(Ethylene Terephthalate) and Poly(Butylene Terephthalate). *Journal of Applied Polymer Science*, 98 (1): 75–82.
- Awad SA, Khalaf EM 2018. Improvement of the Chemical , Thermal , Mechanical and Morphological Properties of Polyethylene Terephthalate – Graphene. *Bulletin of Materials Science*, 41 (67): 1–6.
- Böhme F, Jakisch L, Komber, Wursche R 2007. Multifunctional Coupling Agents. Part 4: Block Copolymers Based on Amino Terminated Polyamide-12 and Carboxy Terminated Poly(Butylene Terephthalate). *Polymer Degradation and Stability*, 92 (12): 2270–77.
- Colonna S, Pérez R A, Chen H, Liu, Wang D, Müller AJ, Saracco G, Fina A 2017. Super Nucleation and Orientation of Poly ( Butylene Terephthalate ) Crystals in Nanocomposites Containing Highly Reduced Graphene Oxide. *Macromolecules*, 50 (23): 9380–93.
- Diez-Pascual AM, Naffakh M, Gomez M A, Marco C, Ellis G, Gonzalez-Dominguez JM, Anson A et al. 2009. The Influence of a Compatibilizer on the Thermal and Dynamic Mechanical Properties of PEEK / Carbon Nanotube Composites. *Nanotechnology*, 20 (31): 315707.

- Du J, Cheng HM 2012. The Fabrication , Properties , and Uses of Graphene / Polymer Composites. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213: 1060–77.
- Istrate OM, Paton KR, Khan U, O Neill A, Bell AP, Coleman JN 2017. Reinforcement in Melt-Processed Polymer-Graphene Composites at Extremely Low Graphene Loading Level. *Carbon*, 78: 243–49.
- Mittal V, Chaudhry AU, 2015. Effect of Amphiphilic Compatibilizers on the Filler Dispersion and Properties of Polyethylene — Thermally Reduced Graphene Nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 32 (35): 1–11.
- Rajakumar PR, Nanthini R 2011. Thermal and Morphological Behaviours of Polybutylene Terephthalate/ Polyethylene Terephthalate Blend Nanocomposites. *Rasayan Journal of Chemistry*, 4 (3): 567–79.
- Szostak M 2004. Mechanical and Thermal Properties of PET/PBT Blends. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 416 (1): 209–15.
- Xing L, Wang Y, Wang S, Zhang Y, Mao S, Wang G 2018. Effects of Modified Graphene Oxide on Thermal and Crystallization Properties of PET. *Polymers*, 10: 613.

DRAFT

## Sodyum Kazeinat/Poli (vinil alkol) filmleri: farklı çapraz bağlayıcıların etkilerinin incelenmesi

Bedriye Ü. Durmaz<sup>1</sup>, Selinay Gümüş<sup>1</sup>, Ayşe Aytac<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği, Kocaeli, Türkiye

<sup>2</sup> Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Bilimi ve Teknolojisi, Kocaeli, Türkiye

\*aaytac@gmail.com

### Özet

Bu çalışmanın amacı, üç farklı çapraz bağlayıcının sodyum kazeinat (NaCAS)/poli(vinil alkol) (PVA) karışım filmlerinin özellikleri üzerine etkilerinin incelenmesidir. PVA-NaCAS filmleri kimyasal olarak glutaraldehit (GLA), borik asit (BA) ve tannik asit (TA) ile kimyasal olarak çapraz bağlanmaya çalışılmıştır. Bu üç farklı çapraz bağlayıcının iki farklı (%0.5-1) oranının etkisi incelenmiştir. Filmler çözeltiden dökme yöntemi ile hazırlanmıştır. Polistiren petri kaplarında oda sıcaklığında kurutulmuş elde edilen filmlerin karakterizasyonu termogravimetrik analiz (TGA), temas açısı ölçümü, fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve çekme testi ile gerçekleştirilmiştir. Çekme testi sonuçları, artan çapraz bağlayıcı oranının kopmada uzama değerini azaltırken çekme dayanımını artırdığını göstermiştir. Ayrıca temas açısı ölçümleri sonucu çapraz bağlayıcı içeren filmlerin genel olarak daha fazla hidrofobik karakter sergiledikleri görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Sodyum Kazeinat, Poli (vinil alkol), Çapraz bağlama

### Sodium Caseinate / Poly (vinyl alcohol) films: investigation of the effects of different crosslink agents

#### Abstract

The aim of this study is to investigate the effects of three different crosslink agents on the properties of sodium caseinate (NaCAS) and poly (vinyl alcohol) (PVA) blend films. PVA-NaCAS films were chemically cross-linked with glutaraldehyde (GLA), boric acid (BA) and tannic acid (TA). The effect of two different (0.5-1wt.%) ratios of these three different crosslink agents was investigated. The films were prepared by solution casting method. Characterization of the drying films in polystyrene petri dishes at room temperature was carried out by thermogravimetric analysis (TGA), contact angle measurement, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and tensile test. Tensile test results showed that increased crosslink agent ratio increased tensile strength value while reducing elongation at break. In addition, as a result of contact angle measurements, it was found that crosslink agent containing films generally exhibited more hydrophobic character.

**Keywords:** Sodium Caseinate, Poly (vinyl alcohol), Cross-linking

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda çevresel kaygılar, yenilenebilirlik ve maliyetler nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilen ambalaj malzemelerinin geliştirilmesine artan bir ilgi vardır. Doğal ve biyolojik olarak parçalanabilir kaynaklardan elde edilen polimerler, petrol bazlı sentetik polimerler yerine çekici alternatifler olarak görülmektedir. Biyobozunur polimerler doğrudan biyo-kütleden elde edilenler ve biyo-bazlı monomerlerden kimyasal olarak sentezlenenler olarak ikiye ayrılabilir. İlk grupta yer alan ve gıda ambalajlama alanında sıklıkla çalışılan proteinler film oluşturabilme özellikleri ile dikkat çekmektedirler (Gómez-Estaca et al. 2016; Pan et al. 2016). Sodyum Kazeinat (NaCAS), süt proteini kazeinin asitle çöktürülmesiyle elde edilen, suda çözünebilir bir polimerdir. NaCAS filmleri genellikle film oluşturma ve yüksek gaz bariyer özellikleri sunar. NaCAS şeffaf, kokusuz, renksiz ve pürüzsüz filmler elde edilmesine de olanak tanımaktadır.

Bu özellikler NaCAS'ı ambalajlama, yenilebilir ve koruyucu film gibi uygulamalar için geleneksel sentetik polimerlerin yerine kullanılabilen ilginç bir malzeme haline getirmektedir (Audic and Chaufer 2005; Bonnaillie et al. 2014). NaCAS filmlerinin birçok avantajının yanında zayıf mekanik özellikleri ve yüksek nem hassasiyeti eksikliği bulunmaktadır. Proteinler, dezavantajlarının üstesinden gelmek için farklı polimerler, plastikleştiriciler ve çapraz bağlayıcılar (ÇB) ile karıştırılabilirler (Audic and Chaufer 2005; Picchio et al. 2018).

Poli (vinil alkol) (PVA), poli (vinil asetat) 'ın hidrolizi ile elde edilen bir polimerdir. Aynı zamanda enzimler ve mikroorganizmalar ile biyobozunmaya elverişlidir. Suda çözünebilir hidrofilik yapısı sayesinde doğal ürünlerle harmanlanmaya uygundur. PVA gaz ve aroma bariyeri, kimyasal dayanım, iyi mekanik özellikler ve

toksik olmama gibi özellikler sunmaktadır (Durmaz and Aytac 2019). PVA'nın bu özellikleri nedeniyle, doğal malzemeler ile karıştırılmasıyla ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. 540/5000

Bu çalışmalardan bazılarında myofibriller protein/PVA (Limpan et al. 2012), soya proteini izolatu/PVA (Su et al. 2010), tara sakızı/PVA (Ma et al. 2016) filmleri örnek verilebilir. Literatür taramasından da yola çıkılarak PVA-NaCAS karışımı ile ambalajlama için filmler elde edilebileceği düşünülmüştür.

Ayrıca protein filmlerinin işlevselliğini geliştirmek için polimer ağını polimer zincirlerinin çapraz bağlanması yoluyla modifiye etmek için kimyasal ve fiziksel işlemler uygulanabilmektedir. Kimyasal çapraz bağlama işlemi mikro yapıyı ve fiziksel özellikleri doğrudan etkilemektedir. Çapraz bağlama sonucu oluşacak ağ yapısı ile filmin mekanik ve bariyer özellikleri daha da geliştirilebilmektedir. PVA-NaCAS filmlerinin çapraz bağlanması için formaldehit, glutaraldehit (GLA), borik asit (BA) ve tannik asit (TA) gibi çeşitli kimyasal kullanılabilir (Sreedhar et al. 2005; Audic and Chaufer 2005; Picchio et al. 2018).

Bu çalışmada PVA-NaCAS-çapraz bağlayıcı filmleri çözeltiden dökme yöntemi ile hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak GLA, TA ve BA seçilmiş ve elde edilen filmlerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

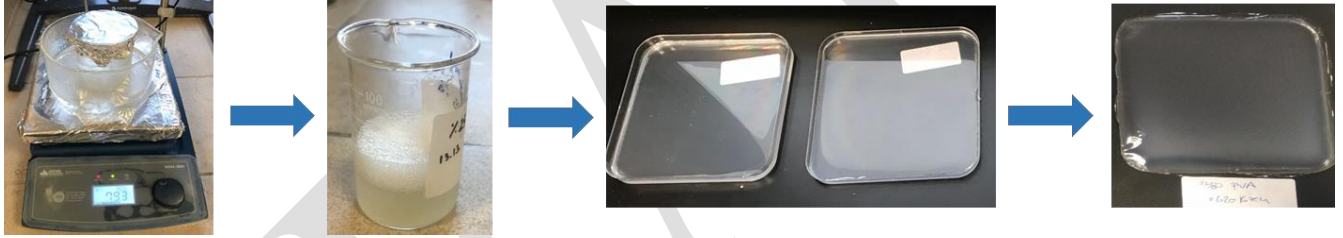
## 2. MALZEMELER VE YÖNTEM

### 2.1. Malzemeler

Çalışmada, Sodyum kazeinat (Acros Organics), Borik asit (Merck), Gluteraldehit (ağırlıkça %50 su içeren), Tannik asit (Unitan) ve PVA (Arkem-Poval-47-88) kullanılmıştır.

### 2.2. Filmlerin Hazırlanması

PVA ve NaCAS için çözücü olarak saf su kullanılmıştır. NaCAS ve PVA çözeltileri kütlece %6'lık olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır NaCAS için çözünme koşulları 40°C'de 1 sa iken PVA için 80°C'de 1 saattir. Hazırlanan PVA ve NaCAS çözeltileri hacimce 70:30 oranında karıştırılarak 80°C'de 15 dk manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışıma kütlece %0.5 - 1.0 oranlarında TA, BA ve GLA eklenmiştir. Son çözeltiler 120x120 mm polistiren petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Film üretim adımları Şekil 1'de gösterilmektedir.



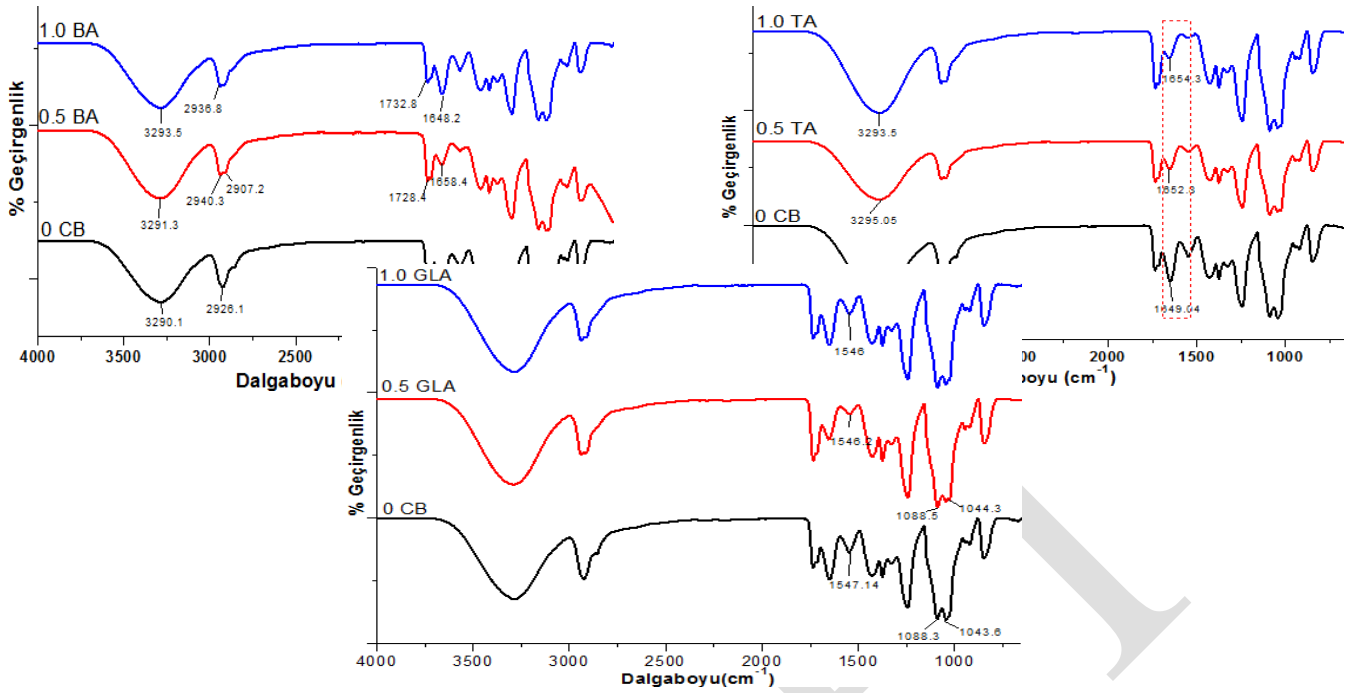
### 2.3 Karakterizasyon Yöntemleri

Çekme testi 10 mm/dk çekme hızı ile Instron universal çekme cihazı ile yapılmıştır. Çekme dayanımı ve uzama değerleri belirlenmiştir. Termogravimetrik analiz 20 °C/dk ısıtma hızı ile 25 °C - 600 °C aralığında N<sub>2</sub> atmosferinde gerçekleştirilmiştir Bozunma sıcaklıkları ve kütle kaybı değerleri elde edilmiştir. Temas açısı ölçümleri Attention Theta Lite temas açısı cihazı ile yapılmıştır. Test sıvısı olarak su kullanılmıştır. Her örnek için beş ölçüm yapılmış ve ortalama temas açıları hesaplanmıştır. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) analizi 4000-650 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında Perkin-Elmer Spectrum 100 cihazında gerçekleştirilmiştir.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

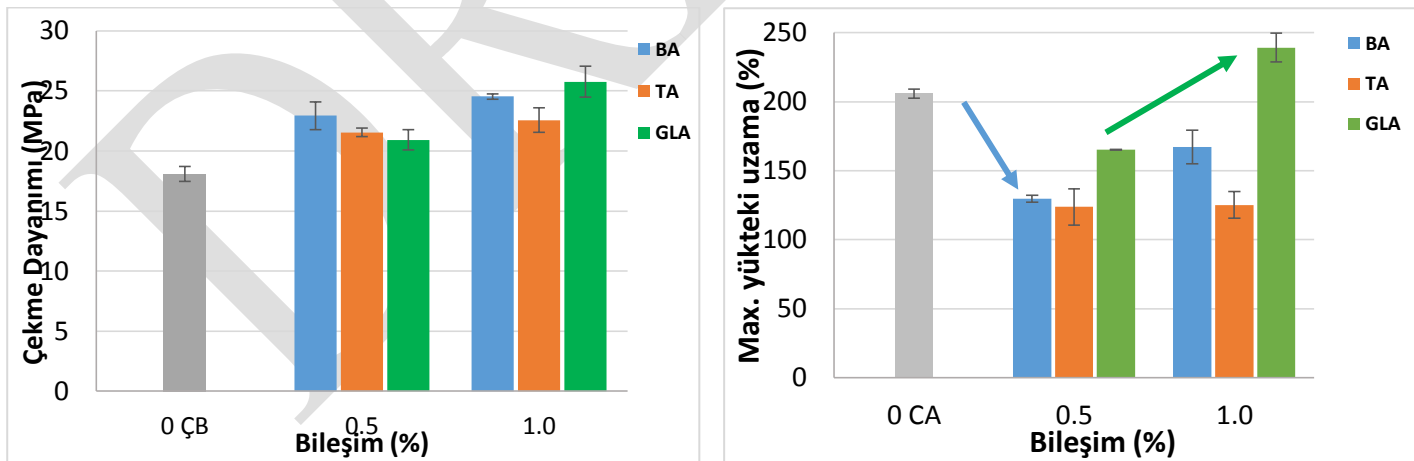
### 3.1. Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR)

Çapraz bağlayıcı içermeyen (0 ÇB) ve içeren PVA/NaCAS filmlerinin FTIR spektrumları Şekil 2'de görülmektedir. Tüm filmlerde 3200-3300 cm<sup>-1</sup> dalga boylarında görülen geniş pik -OH gerilmesine atfedilir. Kazeinin karakteristik pikleri 1640-1650 cm<sup>-1</sup> aralığında amid I bağı (CONH), 1533-1543 cm<sup>-1</sup> civarında amid II (N-H) gözlemlenmiştir. ÇB ilavesi ile 2907 cm<sup>-1</sup> dalga boyunda yeni bir pik (C-H) gözlemlenmiştir. TA eklenmesi ile 1649 cm<sup>-1</sup> amid I (C=O) ve 1545 cm<sup>-1</sup> amid II (N-H) piklerinde kayma ve yükseklik değişimi olmuştur. GLA içeren filmlerde ise -OH pik alanlarında daralmalar belirlenmiştir.



### 3.2. Çekme testi

Çekme testi sonucunda elde edilen çekme dayanımı ve uzama değerleri Şekil 3'te verilmiştir. Çekme dayanımı grafiği incelendiğinde ÇB ilavesi ile %15.8-%42.5 arasında artış olduğu görülmektedir. 0.5 yüklemde en yüksek çekme dayanımı BA içeren filmde gözlenirken 1.0 yüklemde GLA içeren filmler en yüksek değeri vermiştir. BA ve GLA miktarı artışı ile çekme dayanımında artış olmuştur. TA ilavesi ile dayanımda genel bir artış olurken, yükleme miktarı ile değişim gözlenmemiştir. Uzama değerlerinde ise ÇB ilavesi ile genel olarak düşüş vardır. 0.5 ve 1.0 yüklemde en yüksek uzama GLA filmlerinde olmuştur. 1.0 GLA ilavesi uzama değerinde % 16 artış sağlamıştır. TA ilavesi ile kopmada uzama düşerken, yükleme miktarı ile değişim olmamıştır.



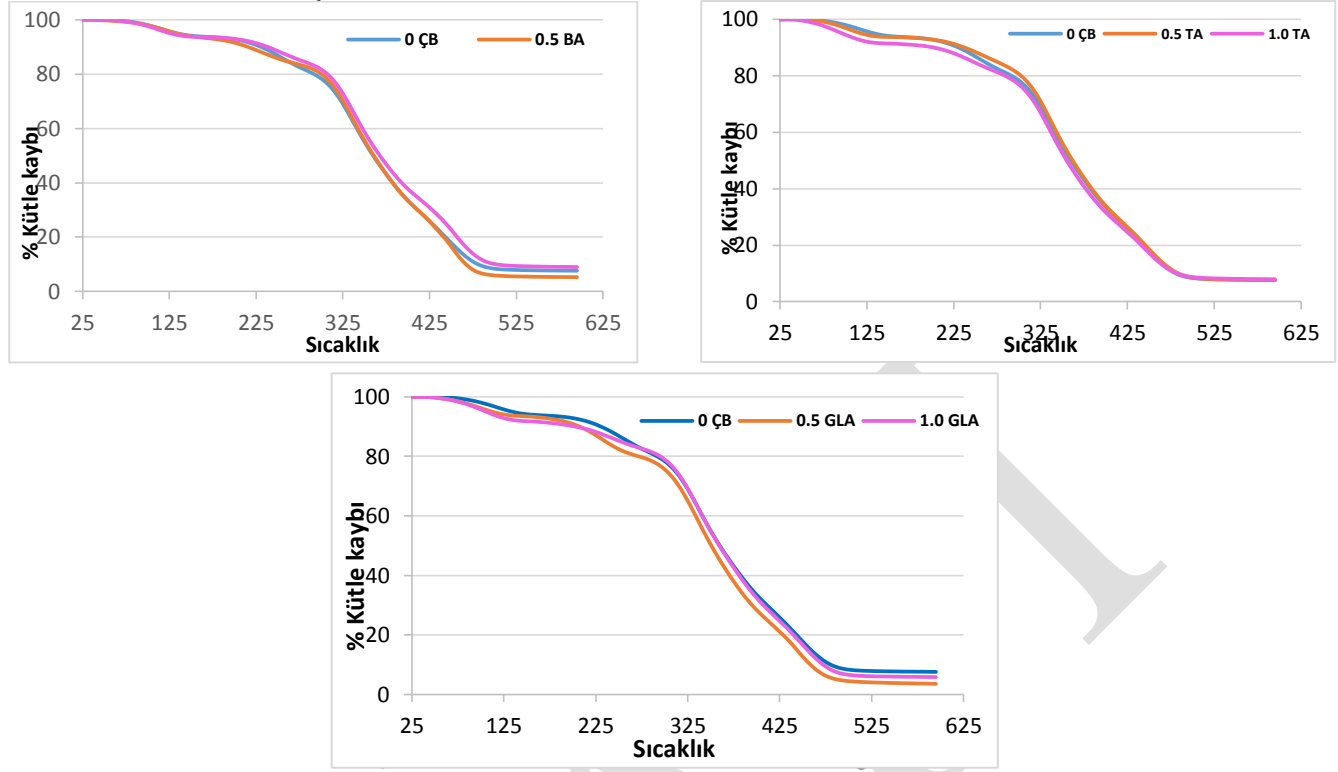
Şekil 3. PVA-NaCAS filmlerinin mekanik özellikleri

### 3.3. Termogravimetrik Analiz

Numunelerin ısı kararlılığını belirlemek için TGA yapıldı. Isıl kararlılık, bir malzemenin fiziksel özelliklerini belirli bir süre ve sıcaklık içinde koruyabilmesidir. Malzemenin kimyasal yapısı ve bileşimi ile ilgili bir özelliktir. Şekil 4'te görüldüğü gibi filmler çoklu bozunma sergilemişlerdir. Bunlar nem varlığı, PVA ana zincirinin ve protein yapısının bozunmasından kaynaklanabilmektedir. TGA eğrilerinden elde edilen veriler Tablo 1'de sunulmuştur. Tüm filmlerde 82-103 °C aralığında görülen bozunma su kaybından kaynaklanmaktadır. 290-310 °C aralığındaki bozunma ise ana zincir bozunmasının başladığı noktadır. ÇB ilavesi ile  $T_{onset-2}$  değerlerinde 20 °C'ye kadar artış olmuştur. Yani çapraz bağlayıcılar ısıl dayanımı



iyileştirmişlerdir. En yüksek  $T_{\text{onset-2}}$  1.0 GLA filminde gözlenmiştir. 600 °C'deki kalıntı miktarı % 3.61 - 9.0 aralığında değişmiştir. GLA ilavesi ile kalıntıda düşüş olmuştur. Yani GLA bozunma başlangıç sıcaklığını artırırken hızını da artırmıştır.

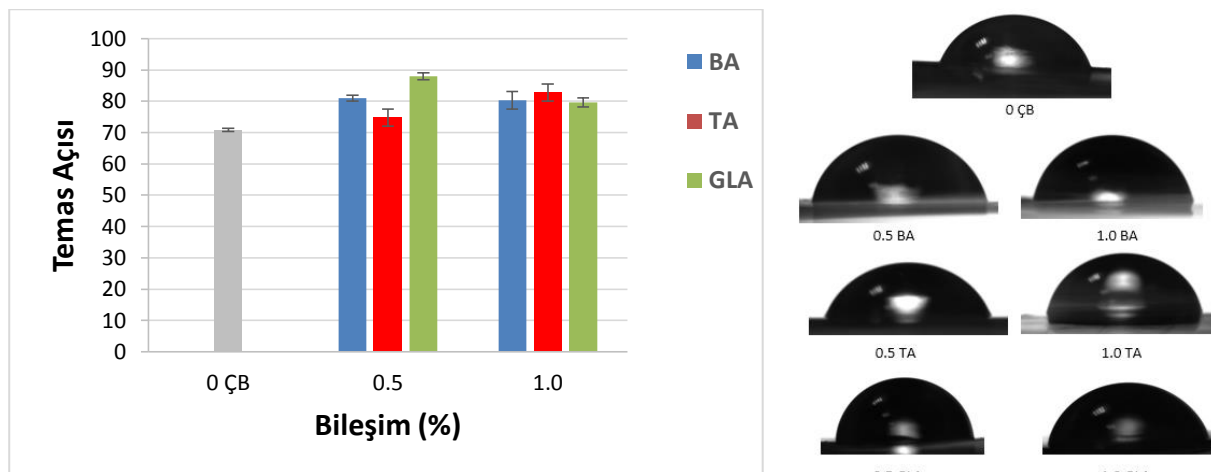


**Tablo 1.** PVA-NaCAS filmlerinin ısıl özellikleri

Örnek	$T_{\text{onset-1}}$ (°C)	$T_{\text{endset-1}}$ (°C)	$T_{\text{onset-2}}$ (°C)	$T_{\text{endset-2}}$ (°C)	Kalıntı 600°C(%w.)
<b>0 ÇB</b>	93.23	140.35	290.25	427.93	7.63
<b>0.5 BA</b>	96.98	128.46	309.50	429.25	5.27
<b>1.0 BA</b>	98.00	124.58	310.39	432.35	9.0
<b>0.5 TA</b>	89,75	105,66	304,70	428,89	7,62
<b>1.0 TA</b>	82,56	115,99	291,70	423,82	7,94
<b>0.5 GLA</b>	83,51	116,41	298,74	421,02	3,61
<b>1.0 GLA</b>	103,26	106,51	310,99	426,36	5,90

### 3.4. Temas açısı

Temas açısı, malzemelerin hidrofilik-hidrofobik karakteristiğinin bir ölçüsüdür. Hidrofilik filmlerin temas açısı değeri 90° altındadır ve temas açısı değeri düştüğünde, su molekülleri yüzeyde daha kolay yayılır. Her numunenin yüzeyi için ölçülen temas açısı değerleri, Şekil 5'te gösterilmiştir. PVA-NaCAS filmlerinin su temas açıları 90°'den küçük olduğundan film yüzeyleri hidrofiliktir. Yapıya ÇB ilavesi ile temas açısında artış görülmüştür. En yüksek açı 0.5 GLA filminde 87 °'dir. Artan BA ve GLA miktarı ile açıda düşüş olurken, artan TA miktarı ile artış olmuştur.



Şekil 5. PVA-NaCAS filmlerinin temas açısı sonuçları

#### 4. SONUÇ

Bu çalışmada PVA-NaCAS-çapraz bağlayıcı filmleri çözeltiden dökme yöntemi ile hazırlanmış ve üç farklı çapraz bağlama ajanının yükleme oranlarının etkileri incelenmiştir. Filmlerin mekanik, termal ve yapısal özellikleri karakterize edilmiş, uygun çapraz bağlayıcı ve miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Çapraz bağlayıcı ilavesi ile çekme dayanımı artmış uzama değeri düşmüştür. En yüksek çekme dayanımı 1.0 GLA örneğinde gözlenmiştir. TGA’da filmler çoklu bozunma sergilemiştir. ÇB ilavesi ile ısıl bozunma sıcaklığı artmıştır. FTIR analizi sonucunda ÇB ilavesi ile PVA-NaCAS filminin yapısında önemli değişiklikler gözlemlenmemiştir. Temas açısı ölçümlerine göre Tüm filmler hidrofilik özelliktedir. ÇB ilavesi ile temas açısında genel artış gözlenmiştir. Tüm ÇB türleri karşılaştırıldığında; PVA-NaCAS filmi için en iyi özellikleri GLA sağlamıştır.

#### KAYNAKLAR

- Audic J and Chaufer B 2005. “Influence of Plasticizers and Crosslinking on the Properties of Biodegradable Films Made from Sodium Caseinate. *European Polymer Journal*, 41 (8): 1934–42.
- Bonnaillie LM, Zhang H, Akkurt S, Yam KL, and Tomasula PM 2014. Casein Films: The Effects of Formulation, Environmental Conditions and the Addition of Citric Pectin on the Structure and Mechanical Properties. *Polymers*, 6 (7): 2018–36.
- Gómez-Estaca BJ, Gavara R, Catalá R, and Hernández-Muñoz P 2016. The Potential of Proteins for Producing Food Packaging Materials: A Review. *Packaging and Technology and Science*, 29 (May), 203–24. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pts.893/abstract>.
- Limpan N, Prodpran T, Benjakul S and Prasarnpran S. 2012. Influences of Degree of Hydrolysis and Molecular Weight of Poly ( Vinyl Alcohol ) ( PVA ) on Properties of Fi Sh Myo Fi Brillar Protein / PVA Blend Fi Lms. *Food Hydrocolloids*, 29: 226–33.
- Ma Q, Du L, Yang Y and Wang L 2016. Food Hydrocolloids Rheology of Fi Lm-Forming Solutions and Physical Properties of Tara Gum Film Reinforced with Polyvinyl Alcohol(PVA). *Food Hydrocolloids*, 63: 677–84.
- Pan Y, Farmahini-Farahani M, O’Hearn P, Xiao H and Ocampo H. 2016. An Overview of Bio-Based Polymers for Packaging Materials. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 1 (3): 106–13.
- Picchio ML, Linck YG, Monti G, Gugliotta LM, Minari RJ and Igarzabal CIA 2018. Casein Films Crosslinked by Tannic Acid for Food Packaging Applications. *Food Hydrocolloids*, 84: 424–34.
- Sreedhar B, Sairam M, Chattopadhyay DK, Rathnam PAS and Rao DVM 2005. Thermal, Mechanical, and Surface Characterization of Starch-Poly(Vinyl Alcohol) Blends and Borax-Crosslinked Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 96 (4): 1313–22.
- Jun-feng S, Huang Z, Zhao Y, Yuan Wang X and Li M 2010. Moisture Sorption and Water Vapor Permeability of Soy Protein Isolate / Poly ( Vinyl Alcohol )/ Glycerol Blend Films. *Industrial Crops and Products*, 31: 266–76.
- Durmaz UB and Aytac A 2019. Development and Characterization of Poly(Vinyl Alcohol) and Casein Blend Films. *Polymer International*, 68 (6): 1140–45.

## Isolation of lignin from biomass using deep eutectic solvents in microwave reactor

Murat Sert

Ege University, Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, İzmir, Turkey

Corresponding author e-mail: murat.sert@ege.edu.tr

### Abstract

Biomass has great potential in Turkey due to the appropriate climate condition. Although its complex structure, biomass can be converted to useful products and can be replaced by fossil fuels. The complex structure of biomass results in difficulty of conversion processes. Before utilization of biomass, pretreatment plays crucial role. Generally, chemical processes are employed for the pretreatment of biomass. The traditional processes used in the isolation of cellulose, hemicellulose and lignin produce huge amount of solvents or waste and cause environmental pollution.

Deep eutectic solvents (DES) have been attracted attention in the processing of biomass. Deep eutectic solvents used in this study, were made of a hydrogen bond donor and hydrogen bond acceptor. At eutectic point, DES is clear, homogeneous solution and DESs have a capability to solve biomass samples.

Based on biomass, it may contain varying amount of cellulose, hemicellulose and of lignin. In this study, DESs were used in the isolation of lignin from biomass in microwave reactor. Removal of lignin is important in biomass processing; during process lignin may cause coke formation and reduction in amounts of valuable products. In this study, almond shell was used as biomass sample, also DES formed by choline chloride and oxalic acid. Experiments were carried out at temperatures of 160, 170 and 180°C and reaction times of 1.0, 2.5 and 5 minutes. The maximum lignin isolation was found as 89% at 170°C within 2.5 min.

**Keywords:** biomass, deep eutectic solvents, lignin, isolation

### INTRODUCTION

Biomass is defined as waste materials from plants and animals, and converting biomass into valuable products has been attracted in industrial and academic area (Chen, 2019). Plant biomass is rich in lignocellulose approximately by 90%. Lignocellulosic biomass are composed of cellulose, hemicellulose and lignin. Among these components, lignin is promising material. Lignin is a highly branched, three-dimensional and amorphous polymeric substance, and is the second most abundant polymer (Athinarayanan et al., 2018). Lignin can be used in many fields due to its superior properties. Lignin is a heterogeneous and phenolic polymer to be found in most plants in the approximate range of 15 to 40% dry weight Lignin has some attractive functions such as UV blocking, antioxidant, and antimicrobial activities have motivated high value-added applications of lignin (Lee et al., 2019).

Among main components of biomass, lignin acts as glue that binds cellulose and hemicellulose, imparting rigidity and microbial resistance to the cell wall. It is required to isolate lignin in a chemically unchanged form (Shady et al., 2018). Compared to cellulose and hemicellulose, lignin is very complicated molecule since its structure and bonding between various units varies according to plant species, age of plant, type of plant, growing conditions and most importantly isolation procedure employed for its extraction. Due to this complexity associated with the structure, very little attention is paid towards its catalytic conversion to synthesize value added chemicals (Singh et al., 2016).

Isolation of lignin from lignocellulosic material is the first step to add value. There are several methods for the isolation of lignin. All isolation procedures carry out at different conditions like pH, temperature, pressure, time and solvents. According to these conditions, the structural and chemical properties are affected (Singh et al., 2016). In literature, there are numerous extraction methods such as Kraft pulping, Sulfite pulping, soda pulping, organosolv pulping, enzymatic hydrolysis of biomass (Wang et al., 2019).

To secure native lignin used for characterization, the ideal isolation method requires low temperature, high yield, and minimum modification on lignin structure (Wang et al., 2019). Alternative more efficient, cheaper and environmentally friendly methods should be developed. So, in this study, isolation of lignin was carried out at milder conditions in the presence of deep eutectic solvents (DES).

DESs are eutectics usually prepared by mixing a hydrogen bond acceptor (HBA) and a hydrogen bond donor (HBD) with simultaneous heating and stirring until a liquid is formed. The DES remains a liquid at ambient temperature due to the formation of intermolecular hydrogen bonds, causing to a decreased freezing point (Patzold et al.). Particularly, these intramolecular hydrogen bonds in DESs render the high possibility of breaking strong hydrogen bonds among biomass, hence the high biomass solubility and the favourable conversion rate (Chen et al., 2019).

In this study, almond shell was selected as biomass sample. Lignin was isolated in microwave reactor in the presence of deep eutectic solvent formed by oxalic acid and choline chloride. The effects of temperature, and time was studied. The obtained lignin recoveries were compared with that of Van Soest method which was the mostly used traditional method for the fractionation of biomass.

## MATERIALS AND METHODS

### *Biomass Sample: Almond Shell*

In this study, almond shell sample was used as a biomass sample. Some properties of almond shell was given in Table 1. CHNS contents were measured in Karlsruhe Technical University. The amount of other elements was measured by dissolving almond shell in HCl after heating at 550 °C in ICP-OES with the help of standard solutions. Cellulose, lignin and hemicellulose contents were made according to VAN SOEST method in our laboratory to compare the results obtained by our alternative isolation method.

**Table 1** Properties of Almond shell

	<b>Almond Shell</b>
Moisture	7.7
Ash	0.92
Protein	1.85
<b>Composition, % (dry, without ash)</b>	
Extractives	4.37
Cellulose	43.06
Hemicellulose	23.32
Lignin	28.8
<b>Elemental Analysis, %</b>	
C	48.83
H	6.91
N	0.01
S	0.02
K	0.41
Ca	0.26
Mg	0.03
Al, Fe, Cr, Cu, Mn	0.01

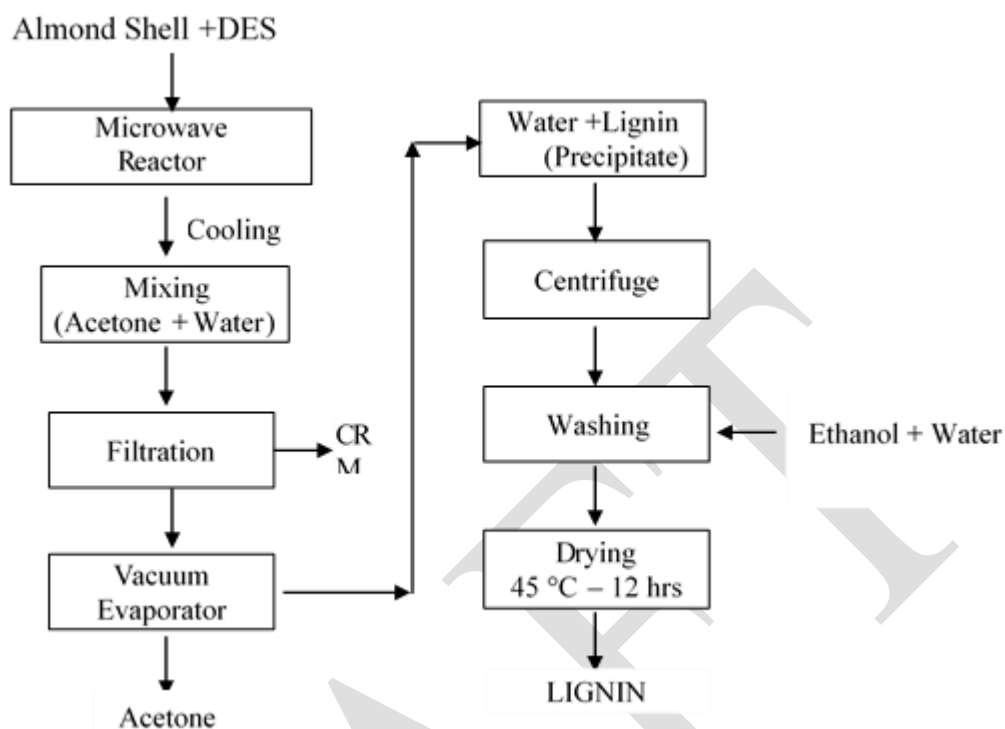
### *Deep Eutectic Solvent*

In isolation of lignin from almond shell, DES formed by choline chloride and oxalic acid was used. The equimolar amounts of choline chloride and oxalic acid were mixed and heated at 80°C, mixing was continued until homogeneous liquid formed. Then obtained solvent was stored desiccator to prevent from moisture.

### *Lignin Isolation*

Isolation of lignin was performed in microwave reaction system (Anton Paar-Monowave Edu). The isolation procedure was given in Figure 2. First, 0.3 g of almond shell was mixed with 1.15 g of DES and fed to the microwave reactor. The operation temperatures were 160, 170 and 180 °C. After heat treatment, the mixture was cooled to room temperature. 40 mL Acetone-Water (vol. 1:1) solution was added to biomass mixture. Cellulose rich material (CRM) was separated from reaction mixture via filtration. The filtrate was sent to

vacuum evaporator for 2 hours at 55 °C to remove acetone. Water and precipitate lignin was obtained after this step. Lignin was separated from water by centrifuge. Lignin rich material was washed with ethanol-water (vol. 1:9) to remove impurities. Finally, lignin was dried at 50 ° in a vacuum dryer.



**Figure 2** Isolation of lignin procedure from almond shell

## RESULTS

The isolation of lignin from almond shell in the presence of DES in a microwave reaction system was studied. The effects of process parameter such as temperature and retention time were investigated. The operation temperatures were 150, 160 and 170 °C and the retention time was varied as 1.0, 2.5 and 5.0 minutes. The effects of temperature and time on the isolation process was given in Figures 3-5.

According to Van Soest method, the lignin content was found as 28.80%. The isolation recovery was determined as;

$$\text{isolation recovery} = \frac{\text{content of lignin by percent}}{28.80} \times 100$$

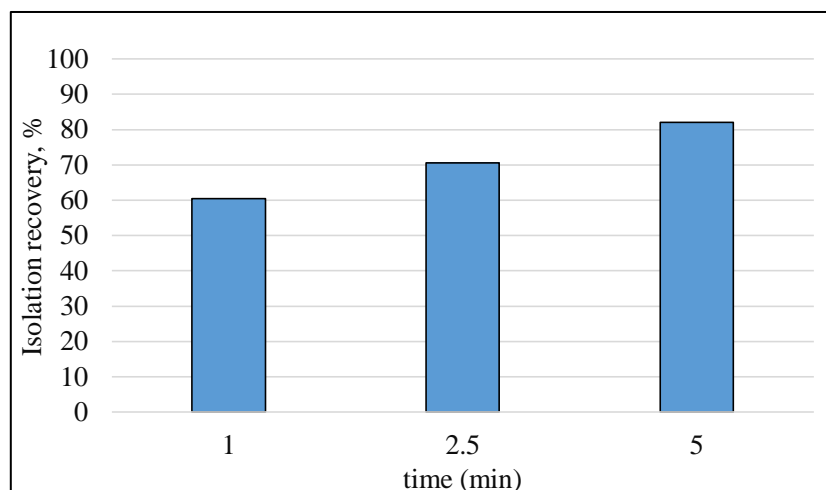


Figure 3. Effects of retention time on the lignin isolation at 160 °C

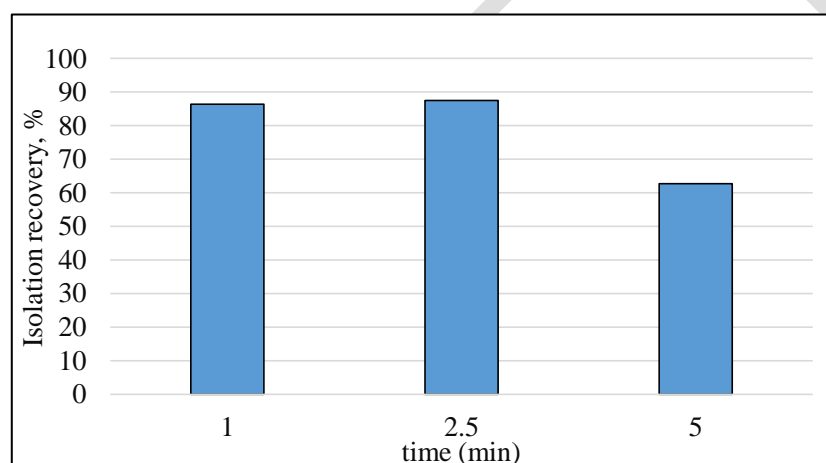


Figure 4. Effects of retention time on the lignin isolation at 170°C

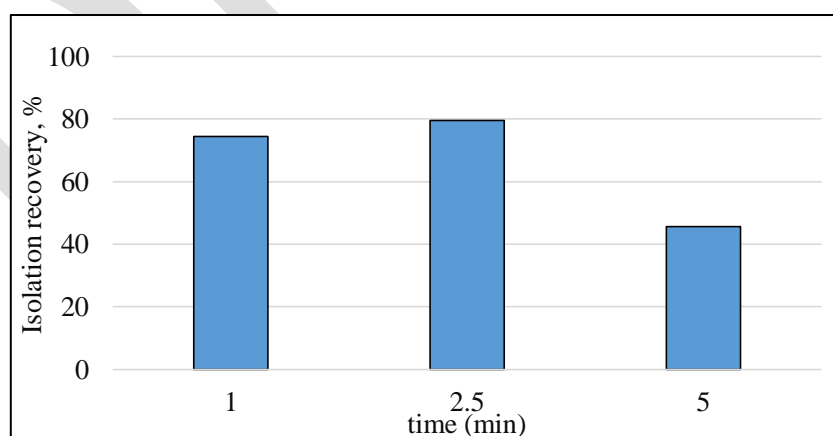


Figure 5. Effects of retention time on the lignin isolation at 180°C

The maximum isolation recovery was obtained at 170°C within 2.5 minutes as 87.48%. At the same temperature, isolation recovery decreased to 62.77% when retention time was increased to 5 minutes. At higher temperatures such as 170 and 180°C, the components of biomass were converted to other products in 5 minutes. So, the optimum retention time was selected as 2.5 minutes.

## CONCLUSION

The effect of temperature and retention time was investigated on the isolation of lignin from almond shell in the presence of acidic catalyst. DESs are green solvents which can be used as both catalyst and solvent due to the capable of solvation of biomass. DES formed by choline chloride and oxalic acid was found as the efficient solvent for the isolation of lignin by obtaining acidic medium. It was known that the operating conditions of isolation process affect the properties of isolated lignin. Isolation of lignin in microwave reactor in the presence of DES was found to be efficient method when compared to conventional methods. Also microwave heating provides ultra-fast processing of biomass.

## REFERENCES

- Athinarayanan J, Periasamy V.S, Qasem, A.A, Alshatwi A.A, 2018. Borassus flabellifer biomass lignin: Isolation and characterization of its antioxidant and cytotoxic properties. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 10: 89-96.
- Chen Y, Mu T, 2019. Application of deep eutectic solvents in biomass pretreatment and conversion. *Green Energy & Environment*, 4: 95-115.
- Lee S.C, Tran T.M, Choi J.W, Wona K, 2019. Lignin for white natural sunscreens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122: 549-554.
- Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D, Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>.
- Shady S.H, Williams G.A, Jaiswal A.K, 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262: 310–318.
- Singh S.K, Dhepe P.L, 2016. Isolation of lignin by organosolv process from different varieties of rice husk: Understanding their physical and chemical properties. *Bioresource Technology*, 221: 310-317.
- Wang H, Pu Y, Ragauskas A, Yang B, 2019. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresource Technology*, 271: 449-461.

## Krom uygulamalarının baklagil bitkilerinin verimine ve besin elementleri alımına etkileri

Ahmet Demirbas<sup>1\*</sup>, Nail Altunay<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Sivas, Türkiye.

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Sivas, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: [ademirbas@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ademirbas@cumhuriyet.edu.tr)

### Özet

Çalışma nın amacı, farklı krom (Cr) dozlarının nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin verimine ve besin elementi alımına etkilerini araştırmaktır. Çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü'nde tesadüf parselleri deneme desenine göre üç yinelemeli olarak sera koşullarında yürütülmüştür. Araştırmada 3 kg kapasiteli plastik saksılar kullanılmış ve Cr dozları; 0 mg kg<sup>-1</sup>, 2.5 mg kg<sup>-1</sup>, 5 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> şeklindedir ve test bitkisi olarak nohut, bakla, bezelye, fasulye kullanılmıştır. Hasattan sonra, yeşil aksam kuru madde üretimi, makro ve mikro element konsantrasyonları belirlenmiştir. Sonuçlara göre, en yüksek yeşil aksam kuru madde üretimini, 5.20 g bitki<sup>-1</sup> ile nohut bitkisinde 2.5 mg kg<sup>-1</sup> Cr uygulamasında belirlenmiştir. Ayrıca, fosfor (P), demir (Fe), mangan (Mn) ve bakır (Cu) konsantrasyonları sırasıyla %0.65 P, 203.1 mg Fe kg<sup>-1</sup>, 47.2 mg Mn kg<sup>-1</sup> ve 11.5 mg Cu kg<sup>-1</sup> olarak 2.5 mg kg<sup>-1</sup> Cr uygulamasında artmıştır. Bununla birlikte çalışmada, en yüksek potasyum (K) ve çinko (Zn) konsantrasyonları 10 mg kg<sup>-1</sup> Cr uygulamasında belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Krom, baklagil, verim, makro-mikro elementler

### The effects of chromium applications on yield and nutrient uptake of legume plants

#### Abstract

The aim of the study was to investigate the effects of different chromium (Cr) doses on yield and nutrient uptake of chickpea, faba bean, pea and bean plants. The study has been carried out under greenhouse conditions with three replications in University of Sivas Cumhuriyet, Department of Crop and Animal Production. In the study, plastic pot was used with the capacity of 3 kg and Cr doses were; 0 mg kg<sup>-1</sup>, 2.5 mg kg<sup>-1</sup>, 5 mg kg<sup>-1</sup>, 10 mg kg<sup>-1</sup> and chickpea, faba bean, pea, bean plants were used as test plants. The shoot dry matter production, macro and micro elements concentrations were determined after harvest. According to the results, the highest shoot dry matter production was determined with 5.20 g pot<sup>-1</sup> in 2.5 mg Cr kg<sup>-1</sup> application in chickpea plant. In addition, phosphorus (P), iron (Fe), manganese (Mn) and copper (Cu) concentrations increased with 2.5 mg Cr kg<sup>-1</sup> application respectively 0.65 %P, 203.1 mg Fe kg<sup>-1</sup>, 47.2 mg Mn kg<sup>-1</sup>, 11.5 mg Cu kg<sup>-1</sup>. However, the highest potassium (K) and zinc (Zn) concentrations was determined in 10 mg Cr kg<sup>-1</sup> application in the study.

**Key words:** Chromium, legume, yield, macro-micro elements

#### GİRİŞ

Yeryüzündeki miktarı 100–300 µg/g aralığında değişen ve dünyada en çok bulunan yedinci elemen olan krom (Cr) (McGrath ve Smith, 1990) hava, toprak ve su ekosistemlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Krom günümüzde özellikle paslanmaz çelik üretimi, çeşitli lehim ve pas engelleyicilerin üretimi ile ilgili metalürji endüstrisi ve yapı malzemeleri, boya, cila, cam ve seramik malzemeleri, deri endüstrisi gibi birçok alanlarda kullanılmaktadır (Özbek ve ark., 1995). Niess, (1999) bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni) ve kobalt (Co) gibi bazı ağır metallerin bitki büyüme ve gelişimi için gerekli mikro besin elementleri olduğunu, arsenik (As), civa (Hg), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi bazı ağır metallerin ise bitki gelişimi için gerekli olmayan elementler olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, krom insan ve hayvanlar için mutlak gerekli olan bir elementtir ve krom alınabilirliğinin düşük olması, bitkilerin krom içeriğinin de düşük olmasına (genelde 0.1-1 mg Cr/kg kuru madde) neden olmaktadır (Özbek ve ark., 1995).

Fasulye, bezelye, mercimek, börülce, nohut ve baklayı içine alan yemeklik tane baklagiller binlerce yıldır insanların diyetlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar (Pekşen ve Artık, 2005). Günümüzde protein ihtiyacının yaklaşık % 70'i bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır ve %16-34 arasında ortalama olarak da %



22-25 arasında bitkisel protein içeren, üstün besleme kabiliyetine sahip yemeklik tane baklagiller bu yönüyle oldukça önemlidir. Devos (1998), baklagillerin bazı besin özelliklerinin daha belirgin olarak ortaya çıkmaya başlaması ile, A.B.D. ve bazı Batı Avrupa ülkelerinde baklagillere karşı bir talep artışı görülmeye başladığını ifade etmiştir.

Bu çalışmanın amacı, farklı dozlarda Cr uygulamalarının insan beslenmesinde oldukça önemli bir yeri olan nohut, bakla, fasulye ve bezelye bitkilerinin verimine ve besin elementleri alınımına olan etkilerini araştırmaktır.

## MATERYAL VE METOT

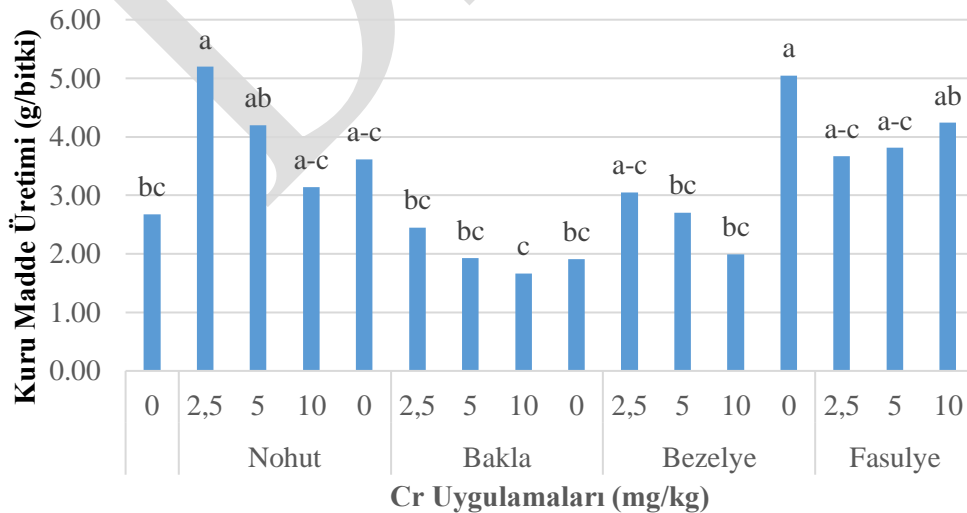
Araştırma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksek Okulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü seralarında 3 yinelemeli olarak 3 kg toprak kapasiteli saksılarda tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür. Araştırmada kullanılan toprak siltli-killi-tın, hafif alkalın (pH 7.36), kireçli (%13.0), yarıyıllı fosfor konsantrasyonu düşük, (3.88 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/da) ve potasyum konsantrasyonu yeterlidir (89.3 kg K<sub>2</sub>O/da). Araştırmada Cr dozları; 0 mg/kg Cr, 2.5 mg/kg Cr, 5 mg/kg Cr ve 10 mg/kg Cr şeklindedir ve Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> şeklinde verilmiştir. Temel gübreleme olarak her saksıya 100 mg kg<sup>-1</sup> N (CaNO<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O), 100 mg kg<sup>-1</sup> P ve 125 mg kg<sup>-1</sup> K (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 2.5 mg Zn kg<sup>-1</sup> (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) ve 2.5 mg kg<sup>-1</sup> Fe (Fe-EDTA) uygulanmıştır. Araştırmada, nohut (Seçkin), bakla (Negrata), fasulye (Özayşe) ve bezelye (Karin) bitkileri test bitkisi olarak kullanılmış ve başlangıçta her saksıya 3 adet bitki ekilmiş, çıkıştan sonra her saksıda 1 bitki kalacak şekilde seyreltme yapılmış ve ekimden yaklaşık 60 gün sonra bakla bağlama dönemi başlangıcında hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasat sonrasında baklagil bitkilerinin kök üstü aksamı sabit ağırlığa gelinceye kadar 48 saat boyunca 65 °C'de kurutulmuş ve kuru madde üretimi için ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra agat değirmende öğütülen örneklerden 0.200 g alınıp yaş yakmaya tabi tutulmuş ve N konsantrasyonları Kjeldahl destilasyon yöntemine göre (Bremner, 1965), P kolorimetrik olarak 882 nm'de spektrofotometrede (Murphy ve Riley, 1962)'e göre, As, K, Fe, Mn, Zn ve Cu konsantrasyonları ise Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Verilerin istatistik analizinde SPSS 22.0 programı kullanılmış, uygulamalar arasındaki farklılıklar ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada farklı dozlarda Cr uygulamalarının nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin yeşil aksam kuru madde üretimine etkileri belirlenmiş ve Şekil 1'de verilmiştir.

Araştırmada, en yüksek kuru madde üretiminin 5.20 g/bitki ile nohut bitkisinde 2.5 mg/kg Cr uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Bu uygulamayı ise 5.05 g/bitki ile istatistiki olarak aynı gruba giren fasulye bitkisinin 0 mg/kg Cr uygulaması takip etmiştir. Ayrıca, nohut ve bezelye bitkilerinde Cr uygulamaları kontrole göre kuru madde üretimini arttırmışken, bakla ve fasulye bitkilerinde uygulanana bütün Cr dozları kuru madde üretimini azaltmıştır. Bakla ve fasulye bitkilerinde, kontrol uygulaması olan 0 mg/kg Cr uygulaması sırasıyla 3.61 g/bitki ve 5.05 g/bitki olarak en yüksek kuru madde üretimi sağlamıştır. Krom toksisitesi bitkilerde tohum çimlenmesinin azalmasına neden olmaktadır (Panda ve ark., 2002) ve bu seviyelerde Cr'a maruz kalan bitkilerde, fotosentez ve solunum gibi önemli metabolik süreçlerin olumsuz olarak etkilenmesinden dolayı bitki büyümesinde azalma görülmektedir (Shanker ve ark., 2005).



Şekil 1. Cr uygulamalarının nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin kuru madde üretimine etkisi

Araştırmada farklı dozlarda Cr uygulamalarının nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin Cr, N, P ve K konsantrasyonuna etkileri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Cr Uygulamalarının Nohut, Bakla, Bezelye ve Fasulye Bitkisinin Cr, N, P ve K Konsantrasyonlarına Etkisi

Bitki Çeşiti	Cr Dozları (mg/kg)	Cr (mg/kg)	N	P (%)	K
Nohut	0	0.07 ±0.01i-k	5.37 ±0.56ab	0.33 ±0.01b	2.33 ±0.04a-c
	2.5	0.14 ±0.02g-i	4.42 ±1.41b-f	0.65 ±0.18a	2.32 ±1.07a-c
	5	0.27 ±0.04de	4.39 ±1.17b-f	0.26 ±0.04b	2.77 ±0.06ab
	10	0.61 ±0.06a	4.64 ±0.06a-e	0.24 ±0.04b	2.63 ±0.01a-c
Bakla	0	0.06 ±0.02jk	3.82 ±0.16c-f	0.31 ±0.13b	2.17 ±0.79bc
	2.5	0.22 ±0.04ef	3.46 ±0.31d-f	0.28 ±0.11b	2.90 ±0.49ab
	5	0.34 ±0.04d	1.40 ±0.23g	0.24 ±0.01b	2.72 ±0.62a-c
	10	0.47 ±0.03b	3.20 ±0.23f	0.27 ±0.02b	3.24 ±0.37a
Bezelye	0	0.03 ±0.01k	4.66 ±0.18a-d	0.29 ±0.06b	2.42 ±0.49a-c
	2.5	0.10 ±0.01h-j	5.32 ±1.01ab	0.33 ±0.16b	2.10 ±0.25bc
	5	0.17 ±0.02f-h	5.96 ±0.40a	0.22 ±0.06b	2.24 ±0.42bc
	10	0.33 ±0.04cd	5.00 ±0.52a-c	0.20 ±0.03b	1.79 ±0.14c
Fasulye	0	0.08 ±0.02i-k	3.88 ±0.62c-f	0.32 ±0.04b	3.22 ±0.16a
	2.5	0.20 ±0.01e-g	4.21 ±0.27b-f	0.21 ±0.05b	2.99 ±0.38ab
	5	0.26 ±0.04e	3.22 ±0.18ef	0.31 ±0.03b	3.05 ±0.05ab
	10	0.41 ±0.05b	4.15 ±1.07b-f	0.22 ±0.02b	2.87 ±0.11ab

P<0.05

Cr uygulamaları değerlendirildiğinde, artan Cr dozlarına bağlı olarak her bitkide Cr konsantrasyonunun arttığı belirlenmiştir (Tablo 1). En yüksek Cr konsantrasyonu 0.61 mg/kg ile nohut bitkisinde 10 mg/kg Cr uygulamasında belirlenmiştir. Saltan ve Canbay (2015), halk arasında kullanılan bazı bitkilerde ağır metal konsantrasyonlarını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, ticari ceviz yaprağında krom tespit etmemişlerken, diğer ticari örneklerde ise krom miktarını sırasıyla; ısırgan otunda 5.77 mg/kg Cr, kuzukulağında 24.10 mg/kg Cr ve biberiyede 37.91 mg/kg Cr olarak belirlemişlerdir. Bahçede yetiştirilen örnekler içerisinde ise, kuzukulağı yaprağında en az miktarda (0.22 mg/kg Cr), ceviz yaprağında (0.62 mg/kg Cr), ısırgan otunda (5.33 mg/kg Cr) ve biberiyede en yüksek miktarda (99.42 mg/kg Cr) krom olduğunu tespit etmişlerdir. Özbek ve ark., (1995) kurşunda olduğu gibi, bitki krom aldığı zaman bunun önemli bir kısmının kök veya kök yüzeyi tarafından dışarı verildiğini ve sadece az bir kısmının bitkinin üst organlarına taşındığını, bu nedenle kromun bitkinin çeşitli aksamalarında Kök>Yaprak>Dane sırasına bağlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. N konsantrasyonunda ise %5.96 N ile en yüksek bezelye bitkisinde 5 mg/kg Cr uygulamasında belirlenmiştir. Araştırmada bezelye ve fasulye bitkilerinde N konsantrasyonu Cr uygulamasıyla artarken, nohut ve bakla bitkisinde artan Cr dozlarına bağlı olarak azalmıştır. Nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin P konsantrasyonu değerlendirildiğinde, sadece nohut bitkisinde 2.5 mg/kg Cr uygulamasının önemli olduğu (%0.65 P), diğer bütün uygulamaların istatistiki olarak anlamlı fark yaratmadığı belirlenmiştir. Bitkilerin K konsantrasyonunda ise, en yüksek bakla bitkisinin 10 mg/kg Cr uygulamasında %3.24 K olarak belirlenmişken, en düşük K konsantrasyonu %1.79 K ile bezelye bitkisinde 10 mg/kg Cr uygulamasında belirlenmiştir. Araştırmada N konsantrasyonunun aksine, bezelye ve fasulye bitkilerinde K konsantrasyonu Cr uygulamasıyla azalırken, nohut ve bakla bitkisinde artan Cr dozlarına bağlı olarak artmıştır. Papke (1981), insanların Cr (III) gereksinimlerinin karşılanması açısından, bitkilerin krom içeriğindeki hafif artışın pozitif olarak değerlendirilebileceğini belirtmiştir.

Araştırmada farklı dozlarda Cr uygulamalarının nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin Fe, Zn, Mn ve Cu konsantrasyonuna etkileri Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Cr Uygulamalarının Nohut, Bakla, Bezelye ve Fasulye Bitkilerinin Fe, Zn, Mn ve Cu Konsantrasyonlarına Etkisi

Bitki Çeşiti	Cr Dozları (mg/kg)	Fe	Zn (mg/kg)	Mn	Cu
Nohut	0	139.8 ±17.11bc	15.4 ±0.07bc	17.7 ±1.56fg	7.5 ±0.49f-h
	2.5	155.2 ±13.15bc	18.6 ±2.33ab	20.3 ±0.78fg	8.4 ±0.11d-h
	5	159.6 ±45.96b	16.4 ±2.19a-c	13.0 ±2.33g	6.9 ±0.07hi
	10	131.5 ±7.00bc	16.6 ±2.12a-c	12.6 ±1.48g	6.6 ±0.14hi
Bakla	0	89.2 ±9.05d	16.0 ±0.14a-c	46.8 ±2.55ab	7.1 ±0.42gh
	2.5	146.2 ±6.58bc	16.4 ±2.05a-c	47.2 ±4.31a	9.1 ±1.06c-f
	5	131.8 ±21.99bc	18.7 ±2.26ab	41.4 ±8.41a-c	9.1 ±1.63c-f
	10	116.8 ±2.47cd	20.2 ±0.78a	32.1 ±5.23de	10.6 ±1.06a-c
Bezelye	0	134.3 ±14.99bc	16.3 ±2.26a-c	31.5 ±1.34de	7.8 ±0.99e-h
	2.5	163.4 ±34.15b	16.0 ±0.28a-c	33.1 ±7.21c-e	8.9 ±0.57c-g
	5	144.5 ±14.78bc	15.1 ±2.62bc	26.1 ±1.20ef	7.7 ±0.35f-h
	10	133.8 ±17.47bc	13.3 ±4.95c	16.2 ±5.66g	5.3 ±0.21i
Fasulye	0	138.6 ±8.91bc	14.3 ±1.84bc	38.4 ±3.32a-c	9.6 ±0.35b-e
	2.5	203.1 ±5.73a	16.0 ±1.70a-c	46.4 ±2.76ab	11.5 ±1.77a
	5	145.3 ±6.15bc	17.5 ±1.27a-c	38.1 ±1.13b-d	11.4 ±0.78ab
	10	131.8 ±5.73bc	16.0 ±0.99a-c	36.8 ±6.15 cd	10.2 ±0.92a-d

P<0.05

Nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinin mikroelement konsantrasyonu bakımından Tablo 2 değerlendirildiğinde, en yüksek Fe konsantrasyonu 203.1 mg/kg Fe ile fasulye bitkisinde 2.5 mg/kg Cr uygulamasında saptanmıştır. Araştırmada genel olarak Fe konsantrasyonu 2.5 mg/kg Cr uygulamasına kadar artmış, sonraki dozlarda ise azalmaya başlamıştır. Zn konsantrasyonu ise bakla bitkisinde 10 mg/kg Cr uygulamasında 20.2 mg/kg Zn ile en yüksek olarak saptanmıştır. Araştırmada bezelye hariç diğer bitkilerin Zn konsantrasyonunun Cr uygulamasıyla az da olsa arttığı tespit edilmiştir. Araştırmada en yüksek Mn konsantrasyonu 47.2 mg/kg Mn ile bakla bitkisinde 2.5 mg/kg Cr uygulamasında belirlenmişken, en yüksek Cu konsantrasyonu fasulye bitkisinde 11.5 mg/kg Cu ile Fe konsantrasyonunda olduğu gibi yine 2.5 mg/kg Cr uygulamasında belirlenmiştir. Ayrıca bitkilerin Mn ve Cu konsantrasyonlarının genel olarak 2.5 mg/kg Cr uygulamasına kadar arttığı, sonraki dozlarda azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Akpınar ve Demirbas (2018), farklı dozlarda Zn uygulamasının nohut, bakla, bezelye, fasulye ve buğday bitkilerinin besin elementleri alımına etkilerini belirlemeyi amaçladıkları çalışmada, nohut, bakla, bezelye ve fasulye bitkilerinde en yüksek Fe konsantrasyonunu sırasıyla, 271.2 mg/kg Fe, 320.9 mg/kg Fe, 324.8 mg/kg Fe, 269.3 mg/kg Fe olarak, en yüksek Zn konsantrasyonunu sırasıyla 28.0 mg/kg Zn, 25.9 mg/kg Zn, 35.4 mg/kg Zn, 29.5 mg/kg Zn olarak, en yüksek Cu konsantrasyonunu sırasıyla 23.0 mg/kg Cu, 21.8 mg/kg Cu, 23.4 mg/kg Cu, 22.1 mg/kg Cu olarak, en yüksek Mn konsantrasyonunu sırasıyla 103.4 mg/kg Mn, 94.9 mg/kg Mn, 93.9 mg/kg Mn ve 99.3 mg/kg Mn olarak belirlemişlerdir.

## SONUÇ

Araştırmada, Cr uygulaması nohut ve bezelye bitkilerinde kuru madde üretimini arttırmış, bakla ve fasulye bitkilerinde olumsuz etki yapmış ve kuru madde üretimini azaltmıştır. Makro elementlerden azot konsantrasyonunda genel olarak nohut ve baklada olumsuz, fasulye ve bezelyede olumlu etki yapmış, fosfor konsantrasyonunda önemli bir etkisi olmamış, potasyum konsantrasyonunda ise nohut ve baklada olumlu, fasulye ve bezelyede olumsuz etki yapmıştır. Cr uygulamaları baklagil bitkilerinin mikro element konsantrasyonlarını genel olarak arttırmış, 2.5 mg/kg Cr dozu öne çıkan uygulama olmuştur. Bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, genel olarak 2.5 mg/kg Cr dozundan yüksek dozlarda baklagil bitkilerinin olumsuz etkilendiği söylenebilir.

## KAYNAKLAR

Akpınar C, Demirbas A 2018. The Effects of the Different Zinc Doses Application on Growth and Nutrient Concentration of Wheat, Chickpea, Faba Bean, Pea and Bean Plant. 3rd International Mediterranean Science and Engineering Congress (IMSEC 2018), October 24-26, Adana / TURKEY, Pages: 878-882.

- Bremner JM 1965. Total nitrogen. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbio-logical properties. 1149-1178.
- Devos P 1988. Mercimek ve nohutun besin değeri ve proses sırasındaki değişiklikler (Nutritional value of lentils and chickpeas and changes during processing), Herkes İçin Mercimek Sempozyumu (Lentils for Everyone Symposium) 29-30 Eylül, Marmaris/Muğla, 174-196.
- Mcgrath SP, Smith S 1990. Chromium and Nickel. In: Heavy Metals in Soils (Alloway, B.J., Ed). Wiley, New York. 125- 150
- Murphy J, Riley JP 1962. A modified single solution for the determination of phos-phate in natural waters. *Analtica Chemica Acta*, 27, 31-36.
- Niess DH 1999. Microbial Heavy-Metal Resistance, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 730-750.
- Özbek H, Kaya Z, Gök M, Kaptan H 1995. Toprak Bilimi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 73, Ders Kitapları Yayın No: A-16, 816 s.
- Panda SK, Mahapatra S, Patra IIK 2002. Chromium Toxicity and Water Stress Simulation Effects in Intact Senescing Leaves of Green Gram (*Vigna radiata* L. Var Wilckzeck K851), pp.129-136, In: Panda, S.K., (Ed), *Advances in Stress Physiology of Plants*, Scientific Publishers, India.
- Papke G 1981. Chrom-Studie. Hessische Landesanstalt für Umwelt, Wiesbaden.
- Pekşen E, Artık C 2005. Antibesinsel Maddeler Ve Yemelik Tane Baklagillerin Besleyici Değerleri. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 20 (2): 110-120.
- Saltan FZ, Canbay HS 2015. Eskişehir’de Halk Arasında Kullanılan Bazı Bitkilerdeki Ağır Metal ve Besin Elementlerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19 (1), 83-90.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S 2005. Chromium Toxicity in Plants, *Environment International*, 31 (5): 739-753.

## Çeltik bitkisinde arsenik uygulamaları

Ahmet Demirbas<sup>1\*</sup>, Nail Altunay<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Sivas, Türkiye.

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Sivas, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: [ademirbas@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ademirbas@cumhuriyet.edu.tr)

### Özet

Bu çalışma, farklı arsenik (As) dozlarının pirinç bitkisinin verim ve besin elementi alımına etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışma, 3 kg kapasiteli plastik saksılarda tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekrarlı olarak sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada As dozları; 0 mg kg<sup>-1</sup>, 1 mg kg<sup>-1</sup>, 2 mg kg<sup>-1</sup>, 4 mg kg<sup>-1</sup> şeklindedir ve Gala ve Cameo olarak 2 çeltik çeşiti kullanılmıştır. Çeltik bitkisi ekimden yaklaşık 60 gün sonra hasat edilmiş ve yeşil aksam kuru madde üretimi, makro ve mikro element konsantrasyonları belirlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek yeşil aksam kuru madde üretiminin, 7.96 g saksı<sup>-1</sup> ile Gala çeltik türünde 2 mg kg<sup>-1</sup> As uygulamasında belirlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte, Cameo çeşitinde artan As dozları ile birlikte yeşil aksam kuru madde üretimi azalmıştır. Çalışmada, en yüksek azot (N) ve fosfor (P) konsantrasyonları Gala pirinç çeşitinde sırasıyla 1 mg As kg<sup>-1</sup> (% 1.47 N) ve 4 mg As kg<sup>-1</sup> (% 0.78 P) uygulamalarında belirlenmiştir. Genel olarak, artan As dozları, özellikle Cameo çeltik türünde yeşil aksam kuru madde üretimi, azot, fosfor, potasyum, demir, mangan konsantrasyonlarını azaltmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Arsenik, çeltik, verim, besin elementi alımı

### Arsenic applications in rice plant

#### Abstract

The present study was conducted to investigate the effects of different arsenic (As) doses on yield and nutrient uptake of rice plant. The study has been carried out under greenhouse conditions with three replications according to the experimental pattern of randomized plots in the plastic pots with the capacity of 3 kg. In the study, As doses were; 0 mg kg<sup>-1</sup>, 1 mg kg<sup>-1</sup>, 2 mg kg<sup>-1</sup>, 4 mg kg<sup>-1</sup> and 2 rice species was used as Gala and Cameo. The rice plant was harvested nearly 60 days after sowing and shoot dry matter production, macro and micro elements concentrations were determined. The results have shown that the highest shoot dry matter production was determined with 7.96 g pot<sup>-1</sup> in 2 mg kg<sup>-1</sup> application in Gala rice species. However, shoot dry matter production decreased with increasing As doses in Cameo species. In the study, the highest nitrogen (N) and phosphorus (P) concentrations was determined in Gala rice species respectively in 1 mg As kg<sup>-1</sup> (1.47 %N) and 4 mg As kg<sup>-1</sup> (0.78 %P) applications. Generally, increasing As doses decreased shoot dry matter production, nitrogen, phosphorus, potassium, iron, manganese concentrations especially in Cameo rice species.

**Key words:** Arsenic, rice, yield, nutrient uptake

#### GİRİŞ

Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında gelmektedir (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Yeryüzünde, birçok kayaçta ve toprakta, bol miktarda bulunan 20 elementten biri olan arsenik (As), doğal ve antropojenik kaynaklara ek olarak, tarım arazilerinin As'li su ile sulanması da toprağın As ile kirlenmesine neden olmaktadır (Dahal ve ark., 2008). Bunun yanında, bitki, hayvan ve insanlar için toksik bir element olan arseniğin (Christophersen, 2009) yaygın kaynakları çöp depolama alanlarındaki sızıntılar, gübreler, insektisitler ve herbisitler, ahşap koruyucular, kokusuz boya üretimi, madencilik maden eritme ve kömür tutuşturuculardır (Castillo-Michel, 2007). Son yıllarda, As hem insanlar için hem de bitkiler için toksik olması nedeniyle dünya genelinde dikkat çekmeye başlamıştır. Genellikle hem içme hem de sulama sularından bitkilere, bitkilerden de hayvanlara geçen ve beslenme yoluyla insanlara bulaşan yüksek As derişimleri, çeşitli ülkelerde insanlarda sağlık problemleri yaşanmasına neden olmaktadır (Mayorga ve ark., 2013). Günümüzün en ciddi çevresel sorunlarından biri olarak görülen ağır metal birikimi, bitkiler için toksik olmasının yanında, insanlara ve hayvanlara potansiyel zararları bulunmaktadır (Anita ve ark., 2010). Gulz ve ark., (2005) düşük As miktarının, bitki verimini arttırdığını, yüksek

konsantrasyonlarda bütün bitkilerde toksik etki görüldüğünü, bitkide sararma, kangren, büyümenin engellenmesine ve bunun sonucunda bitkinin ölmesine neden olduğunu bildirmektedirler.

Çeltik (*Oryza sativa* L.) bitkisi, buğdaygiller familyasının bir üyesi olan (Allard, 1960) ve yeryüzündeki çok sayıda insan için temel besin maddelerinden birisidir. Ülkemizde 2016/17 yılında çeltik üretimi 116 bin hektar alanda gerçekleşmiştir. Bu alanların yaklaşık %71'i Marmara Bölgesi'nde yer almış olup, Marmara Bölgesi'ni yaklaşık %26'lık pay ile Karadeniz Bölgesi izlemiştir (Tagem, 2018). Bu çalışmada, insan beslenmesi açısından önemli bir bitki olan çeltik bitkisine farklı dozlarda As uygulamasının verim ve besin elementlerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma, 3 tekrarlı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksek Okulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü seralarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmada her saksıya 2 mm elekten geçirilmiş 3 kg toprak konulmuştur. Araştırmada kullanılan toprak 0-20 cm derinliğinden alınmış, siltli-killi-tın, hafif alkalin (pH 7.24), kireçli (%12.9), yarıyıllı fosfor konsantrasyonu düşük, (3.17 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/da) ve potasyum konsantrasyonu yeterlidir (81.7 kg K<sub>2</sub>O/da).

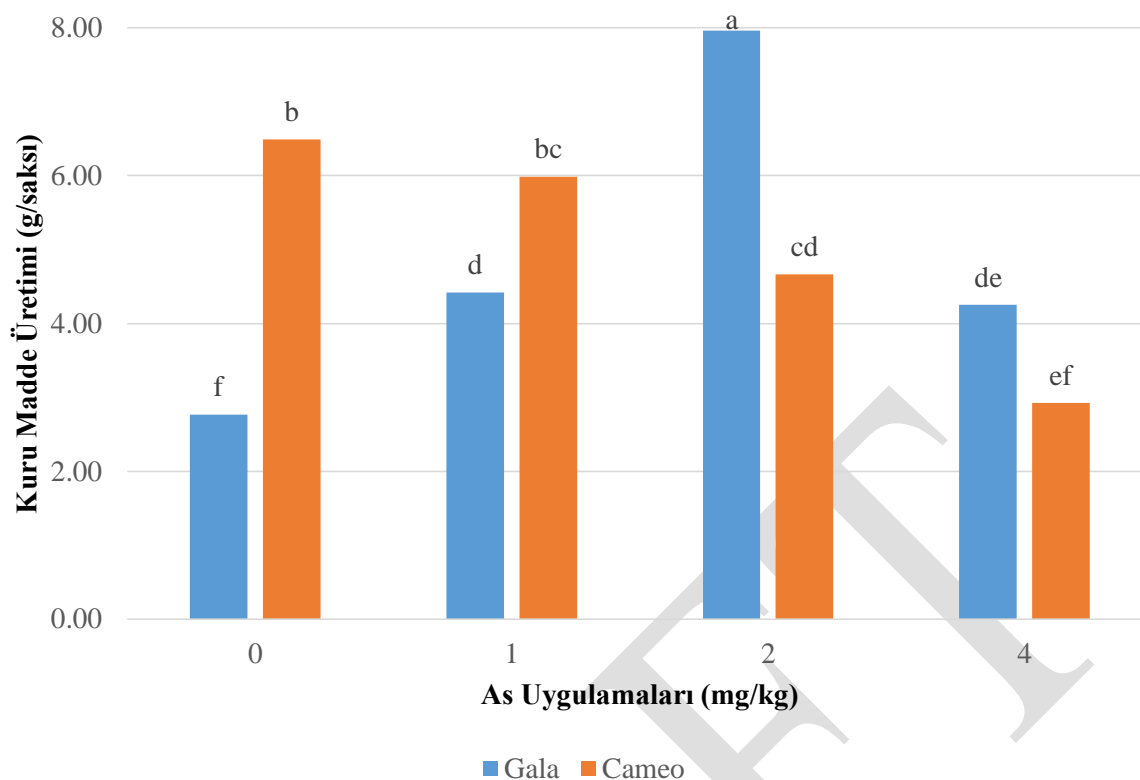
Araştırmada As dozları; 0 mg/kg As, 1 mg/kg As, 2 mg/kg As ve 4 mg/kg As şeklindedir ve As sodyum arsenit (NaAs<sup>III</sup>O<sub>2</sub>) şeklinde verilmiştir. Temel gübreleme olarak her saksıya 200 mg kg<sup>-1</sup> N, 100 mg kg<sup>-1</sup> P, 125 mg kg<sup>-1</sup> K, 2.5 mg Zn kg<sup>-1</sup> ve 2.5 mg kg<sup>-1</sup> Fe uygulanmıştır. Azot CaNO<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O formunda, fosfor ve potasyum KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> formunda, çinko ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O formunda, demir ise Fe-EDTA formunda uygulanmıştır. Araştırmada Gala ve Cameo olmak üzere iki çeltik çeşiti kullanılmış ve başlangıçta her saksıya 5 adet çeltik bitkisi ekilmiş, daha sonra her saksıda 3 bitki kalacak şekilde seyreltme yapılmış ve ekimden yaklaşık 45 gün sonra hasat edilmiştir. Hasat sonrasında çeltik bitkisinin kök üstü aksamı sabit ağırlığa gelinceye kadar 48 saat boyunca 65 °C'de kurutulmuş ve kuru madde üretimi için ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra agat değirmende öğütülen örneklerden 0.200 g alınıp yaş yakmaya tabi tutulmuş ve N konsantrasyonları Kjeldahl destilasyon yöntemine göre (Bremner, 1965), P kolorimetrik olarak 882 nm'de spektrofotometrede (Murphy ve Riley, 1962)'e göre, As, K, Fe, Mn, Zn ve Cu konsantrasyonları ise Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Verilerin istatistik analizinde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar p<0.05 olacak şekilde Tukey testi ile belirlenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada As uygulamalarının çeltik bitkisinin yeşil aksam kuru madde üretimine etkileri belirlenmiş ve Şekil 1'de verilmiştir.

Araştırmada en yüksek kuru madde üretimi 7.96 g/saksı olarak Gala çeltik çeşitinde 2 mg/kg As uygulamasında belirlenmiştir (Şekil 1). Bu uygulamayı ise 6.31 g/saksı kuru madde üretimi ile Cameo çeltik çeşitinde 0 mg/kg As uygulaması izlemiştir. Araştırmada, Gala çeltik çeşitinde bütün As uygulamaları kuru madde üretimini kontrole oranla arttırmıştır, ancak Cameo çeltik çeşitinde artan As dozlarına bağlı olarak bitkinin kuru madde üretimi kontrole göre azalma göstermiştir. Yapılan bir çalışmada sulama suyunda As derişiminin artması ile çeltik bitkisinin kök, gövde ve kabuktaki As derişimleri önemli ölçüde arttığı ve bitki boyu, tane verimi, dolu tane sayısı, tane ağırlığı ve kök biyokütlesinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Abedin ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar, çeltik tanelerinin yüksek konsantrasyonlarda As içerebileceğini ve çeltikin aşırı tüketiminin insanlarda yüksek miktarda As alımına neden olabileceğini göstermiştir (Williams ve ark., 2005). Aslan ve ark., (2018) sera koşullarında yetiştirdikleri yonca bitkisini farklı derişimlerdeki arsenikli su ile sulamışlar ve kontrol saksılarına oranla yonca bitkisinin kuru madde üretiminin arttığını bildirmişlerdir.



Şekil 1. As uygulamalarının çeltik bitkisinin kuru madde üretimine etkileri

Araştırmada farklı dozlarda As uygulamalarının Gala ve Cameo çeltik çeşitlerinin As, N, P ve K konsantrasyonuna etkileri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. As Uygulamalarının Çeltik Bitkisinin As, N, P ve K Konsantrasyonlarına Etkisi

Çeltik Çeşiti	As Dozları (mg/kg)	As (mg/kg)	N	P %	K
Gala	0	0.03 ±0.01 <sup>e</sup>	1.30 ±0.05 <sup>ab</sup>	0.69 ±0.14 <sup>ab</sup>	2.78 ±0.02 <sup>ab</sup>
	1	0.67 ±0.03 <sup>d</sup>	1.47 ±0.11 <sup>a</sup>	0.44 ±0.02 <sup>c</sup>	3.01 ±0.01 <sup>ab</sup>
	2	1.25 ±0.04 <sup>c</sup>	1.26 ±0.04 <sup>ab</sup>	0.54 ±0.04 <sup>bc</sup>	3.05 ±0.02 <sup>ab</sup>
	4	2.07 ±0.08 <sup>b</sup>	1.20 ±0.43 <sup>ab</sup>	0.78 ±0.05 <sup>a</sup>	1.51 ±1.38 <sup>b</sup>
Cameo	0	0.05 ±0.01 <sup>e</sup>	1.27 ±0.09 <sup>ab</sup>	0.69 ±0.03 <sup>ab</sup>	2.81 ±0.11 <sup>ab</sup>
	1	0.83 ±0.04 <sup>d</sup>	1.10 ±0.04 <sup>ab</sup>	0.65 ±0.01 <sup>ab</sup>	3.35 ±0.87 <sup>a</sup>
	2	2.17 ±0.18 <sup>b</sup>	0.92 ±0.02 <sup>b</sup>	0.59 ±0.07 <sup>bc</sup>	2.35 ±0.04 <sup>ab</sup>
	4	3.23 ±0.18 <sup>a</sup>	0.85 ±0.01 <sup>b</sup>	0.64 ±0.07 <sup>ab</sup>	2.72 ±0.25 <sup>ab</sup>

P<0.05

Tablo 1 incelendiğinde, her iki çeltik çeşitinde de artan As dozlarına paralel olarak bitkilerin As konsantrasyonlarının da arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte en yüksek As konsantrasyonunun Cameo çeltik çeşitinde 4 mg/kg As uygulamasında olduğu belirlenmiştir (3.23 mg/kg As). En yüksek N konsantrasyonu da %1.47 N ile Gala çeşitinde 1 mg/kg As uygulamasında belirlenmiştir. Gala çeşitinde kontrol uygulamasına göre (%1.30 N) sadece 1 mg/kg As uygulamasında N konsantrasyonunun arttığı, diğer iki dozda da kontrole oranla azaldığı saptanmıştır. Cameo çeşitinde ise kontrole oranla bütün As dozlarında N konsantrasyonu azalmıştır. Araştırmada %0.78 P ile en yüksek P konsantrasyonu Gala çeşitinde 4 mg/kg As uygulamasında iken, en düşük P konsantrasyonu yine Gala çeşitinde 1 mg/kg As uygulamasında saptanmıştır. Genel olarak her iki çeşitte de P konsantrasyonu kontrole oranla azalmıştır. Öztürk ve ark., (2017) bazı bitkilerin arseniğe daha fazla toleransa sahip olmalarını, arseniğin bitki köküne fosfat taşıyıcılarla girmesi ile fosfor alımındaki değişimin sebep olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Madeira ve ark., (2012) bitkideki arseniğin fosfor ile yer değiştirtirdiğini, ancak enerji transferinde yer alamadığından bitki, fosfor noksanlığındaki davranışı

göstermediğini, As alımı arttıkça, bitki fosfor alımının da arttığını belirtmişlerdir. Gerekli fosfor karşılandığında ise taşınım daha düşük düzenlenmekte ve As alımı bloke edilmektedir. Araştırmada, K konsantrasyonları incelendiğinde, %3.35 K ile en yüksek Cameo çeşitinde 1 mg/kg As uygulamasında belirlenmiştir (Tablo 1). Gala çeşitinde 1 mg/kg As ve 2 mg/kg As dozları kontrole göre artmışken (sırasıyla %3.01 K, %3.05 K), Cameo çeşitinde ise sadece 1 mg/kg As dozu kontrole göre artmıştır (%3.35 K).

**Tablo 2.** As Uygulamalarının Çeltik Bitkisinin Fe, Zn, Mn ve Cu Konsantrasyonlarına Etkisi

Çeltik Çeşiti	As Dozları (mg/kg)	Fe	Zn (mg/kg)	Mn	Cu
Gala	0	122.0 ±19.6 <sup>b</sup>	18.7 ±6.90 <sup>ab</sup>	137.5 ±6.5 <sup>a</sup>	8.1 ±0.20 <sup>ab</sup>
	1	140.4 ±21.9 <sup>ab</sup>	17.2 ±1.45 <sup>ab</sup>	112.4 ±6.7 <sup>a-c</sup>	9.3 ±0.04 <sup>a</sup>
	2	150.2 ±12.7 <sup>ab</sup>	16.4 ±0.85 <sup>ab</sup>	107.3 ±33.5 <sup>a-c</sup>	8.2 ±0.85 <sup>ab</sup>
	4	165.3 ±3.8 <sup>ab</sup>	24.4 ±0.45 <sup>a</sup>	105.4 ±13.5 <sup>a-c</sup>	7.6 ±0.36 <sup>b</sup>
Cameo	0	184.8 ±11.1 <sup>a</sup>	10.2 ±4.10 <sup>b</sup>	124.0 ±6.6 <sup>b</sup>	5.5 ±0.37 <sup>c</sup>
	1	177.5 ±25.1 <sup>a</sup>	16.7 ±0.95 <sup>ab</sup>	115.4 ±19.9 <sup>ab</sup>	8.2 ±0.67 <sup>ab</sup>
	2	137.5 ±21.3 <sup>ab</sup>	15.3 ±5.10 <sup>ab</sup>	73.1 ±3.3 <sup>bc</sup>	7.4 ±0.50 <sup>b</sup>
	4	192.2 ±28.8 <sup>a</sup>	13.8 ±3.90 <sup>b</sup>	71.9 ±1.8 <sup>c</sup>	5.1 ±0.85 <sup>c</sup>

P<0.05

Farklı As dozlarının çeltik bitkisinin mikroelement konsantrasyonuna etkileri incelendiğinde, 192.2 mg/kg Fe ile en yüksek Cameo çeşitinde 4 mg/kg As uygulamasında belirlenmiştir (Tablo 2). Bu uygulamayı ise yine aynı çeşitte istatistiki olarak aynı gruba giren 0 mg/kg ve 1 mg/kg As uygulaması takip etmiştir (sırasıyla 184.8 mg/kg Fe ve 177.5 mg/kg Fe). Bununla birlikte, sadece Gala çeşitinde tüm As dozları kontrole oranla bitkinin Fe konsantrasyonunu arttırmıştır. Zn konsantrasyonunda ise Gala çeşitinde 4 mg/kg As uygulamasında en yüksek bulunmuştur (24.4 mg/kg Zn). Çeltik bitkisinin Zn konsantrasyonu Cameo çeşitinde tüm As dozlarında kontrole göre daha yüksek olurken, Gala çeşitinde sadece 4 mg/kg As uygulamasında kontrole oranla yüksek bulunmuştur. Mn konsantrasyonları incelendiğinde, her iki çeltik çeşitinde de artan dozlara bağlı olarak Mn konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Gala ve Cameo çeşitlerinde en yüksek Mn konsantrasyonları kontrol uygulamasında sırasıyla 137.5 mg/kg Mn ve 124.0 mg/kg Mn olarak belirlenmiştir. Cu konsantrasyonu ise her iki çeşitte 1 mg/kg ve 2 mg/kg As uygulamasında kontrole oranla yüksek bulunmuşken, 4 mg/kg As uygulamasında her iki çeşitte de kontrolden daha az Cu konsantrasyonu belirlenmiştir. Reed ve ark., (2015) kökteki Fe konsantrasyonunun gövde Fe konsantrasyonundan daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir ve bu durumu As'nin Fe'i kökten gövdeye taşınmasında engellemesine bağlamışlardır. Ayrıca, en düşük seviyede As'ye maruz kalındığında, bitki dokularında Cu derişimin büyük oranda azaldığını bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Farklı dozlarda As uygulamalarının çeltik bitkisinin verimine ve besin elementleri alımına etkilerinin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada, Gala ve Cameo olmak üzere 2 farklı çeltik çeşiti kullanılmıştır. Sonuçlar bir bütün olarak değerlendirildiğinde, kuru madde üretimi Gala çeşitinde 2 mg/kg As uygulamasına kadar artmış, bu dozdan sonra azalmaya başlamıştır. Cameo çeltik çeşitinde ise tüm As dozları kuru madde verimini azaltmıştır. Araştırma sonuçları, çeltik çeşitlerinin As'e dayanıklılıklarının farklı olabileceği kanaatini ortaya çıkarmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abedin MJ, Cresser MS, Meharg AA, Feldmann J, Cotter-Howells J 2002. "Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.)". *Environmental Science and Technology*, 36(5), 962-968, 2002
- Anita S, Rajesh KS, Madhoolika A, Fiona MM 2010. "Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India". *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 611-619.
- Aslan S, Ozturk M, Demirbas A, Karakoy T 2018. Evaluation of Alfalfa Plants Growth Irrigated with Arsenic Contaminated Water. *European Scientific Journal*, Special edition, 129-141.
- Bremner JM 1965. Total nitrogen. *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. 1149-1178.



- Castillo-Michel H 2007. Use of X-Ray absorbsiyon spectroscopy and biochemical tecniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (*Pisum sativum*) plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: p. 457-463.
- Christophersen HM 2009. Arbuscular mycorrhizal colonization reduces arsenate uptake in barley via downregulation of transporters in the direct epidermal phosphate uptake pathway. *New Phytologist*, 184: 962–974.
- Dahal BM, Fuerhacker M, Mentler A, Karki KB, Shrestha RR, Blum WEH 2008. Arsenic contamination of soils and agricultural plants through irrigation water in Nepal. *Environmental pollution*, 155(1), 157–163.
- Gulz PA, Gupta SK, Schulin R 2005. “Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils, *Plant and Soil*”. 272(1), 337-347.
- Madeira AC, Varennes A, Abreu MM, Esteves C, Magalhães MCF 2012. “Tomato and parsley growth, arsenic uptake and translocation in a contaminated amended soil”. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 114-121.
- Mayorga P, Moyano A, Anawar HM, García-Sánchez A 2013. Temporal variation of arsenic and nitrate content in groundwater of the Duero River Basin (Spain). *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 58, 22–27.
- Murphy J, Riley JP 1962. A modified single solution for the determination of phos-phate in natural waters. *Analtica Chemica Acta*, 27, 31-36.
- Öztürk M, Aslan Ş, Demirbaş A 2017. Sulama sularındaki arseniğin bitkilerde birikimi. *Pamukkale Univ, Muh Bilim Derg*, 23 (3): 288-296.
- Reed ST, Ayala-Silva T, Dunn CB, Gordon GG 2015. Effects of arsenic on nutrient accumulation and distribution in selected ornamental plants. *Agricultural Sciences*, 6(12), 1513.
- Stresty TVS, Madhava Rao KV 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea, *Environ Exp Bot.*, 41, 3-13.
- Tagem, 2018. Tarım Ürünleri Piyasaları, Çeltik. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, No: 05.
- Williams PN, Price AH, Raab A, Hossain SA, Feldmann J, Meharg AA. 2005. “Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure”. *Environmental Science and Technology*, 39(15), 5531-5540.

## Domates bitkisinde farklı organik materyal ve mineral madde uygulanması

Handan Saraç<sup>1\*</sup>, Hasan Durukan<sup>1</sup>, Ahmet Demirbaş<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Sivas, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: [handansarac@cumhuriyet.edu.tr](mailto:handansarac@cumhuriyet.edu.tr)

### Özet

Bu çalışma, farklı organik ve mineral maddelerin (hayvan gübresi, leonardit, dolomit) domates bitkisinin verim ve besin alınımına etkilerini belirlemek için bir saksı denemesi olarak yapılmıştır. Çalışmada organik materyal ve mineral madde uygulamaları, kimyasal gübre ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Bitkisel ve Hayvansal Üretim bölümünde sera koşullarında üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Dolomit ve leonardit dozları, 2000 kg ha<sup>-1</sup>e eşdeğer olacak şekilde toprağa katılmıştır. Toprağa, 20000 kg ha<sup>-1</sup> hayvan gübresi dozu katılmıştır. Çalışmada, H-2274 domates çeşiti kullanılmış ve her bir saksıya bir fide ekilmiştir. Domates bitkisi ekimden yaklaşık 45 gün sonra hasat edilmiş ve kuru madde üretimi, makro ve mikro element konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; yeşil aksam kuru madde üretimi kontrole kıyasla leonardit ve dolomit uygulamalarında artmıştır. Ayrıca, organik materyal ve mineral maddeler uygulanması domates bitkisinin makro ve mikro element konsantrasyonlarını arttırmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Organik, kimyasal gübre, mineral madde, domates, verim.

### The application of different organic material and mineral matter in tomato plant

#### Abstract

This study was carried out as a pot experiment to determine the effects of different organic and mineral matters (animal manure, leonardite, dolomite) on yield and nutrient uptake of tomato plant. In the study, organic applications was performed comparatively with chemical fertilizer. This study was carried out under greenhouse conditions in University of Sivas Cumhuriyet, Department of Crop and Animal Production with three replications. The doses of dolomite and leonardite were equivalent to 2000 kg ha<sup>-1</sup> incorporated to soil. The dose of animal manure were equivalent to 20000 kg ha<sup>-1</sup> incorporated to soil. In the study, H-2274 tomato species was used and one seedling was sowed each pot. The tomato plant was harvest nearly 45 days after sowing and shoot dry matter production, macro and micro elements concentrations was determined. According to the results, shoot dry matter production increased with leonardite and dolomite applications when compared with the control. In addition, the application of organic material and mineral matters increased macro and micro element concentrations of tomato plant.

**Keywords:** Organic, chemical fertilizer, mineral matter, tomato, yield.

### GİRİŞ

Dünya nüfusun sürekli olarak artış göstermesi ve tarım alanlarını genişletme imkanlarının sınırlı olması, birim alandan daha fazla ürün elde edilmesi ihtiyacını doğurmuştur (Midmore, 1993). Tarımsal üretimde yeni tekniklerin geliştirilmesine rağmen, tarımın temeli toprağa dayanmaktadır (Şeker ve Ersoy, 2005) ve bitkinin bulunduğu toprakta iyi bir gelişim sağlayabilmesi, yetiştiği toprak ortamının fiziksel ve kimyasal özellikleri ile ilişkilidir (Alagöz ve ark., 2006). Organik maddelerin toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini olumlu yönde etkilediği bilinmekte ve bu nedenle toprağa organik kökenli materyaller ilave edilmektedir (Bender ve ark, 1998; Shirani ve ark., 2002; Şeker ve Ersoy, 2005). Alagöz ve ark. (2006), yapmış oldukları bir çalışmada organik materyallerin düzenli ve etkin bir biçimde kullanılması ile toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyileştirilebilmesinin mümkün olduğunu belirlemişlerdir. Topraktaki organik maddeyi yüksek düzeyde tutmaya çalışmak pratik olmamakla birlikte, oldukça maliyetlidir. Bu nedenle, organik gübre kullanımı toprağın verimliliğinin artırılmasında ve sürdürülebilirliğinde önemli rol oynamaktadır (Şeker ve Ersoy, 2005). Ancak, bitkisel üretimde verimi artırmak amacıyla bilinçsiz ve dengesiz uygulanan kimyasal gübreler üretim maliyetini artırırken, aynı zamanda yer altı ve yüzey sularına karışarak insan, bitki ve hayvan sağlığını da tehdit etmektedir (Demirtaş ve ark., 2012). Bu anlamda kimyasal gübrelerin yerine organik materyallerin kullanılması önem kazanmaktadır. Organik tarımda, kimyasal gübrelerin yerine organik gübrelerin kullanımına izin verilmektedir (Gül ve ark., 2000; Ünlü ve Padem, 2010). Bu nedenle, birçok ülkede bitkisel ve hayvansal üretimde organik tarım uygulamalarında önemli artışlar söz konusudur (Zengin, 2007;

Ünlü ve Padem, 2010). Dünyanın farklı yerlerinde yapılan araştırmalar, organik gübrelerin toprak özelliklerini iyileştirdiği, ürünlerin verimini attırdığını göstermiştir (Şeker ve Ersoy, 2005).

Hayvan gübresi, içerdiği makro ve mikro besin elementleri sayesinde hem toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştiren hem de bitki gelişimini teşvik eden organik materyaller arasında yer almaktadır (Synman ve ark., 1998; Çayır ve ark., 2012). Hayvan gübrelerindeki bitkiye yararlı besin elementlerinin miktarı; yem rasyonunun içeriğine, yataklık ve su miktarına, gübreyi toplama ve depolama metoduna, araziye uygulama metoduna ve toprak, bitki, iklim özelliklerine göre değişmektedir (Erkan, 2005).

Leonardit, linyit yatakları civarında bulunan ve linyitin hava atmosferinde yüksek oranda oksidasyona uğramasıyla oluşmuş organik bir maddedir. Leonarditi linyitten ayıran en önemli fark, oksijen yüzdesinin fazla olması ve yakıt olarak kullanılamamasıdır (Engin ve Cöcen, 2012). Diğer taraftan, leonardit, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik aktivitesini artıran ve yüksek oranda hümik ve fulvik asit içeren, toprağa uygulandığında ise toprakta alınmaz halde bulunan bitki besin elementlerinin bitkiler tarafından alınabilir hale geçmesini sağlayan organik bir materyaldir (Pekcan ve ark., 2018). Hümik asit, besin maddelerini etkileyerek toprak verimliliğini artırır ve bu nedenle bitkiler üzerinde olumlu etkileri vardır (Trevisan ve ark., 2010).

Dolomit, kireçtaşında ( $\text{CaCO}_3$ ) Ca ile beraber Mg' un yer alması ile oluşan bir mineraldir. Dolomit, başta demir-çelik sanayi olmak üzere cam, seramik, boya, gübre, tuğla, çimento ve inşaat sanayilerinde, tarımda toprak ıslahı gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır (Özdemir, 2016).

Çalışma materyali olarak seçilen Domates (*Solanum lycopersicum* L.), patlıcangiller (Solanaceae) familyasından olup, anavatanı Güney ve Orta Amerika olan bir yıllık bir bitki türüdür (Mamay ve Yanık, 2012). Domatesin bugünkü beslenme programlarında önemli bir yeri vardır. Çünkü, B-karoten, likopen, flavonoidler ve askorbik asit gibi önemli besin öğelerinden zengin bir kaynaktır ve bu onu etkili bir antioksidatif ve antikanserojen besin maddesi haline getirir. 100 gramlık domates 0.55 mg B6 vitamini, 1700 IU A vitamini, 0.10 mg Vitamin B1 ve 21 mg C vitamini içerir (Sevgican, 1981).

Bu araştırmada hayvan gübresi, leonardit ve dolomit gibi materyallerin domates bitkisinin verim ve besin elementleri alınmasına olan etkilerinin belirlenmesi ve kimyasal gübre ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sivas Meslek Yüksek Okulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü seralarında 3 tekrarlı olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre, 3 kg kapasiteli plastik saksılarda yürütülmüştür. Araştırmada, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü araştırma deneme alanından 0-20 cm derinlikten alınan toprak kullanılmış ve her saksıya 4 mm'lik eleklerden geçirildikten sonra konulmuştur. Araştırmada kullanılan toprak; hafif alkalın (pH 7.29), kireçli (%13.2), organik madde (%1.41), yararlı P ( $3.48 \text{ kg da}^{-1}$ ) ve Zn ( $0.38 \text{ mg kg}^{-1}$ ) içeriği düşük, K ( $81.9 \text{ kg da}^{-1}$ ), Fe ( $3.41 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Mn ( $2.09 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ve Cu ( $1.16 \text{ mg kg}^{-1}$ ) içeriği ise yeterlidir.

Araştırmada, kontrol, kimyasal gübre, hayvan gübresi, leonardit ve dolomit olmak üzere 5 uygulama yapılmıştır. Kimyasal gübreleme;  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  N ( $\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  formunda),  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  P ve  $125 \text{ mg kg}^{-1}$  K ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  formunda),  $2.5 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  formunda) ve  $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$  Fe (%6 Ferrosdyn) olarak, hayvan gübresi  $2000 \text{ kg/da}$ ; leonardit ve dolomit ise  $200 \text{ kg/da}$  olacak şekilde uygulanmıştır. Kontrol grubunda herhangi bir gübre eklemesi yapılmamıştır. Çalışmada kullanılan materyallerin (hayvan gübresi, leonardit ve dolomit) bazı özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Araştırmada, H-2274 domates çeşiti kullanılmış olup, torf-perlit karışımında fide olarak yetiştirildikten sonra her saksıya 1'er adet domates bitkisi dikilmiştir. Dikimden yaklaşık 45 gün sonra, çiçeklenme başlangıcında hasat edilmiştir. Hasat sonrasında domates bitkisinin kök üstü aksamı 48 saat boyunca  $70^\circ\text{C}$ 'de kurutulmuş ve sabit ağırlığa geldikten sonra kuru madde üretimi için ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra agat değirmende öğütülen örneklerden  $0.200 \text{ g}$  alınıp  $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{HNO}_3$  asit karışımı ile yaş yakmaya tabi tutulmuştur. P kolorimetrik olarak  $882 \text{ nm}$ 'de spektrofotometrede (Murphy ve Riley, 1962)'e göre, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn ve Cu konsantrasyonları Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (Shimadzu AA-7000) ile belirlenmiştir. N konsantrasyonları ise Kjeldahl destilasyon yöntemine göre (Bremner, 1965) belirlenmiştir.

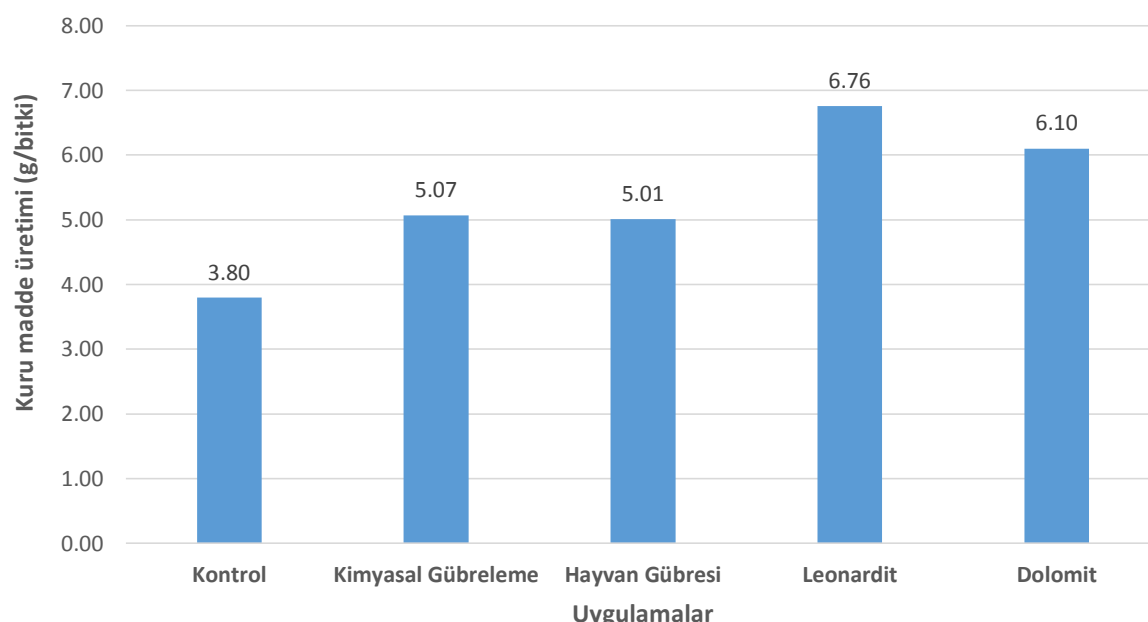
Verilerin istatistik analizinde SPSS 22.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, United States) programı kullanılmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılıklar  $p < 0.05$  olacak şekilde Tukey testi ile belirlenmiştir.

**Tablo 1.** Araştırma materyallerinin bazı özellikleri

Özellikler	Hayvan gübresi	Leonardit	Dolomit
Organik madde (%)	23.8	69.4	
Tuz (mmhos/cm)	2.81	1.35	
Nem (%)	11.7	22.1	
Toplam N (%)	1.48	0.89	
Toplam P (%)	0.57	0.13	
Toplam K (%)	0.48	0.13	
CaO (%)			28.8
MgO (%)			22.4

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin kuru madde üretimine olan etkisi belirlenmiş ve Şekil 1’de verilmiştir.



**Şekil 1.** Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin kuru madde üretimine etkileri (g/bitki)

Araştırma bulguları domates bitkisinin yeşil aksam kuru madde üretimi bakımından değerlendirildiğinde, en yüksek kuru madde üretiminin 6.76 g/bitki ile leonardit uygulamasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Kuru madde üretimi yönünden leonardit uygulamasını 6.10 g/bitki ile dolomit uygulaması takip etmiştir. Araştırmada, tüm uygulamalarda kuru madde üretimi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli artışların olduğu tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarımıza benzer şekilde hayvan gübresi, kimyasal gübre, leonardit ve dolomit uygulamalarının bitkilerin kuru madde üretimini arttırdığını başka araştırmacılar da ifade etmektedirler. Alagöz ve ark. (2006) organik materyal ilavesinin toprağın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada, ahır gübresinin ve leonardit uygulamasının kuru madde üretimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Öktüren ve ark., (2011) yapmış oldukları çalışmada hıyar bitkisinin kimyasal gübre uygulamasında kuru madde miktarının arttığını belirlemişlerdir. Suksri (1998), soya fasulyesi (*Glycinemax* L.) bitkisinde dolomitin büyüme ve tohum verimi üzerine etkisi üzerine yapmış olduğu çalışmada, dolomit uygulamalarının bitkinin kuru madde miktarını arttırdığını tespit etmiştir.

Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) konsantrasyonlarına etkileri Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin N, P ve K konsantrasyonlarına etkileri (%)

Uygulamalar	N, P ve K konsantrasyonları (%)		
	N	P (%)	K
Kontrol	2.12 ±0.02 <sup>d</sup>	0.14 ±0.04 <sup>c</sup>	3.07 ±0.05 <sup>b</sup>
Kimyasal Gübre	3.79 ±0.07 <sup>a</sup>	0.37 ±0.03 <sup>a</sup>	3.54 ±0.37 <sup>a</sup>
Hayvan Gübresi	2.47 ±0.08 <sup>b</sup>	0.23 ±0.01 <sup>b</sup>	3.32 ±0.28 <sup>ab</sup>
Leonardit	2.30 ±0.09 <sup>c</sup>	0.37 ±0.06 <sup>a</sup>	3.67 ±0.12 <sup>a</sup>
Dolomit	2.32 ±0.06 <sup>c</sup>	0.19 ±0.00 <sup>bc</sup>	3.34 ±0.06 <sup>ab</sup>

P<0.05

Araştırma bulguları domates bitkisinin N konsantrasyonu yönünden incelendiğinde, en yüksek N konsantrasyonunun %3.79 N ile kimyasal gübre uygulamasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Kimyasal gübre uygulamasını % 2.47 N ile hayvan gübresi uygulaması takip etmiştir. Bütün uygulama grupları ve kontrol arasındaki farklılıklar N konsantrasyonu bakımından anlamlı bulunmuştur (P<0.05). P ve K konsantrasyonlarında ise, kimyasal gübre (%0.37 P ve %3.54 K) ile birlikte leonardit uygulaması (%0.37 P ve %3.67 K) öne çıkmıştır. Araştırmada P ve K konsantrasyonları N konsantrasyonunda olduğu gibi bütün uygulama guruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Alagöz ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada, sera koşullarında saksılara tavuk gübresi, çöp kompostu ve leonardit dozlarını uygulamışlar ve bu uygulamaların tamamının N konsantrasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Özkan ve ark. (2013) örtüaltı biber yetiştiriciliğinde organik ve kimyasal gübre uygulamışlar ve N, P ve K konsantrasyonlarının kimyasal gübre uygulaması ile arttığını tespit etmişlerdir.

Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) konsantrasyonlarına etkileri Tablo 3’de verilmiştir.

**Tablo 3.** Organik ve mineral madde domates bitkisinin Ca ve Mg konsantrasyonlarına etkileri (%)

Uygulamalar	Ca ve Mg konsantrasyonları (%)	
	Ca	Mg
Kontrol	1.22 ±0.12 <sup>d</sup>	0.69 ±0.08 <sup>c</sup>
Kimyasal Gübre	3.60 ±0.15 <sup>a</sup>	0.90 ±0.05 <sup>a</sup>
Hayvan Gübresi	1.36 ±0.23 <sup>cd</sup>	0.83 ±0.04 <sup>ab</sup>
Leonardit	1.64 ±0.23 <sup>bc</sup>	0.79 ±0.01 <sup>b</sup>
Dolomit	1.92 ±0.05 <sup>b</sup>	0.78 ±0.01 <sup>bc</sup>

P<0.05

En yüksek Ca ve Mg konsantrasyonu %3.60 Ca ve %0.90 Mg ile kimyasal gübre uygulamasında belirlenmiştir (Tablo 3). Domates bitkisinde, Ca ve Mg konsantrasyonları bakımından bütün uygulama grupları kontrole göre önemli bulunmuştur (P<0.05). Karabulut ve Bellitürk (2013) mısır bitkisinde üç farklı tekstüre sahip olan asitli topraklara farklı dozlarda magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>) ve dolomit (CaCO<sub>3</sub>.MgCO<sub>3</sub>) uygulamışlar ve kumlu topraklarda dolomit uygulamalarının bitkide, %K, %Ca ve %Mg içeriklerini arttırdığını bildirmişlerdir. Edmeades (2003) yapmış olduğu çalışmada, ahır gübresi, sıvı ve yeşil gübre ile inorganik gübrelerin uzun yıllar boyunca etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, ahır gübresi uygulanmış topraklarda inorganik gübre uygulanmışlara oranla daha fazla organik madde birikiminin olduğunu ve toprakların N, P, K, Ca ve Mg bakımından zenginleştiğini tespit etmiştir.

Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin demir (Fe), çinko (Zn), mangan (Mn) ve bakır (Cu) konsantrasyonlarına etkileri Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Organik ve mineral madde uygulamalarının domates bitkisinin Fe, Zn, Mn ve Cu konsantrasyonlarına etkileri (mg kg<sup>-1</sup>)

Uygulamalar	Fe	Zn	Mn (mg/kg)	Cu
Kontrol	169.1 ±24.21 <sup>b</sup>	11.4 ±1.06 <sup>d</sup>	18.8 ±4.24 <sup>c</sup>	14.9 ±2.76 <sup>c</sup>
Kimyasal Gübre	322.0 ±53.03 <sup>a</sup>	14.1 ±0.92 <sup>bc</sup>	30.4 ±0.71 <sup>b</sup>	18.8 ±3.18 <sup>ac</sup>
Hayvan Gübresi	186.5 ±18.74 <sup>b</sup>	12.4 ±1.34 <sup>cd</sup>	23.0 ±7.21 <sup>c</sup>	16.7 ±1.84 <sup>bc</sup>
Leonardit	190.1 ±39.81 <sup>b</sup>	19.7 ±1.48 <sup>a</sup>	34.1 ±0.42 <sup>ab</sup>	24.5 ±1.70 <sup>a</sup>
Dolomit	281.9 ±51.27 <sup>a</sup>	16.1 ±0.49 <sup>b</sup>	37.9 ±1.41 <sup>a</sup>	21.6 ±5.66 <sup>ab</sup>

P<0.05

Domates bitkisinin mikro element konsantrasyonları bakımından Tablo 4 incelendiğinde, uygulama gruplarında Fe konsantrasyonunun 169.1 mg/kg Fe ve 322.0 mg/kg Fe arasında değiştiği ve en yüksek Fe konsantrasyonunun kimyasal gübre (322.0 mg/kg Fe) uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Zn ve Cu konsantrasyonunda leonardit uygulaması (19.7 mg/kg Zn; 24.5 mg/kg Cu) öne çıkarken, Mn konsantrasyonunda ise dolomit uygulaması (37.9 mg/kg) öne çıkmıştır. Araştırmada kontrole oranla bütün uygulamaların domates bitkisinin mikro element konsantrasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Nazlı ve ark. (2016) üç organik materyalin (tavuk gübresi, büyükbaş gübresi, leonardit) silajlık mısırın verimi ve besin elementleri alımına etkilerini belirlemek amacıyla silajlık mısırdaki yaptıkları çalışmada, silajlık mısır yetiştiriciliğinde organik materyallerin inorganik gübre ile birlikte kullanılmasının, sürdürülebilir yem üretimi için oldukça faydalı olduğunu belirtmişlerdir.

## SONUÇ

Araştırmada, bütün uygulamaların kontrole kıyasla domates bitkisinin yeşil aksam kuru madde üretimini arttırdığı, en yüksek kuru madde üretiminin leonardit uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Makro element konsantrasyonunda özellikle kimyasal gübre uygulaması öne çıkarken, P ve K konsantrasyonlarında leonardit uygulaması da benzer etki göstermiştir. Mikro element konsantrasyonunda ise, özellikle leonardit ve dolomit uygulamasının öne çıktığı belirlenmiştir. Araştırma bulguları, domates bitkisinde kimyasal gübreye alternatif olarak organik materyal ve mineral maddelerin de kullanılabileceğini göstermiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda, bu tür organik materyal ve mineral maddelerin oksidasyon süresine bağlı olarak etkinliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yapılmasının fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Alagöz Z, Yılmaz E, Öktüren F 2006. Organik material ilavesinin bazı fiziksel ve kimyasal toprak özellikleri üzerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(2): 245-254.
- Bender D, Erdal İ, Dengiz O, Gürbüz M, Tarakçıoğlu C 1998. Farklı organik materyallerin killi bir toprağın bazı fiziksel özellikleri üzerine etkileri. International Symposium On Arid Region Soil. International Agrohydrology Research And Training Center, Menemen, İzmir, pp. 506-510.
- Bremner JM 1965. Method of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Methods. American Society of Agronomy Inc. Madison, Wise S-1149-1178, USA.
- Çayır M Atılğan A Öz H 2012. Büyükbaş hayvan barınaklarındaki gübrelikler ve su kaynaklarına olan durumlarının incelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 7(2): 1-9.
- Demirtaş EI, Asri ÖF, Özkan CF, Arı N 2012. Organik ve kimyasal gübre uygulamalarının örtü altı domates yetiştiriciliğinde toprak verimliliği ve bitkinin beslenmesine etkileri. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi, 29(1): 9-22.
- Edmeades DC 2003. The long-term effects of manures and fertilisers on soil productivity and quality: a review. Nut. Cycl. Agroecosys, 66: 165-180.
- Engin VT, Cöcen Eİ 2012. Leonardit ve humik maddeler. MT Bilimsel, 2: 13-20.
- Erkan M 2005. Mersin yöresindeki büyükbaş hayvancılık tesislerinin mevcut durumu ve bu tesislerde ortaya çıkan atıkların yarattığı çevre kirliliği üzerinde bir araştırma. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi), 108 pp, Adana.

- Gül A, Tuncay Ö, Tüzel Y, Okur B, Tüzel İH, Gümüş M, Madanlar N, Onoğur E, Örümlü EA, Türküsay H, Yoldaş Z, Engindeniz S 2000. Serada organik domates yetiştiriciliği. Tüzel Y, Onoğur E (eds), TÜBİTAK Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yayınları, İzmir.
- Karabulut Ö, Bellitürk K 2013. Farklı magnezyum kaynaklarının'asit topraklarda yetiştirilen mısır bitkisinin potasyum-kalsiyum-magnezyum içeriğine etkisi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(2): 83-91.
- Mamay M, Yanık E 2012. Şanlıurfa'da domates alanlarında Domates güvesi [*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)]'nin ergin popülasyon gelişimi. Türk. Entomol. Bült., 2(3): 189-198.
- Midmore DJ 1993. Agronomic modification of resource use and intercrop productivity. Field Crops Research, 34: 357-380.
- Murphy J, Riley JP 1962. A modified single solution for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, 27: 31-36.
- Nazlı RI, Inal I, Kusvuran A, Demirbas A, Tansi V 2016. Farklı Organik Materyallerin Silajlık Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinin Yem Verimi ve Besin Elementleri Alımı Üzerine Etkileri. Journal of Plant Nutrition, 39(7): 912-921.
- Öktüren Asri F, Demirtaş EI, Özkan CF, Arı N 2011. Organik ve kimyasal gübre uygulamalarının hıyar bitkisinin verim, kalite ve mineral içeriklerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 24(2): 139-143.
- Özdemir F 2016. Yüksek yoğunluklu lif levhanın bazı özellikleri üzerine dolomit mineralinin etkisinin araştırılması. KSU Mühendislik Bilimleri Dergisi, 19(2): 93-98.
- Özkan CF, Öktüren Asri F, Demirtaş EI, Arı N 2013. Örtüaltı biber yetiştiriciliğinde organik ve kimyasal gübre uygulamalarının bitkinin beslenme durumu ve bitki gelişimi üzerine etkileri. Toprak Su Dergisi, 2(2): 96-101.
- Pekcan T, Esetlili ÇB, Turan HS, Aydoğdu E 2018. Leonardit kökenli organik materyallerin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 32: 31-41.
- Sevgican A 1981. Sebzelelerin bileşimleri ile insan beslenmesi ve sağlığındaki yeri ve kış boyunca taze olarak saklanmaları. Ege Üniversitesi Matbaası Yayın No: 419, İzmir, Turkey.
- Shirani H, Hajabbasi MA, Afyuni M, Hemmat A 2002. Effects of farmyard manure and tillage systems on soil physical properties and corn yield in central Iran. Soil and Tillage Research, 68: 101-108.
- Snyman HG, Jong DE, Aveling T 1998. The stabilization of sewage sludge applied to agricultural land and the effects on maizeseedlings. Water Sci. Technol., 38(2): 87-95.
- Suksri A 1998. Effects of dolomite on growth and seed yields of Soybeans (*Glycinemax* L.) grown on oxic paleustult soil in northeast Thailand. Pakistan Journal of Biological Sciences, 1(3): 215-218.
- Şeker C, Ersoy İ 2005. Değişik organik gübreler ve leonarditin toprak özellikleri ve mısır bitkisinin (*Zea mays* L.) gelişimi üzerine etkileri. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(35): 46-50.
- Trevisan S, Francioso O, Quaggiotti S, Nardi S 2010. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: From environmental aspects to molecular factors. Plant Signaling&Behavior, 5(6): 635-643.
- Ünlü H, Padem H 2010. Organik domates yetiştiriciliğinde çiftlik gübresi, mikrobiyal gübre ve bitki aktivatörü kullanımının yaprakların makro element içeriği üzerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(2): 63-73.
- Zengin M 2007. Organik Tarım. Hasad Yayıncılık LTD. ŞTİ., İstanbul.

## Elektrokoagülasyon prosesi ile mezbaha atıksularından fosfat ve azot bileşiklerinin giderimi

Mehtap Tanyol<sup>1\*</sup>, Servet Tevkur<sup>1</sup>

\*Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: mtanyol@munzur.edu.tr

### Özet

Mevcut çalışmada, demir elektrotların kullanıldığı elektrokoagülasyon prosesi mezbaha atıksularının arıtımı için kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan atıksu Tunceli'de (Türkiye) bulunan yerel bir mezbahadan temin edilmiştir. Elektrokoagülasyon prosesinin performansı mezbaha atıksularından fosfat, amonyak, nitrit ve nitrat giderimi için araştırılmıştır. Elektrokoagülasyon işleminden sonra atıksudaki fosfat, amonyak, nitrit ve nitrat giderim verimleri sırasıyla %96, %63, %80 ve %70 olmuştur. Sonuçlar, elektrokoagülasyonun mezbaha atıksularında bulunan fosfat, amonyak, nitrit ve nitratın giderilmesinde etkin bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrokoagülasyon, mezbaha atıksuları, fosfat, amonyak, nitrit, nitrat.

### Removal of phosphate and nitrogen compounds from slaughterhouse wastewaters by electrocoagulation process

#### Abstract

In present study, electrocoagulation process employing iron electrode was applied for treatment of slaughterhouse wastewater. Wastewater used in this study was supplied from a slaughterhouse located in the city of Tunceli (Turkey). The performance of electrocoagulation for the removal of phosphate, ammonia, nitrite and nitrate from slaughterhouse wastewaters has been investigated. After electrocoagulation, the concentration of the phosphate, ammonia, nitrite and nitrate in wastewaters decreased 96%, 63%, 80% and 70% respectively. Results indicated that electrocoagulation can be used as an efficient technique for removal of the phosphate, ammonia, nitrite and nitrate exists in slaughterhouse wastewater.

**Keywords:** Electrocoagulation, slaughterhouse wastewater, phosphate, ammonia, nitrite, nitrate.

#### GİRİŞ

Hayvan kesim ve et işleme endüstrileri, çok yüksek miktarda organik madde içeren fazla miktarda atıksu üretir. Mezbaha atıksuları ayrıca çözülmüş organik bileşikleri (örneğin proteinler ve kan) ve yağ, gres, kıl, tüy, et, gübre, kum ve sindirilmemiş yemden oluşan toplam askıda katı maddeleri ve farklı türlerde kimyasal maddeleri içermektedir (Asselin ve ark., 2008).

Mezbaha atıksuları yüksek konsantrasyonlarda biyolojik olarak çözünebilir organik madde içerdiğinden biyolojik prosesler (aerobik veya anaerobik sistemler) bu atıkların arıtılması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyolojik işlemler etkili ve ekonomik olsa da, uzun hidrolik alıkonma süresi ve geniş alan gereksinimleri vardır. Aerobik arıtma prosesleri, fazla çamur üretimi ve havalandırma için gereken fazla enerji tüketimi nedeniyle kullanımı sınırlıdır. Ayrıca, mezbaha atıksuyunun anaerobik arıtılması sırasında reaktörde metanojenik aktivitede azalmaya neden olan askıda katı madde ve yüzen yağların birikmesi nedeniyle sistem sıklıkla yavaşlar veya bozulur (Cuetos ve ark., 2008).

Son yıllarda, çeşitli endüstriyel atıksuların arıtılması için işletme maliyetleri düşük olan yeni işlemler araştırılmıştır. Bu prosesler arasında elektrokoagülasyon teknolojisi özellikle mezbaha atıksuları gibi yüksek miktarda askıda katı madde içeren atıksuların arıtımı için bir alternatif oluşturmaktadır. Bu noktada, elektrokoagülasyon prosesi çok yönlülüğü ve çevresel uyumluluğu nedeniyle endüstriyel atıksuların arıtılmasında ilgi görmüştür (Budiyono ve ark., 2010). Az çamur oluşumu, minimum işletme dikkati ve işletme kolaylığı prosesin diğer avantajlarını oluşturmaktadır.

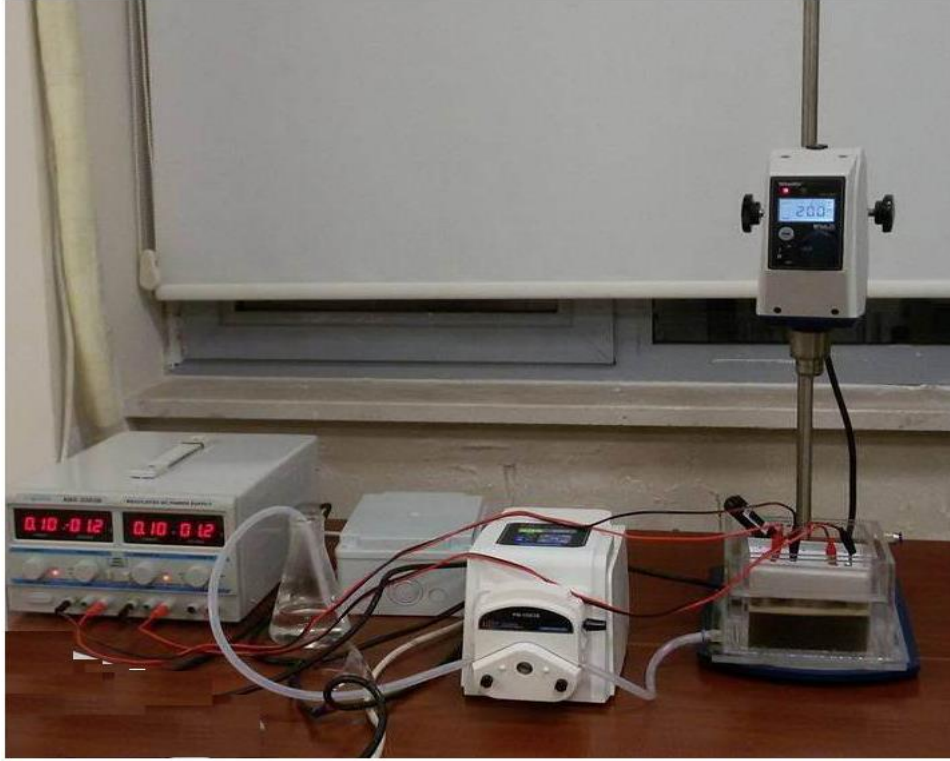
Elektrokoagülasyonun ana etkisi, su partiküllerinin redoks reaksiyonunda güçlü elektrik alanına cevap verebilme yeteneğine bağlıdır. Elektrokoagülasyon, üç ana mekanizmayı içermektedir. Bunlar, kurban anotların elektrolitik oksidasyonu ile koagülantların oluşumu, kirleticilerin destabilizasyonu, emülsiyonların kırılması ve stabilize edilmiş fazların bir flok formunda biraraya gelmesidir (İsa ve ark., 2014).



Bu çalışmada elektrokoagülasyon prosesi kullanılarak mezbaha atıksularından fosfat ve azot bileşiklerinin giderimi araştırılmıştır.

### Materyal ve Metot

Deneysel çalışmalarda kullanılan mezbaha atıksuyu Tunceli (Türkiye) ilinde bulunan bir mezbahadan (Dersim Et Mezbaha ve Karkas Et Üretim Tesisi) temin edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan deney düzeneği Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Elektrokoagülasyon düzeneği

Atıksuyun arıtımı için kullanılan laboratuvar ölçekli elektrokoagülasyon reaktörü 17 cm x 18 cm taban boyutlarına ve 11 cm yüksekliğe sahiptir. Kesikli deneyler oda sıcaklığında (25 °C) ve atıksuyun doğal pH’ında (7,47) gerçekleştirilmiştir. Anot ve katot olarak iki demir elektrot reaktöre yerleştirilmiştir ve 500 mL mezbaha atıksuyu reaktöre ilave edilmiştir. İki elektrot arasındaki mesafe 16 mm’de tutulmuştur. Akım yoğunluğu bir DC güç kaynağı kullanılarak 20 mA/m<sup>2</sup>’ye ayarlanmıştır. Proses süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Proses boyunca atıksu bir karıştırıcı ile sürekli olarak 200 rpm’de karıştırılmıştır. Elektrokoagülasyon işleminden sonra, numuneler çökeltme için 45 dakika karıştırılmadan bırakılmıştır. Analizden önce süpernatantlar 0,45 µm’lik bir membran filtreden süzölmüştür ve daha sonra fosfat, amonyak, nitrit ve nitrat parametreleri için analiz edilmiştir.

Analizler standart metotlara göre yapılmıştır ve kullanılan yöntemler fosfat için 4500-P C., amonyak için 4500-NH<sub>3</sub> F., nitrit için 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B. ve nitrat için 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> B.’dir (APHA, 2005). İncelenen parametrelerin giderim verimleri aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir.

$$\% \text{ Giderim verimi} = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Burada C<sub>i</sub> ve C<sub>f</sub> sırasıyla incelenen parametrenin başlangıç ve arıtmadan sonraki konsantrasyonudur (mg/L).

### Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada mezbaha atıksularının elektrokoagülasyon prosesi ile arıtımı gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 1’de verilmiştir. Tablo 1’den görüldüğü gibi fosfat, amonyak, nitrit ve nitrat için giderim verimleri sırasıyla %96, %63, %80 ve %70 olmuştur.

Elektrokoagülasyonla arıtmada akım yoğunluğu, pH, sıcaklık ve zaman gibi faktörler arıtım verimini önemli ölçüde etkilemektedir.

Bu parametreler arasında akım yoğunluğu, tüm elektrokimyasal işlemlerde, reaktör içindeki reaksiyon hızını kontrol etmek için en önemli parametredir. Akım yoğunluğu miktarının, koagülant üretim hızını belirlediği ve kabarcık üretiminin hızını ve boyutunu ayarladığı ve bu nedenle de flokların büyümesini etkilediği iyi bilinmektedir (Ün ve ark., 2008). Chen'e (2004) göre, çok büyük bir akım kullanıldığında, suyu ısıtmak için elektrik enerjisini boşa harcama olasılığı yüksektir. Ayrıca, çok büyük bir akım yoğunluğu, akım verimliliğinde önemli bir düşüşe yol açacaktır. Elektrokoagülasyon sisteminin bakım gerektirmeden uzun süre çalışabilmesi için, elektrot yüzeyinin periyodik olarak temizlenmesi için önlemler alınmadıkça, mevcut akım yoğunluğunun 20-25 A/m<sup>2</sup> olması önerilmektedir. Bu çalışmada akım yoğunluğu 20 mA/m<sup>2</sup> olarak alınmıştır.

**Tablo 1.** Elektrokoagülasyon prosesinin mezbaha atıksularını arıtım etkinliği (T:25 °C, pH:7,47, elektrotlar arası mesafe: 16 mm, akım yoğunluğu: 20 mA/m<sup>2</sup> t: 60 dakika)

Parametre	Ham atıksu	Arıtılmış atıksu	Giderim, %
Fosfat (mg/L)	263,30	9,4	96
Amonyak (mg/L)	48,76	18,26	63
Nitrit (mg/L)	0,355	0,071	80
Nitrat (mg/L)	18,90	5,71	70

Ham atıksuyun pH'ı, oluşan çeşitli hidroksit türlerinin stabilitesini etkilediği için arıtma etkinliği üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkiye sahip olabilir. Benzer şekilde, pH'daki bir değişiklik parçacıkların yüzey yükünü değiştirebilir ve kolloidal dağılmış organiklerin çözümlenmeden uzaklaştırılmasını büyük ölçüde etkiler (Khosro ve ark., 2014). Düşük ve yüksek pH'larda, demirin Pourbaix diyagramına göre çözünür demir hidroksit türleri oluşur. Katotta üretilen protonlar tarafından üretilen çöken hidroksit iyonlarının yetersiz demir hidroksit oluşumuna neden olması nedeniyle asidik bir pH'da giderim verimi düşük olur. Yüksek pH'da, flok oluşumu için uygun olmayan çözünür Fe(OH)<sub>4</sub> oluşumundan dolayı giderim verimi düşer. Nötr bir pH'da, demir komplekslerinin yoğunluğu oluşur ve daha yüksek bir giderim verimliliği elde edilir. Bu çalışmada atıksuyun doğal pH'ı nötre yakındır ve arıtmadan önce 7,47 olan atıksuyun pH'ı arıtmadan sonra 8,51 olmuştur (Eryuruk ve ark., 2018).

### Sonuçlar

Bu çalışmada demir elektrotlar kullanılarak mezbaha atıksularının elektrokoagülasyon prosesi ile arıtımı incelenmiştir. Arıtım sonucunda başlangıçta 263,30 mg/L olan fosfat değeri 9,4 mg/L'ye, 48,76 mg/L olan amonyak değeri 9,4 mg/L'ye, 0,355 mg/L olan nitrit değeri 0,071 mg/L'ye, 18,90 mg/L olan nitrat değeri 9,4 mg/L'ye düşmüştür.

Sonuç olarak, demir elektrotların kullanıldığı elektrokoagülasyon prosesi mezbaha atıksuyunun incelenen parametrelerin etkin bir şekilde arıtılması için uygun bir işlemdir.

### Teşekkür

Bu çalışma Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BirimiYLMUB017-08 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- American Public Health Association (APHA) 2005. Standard method for examination of water and wastewater, 21st edn. APHA, AWWA, WPCF, Washington.
- Budiyono IN, Widiyasa SJ 2010. Study on treatment of slaughterhouse wastewater by electro-coagulation technique. International Journal of Science and Engineering, 1(1): 25-28.
- Chen G 2004. Electrochemical technologies in wastewater treatment. Separation and Purification Technology, 38: 11-41.
- Cuetos MJ, Gomez X, Otero M, Moran A 2008. Anaerobic digestion of solid slaughterhouse waste (SHW) at laboratory scale: Influence of co-digestion with the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). Biochemical Engineering Journal, 40: 99-106.
- Eryuruk K, Tezcan Un U, Ogutveren UB 2018. Electrochemical treatment of wastewaters from poultry slaughtering and processing by using iron electrodes. Journal of Cleaner Production, 172: 1089-1095.

- Isa MH, Ezechi EH, Ahmed Z, Magram SF, Kutty SR 2014. Boron removal by electrocoagulation and recovery. *Water Research*, 51: 113-123.
- Khosa M.K., Jamal MA, Zia KM, Saif MJ, Rehman F, Bokhari TH, And Raza M 2014. Treatment of cattle slaughter house wastewater by electrocoagulation method using aluminium electrodes. *Asian Journal of Chemistry*, 26(19): 6335-6338
- Tezcan Ün Ü, Koparal AS, Ögütveren, ÜB 2008. Treatment of slaughterhouse wastewater with iron electrodes. *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, WIT Press, 111: 545-551.

DRAFT

## Merkezi kompozit tasarım ile P( $\epsilon$ -CL-ko-MMA)/bentonit kompoziti kullanılarak bazik mavi 41 gideriminin modellenmesi

Mehtap Tanyol

Munzur Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Tunceli, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: mtanyol@munzur.edu.tr

### Özet

Boya içeren atıksuların arıtılmadan sulara deşarj edilmesi hem toksikolojik hem de estetik nedenlerden dolayı önemli bir çevre sorunu oluşturmaktadır. Bu çalışmada, katyonik boya sınıfından olan yüksek toksiditeye sahip bazik mavi 41'in sulu çözeltilerden giderilmesi  $\epsilon$ -kaprolakton ve metil metakrilat monomerleri ile hazırlanmış kopolimerin bentonitle katkılanmış kompoziti [P( $\epsilon$ -CL-ko-MMA)/bentonit] kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bazik mavi 41'in uzaklaştırılmasını optimize etmek için merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Bazik mavi 41 adsorpsiyonunu önemli ölçüde etkileyen deney değişkenleri olarak başlangıç boya konsantrasyonu (5-20 mg/L), pH (3-9) ve temas süresi (10-120 dakika) seçilmiş ve optimize edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin anlamlılığı ve etkileşimleri ANOVA kullanılarak araştırılmıştır. Optimum koşullarda giderim verimi % 95,59 olarak elde edilmiştir. Bazik mavi 41'in giderimi için regresyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,9101 olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmada laboratuvarında sentezlenen P( $\epsilon$ -CL-ko-MMA)/bentonit kompozitinin bazik mavi 41 içeren atıksuların arıtımı için uygun bir alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bazik mavi 41, adsorpsiyon, merkezi kompozit tasarım, P( $\epsilon$ -CL-ko-MMA)/bentonit.

### Modelling of basic blue 41 adsorption onto P( $\epsilon$ -CL-ko-MMA)/bentonite using central composite design

#### Abstract

The discharging of wastewater containing dye into water without treatment is an important environmental problem due to both toxicological and esthetic reasons. In this study, removal of basic blue 41 which is highly toxic cationic class of dye was performed using P( $\epsilon$ -CL-co-MMA) polymer doped with bentonite. Central composite design was used to optimize the removal of basic blue 41. The initial dye concentration (5-20 mg/L), pH (3-9), and contact time (10-120 min) were selected and optimized as experimental variables which affected the basic blue 41 adsorption significantly. The significant of the independent variables and their interactions were investigated by the ANOVA. The removal yield under optimal conditions of process was found to be 95.59%. Regression coefficient ( $R^2$ ) for the basic blue 41 removal from the aqueous solution was found to be 0.9101. In the present study, it was concluded that the P( $\epsilon$ -CL-co-MMA)/bentonite composite synthesized in the laboratory may be a suitable alternative for the treatment of wastewaters containing basic blue 41.

**Keywords:** Basic blue 41, adsorption, central composite design, P( $\epsilon$ -CL-co-MMA)/bentonite.

### GİRİŞ

Son yıllarda, artan ihtiyaçlarla birlikte nüfus artışı pek çok endüstriyel gelişmeye yol açmıştır ve bu da kirliliğin artmasına neden olmuştur. Tekstil endüstrisinde karşılaşılan en önemli çevre sorunlarından biri proseslerinden büyük miktarda renkli atıksuların üretilmesidir. Tekstil boyalarının çoğu organizmalar için toksiktir ve yeterli işlem görmeden doğrudan deşarj edilmeleri ekosistemi uzun vadede önemli ölçüde etkileyebilir. Ağırlıklı olarak tekstil endüstrisinde olmak üzere  $10^4$  ton/yıl boyanın tüketimi ile sucul çevreye yaklaşık 100 ton/yıl boyanın ulaştığı tahmin edilmektedir. Tekstil atıksularının karmaşık ve kararlı kimyasal yapısı nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilirliğe karşı bir direnci vardır. Suda küçük konsantrasyonlarda bile (<1 mg/L) boyaların varlığı görünür ve istenmez. Çünkü boyalar ışık geçirgenliğini engelleyebilir ve biyolojik metabolizma süreçlerine zarar verebilir. Ayrıca bazı boyaların doğada oldukça toksik, biyolojik olarak çözünemeyen ve mutajenik oldukları, insan, hayvan ve çevre sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak etkiledikleri rapor edilmiştir. Bu nedenle, boya içeren atıksuların arıtılması önemli bir husustur ve literatürde birçok yöntem bildirilmiştir (Boudechiche ve ark., 2019).

Bu yöntemler arasında adsorpsiyon kolay çalışma, maliyet etkinliği ve yüksek verimlilik nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Arıtımda kullanılacak adsorbentler, uygun bir gözenek yapısına ve yüzey kimyasal

bileşimine, adsorbat için güçlü bir adsorpsiyon kapasitesine, ekonomik nedenlerden dolayı yüksek bir geri dönüştürülebilirliğe ve yeniden kullanılabilirliğe, iyi bir mekanik mukavemete ve kullanım ve tutma kolaylığına sahip olmalıdır (Lozano-Morales ve ark., 2018).

Bu çalışmada sulu çözeltilerden bazik mavi 41'in giderimi adsorbent olarak P(ε-CL-ko-MMA)/bentonit kompoziti kullanılarak araştırılmıştır. Boya giderimi üzerine farklı ortam parametrelerinin etkisi yanıt yüzey yönteminin bir türü olan merkezi kompozit tasarım kullanılarak belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Deneylede kullanılan boya çözeltileri, bazik mavi 41'in (kimyasal formülü: C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>, molekül ağırlığı: 482,57 g/mol) distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Adsorbent olarak kullanılan P(ε-CL-ko-MMA)/bentonit kompoziti, daha önce laboratuvarında sentezlenmiş olan P(ε-CL-ko-MMA)'ya bentonit katılarak hazırlanmıştır. Bunun için kütlece %15 oranında alınan bentonitin sulu çözeltisi polimer çözeltisi içinde 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu işlemle bentonit minerallerinin polimer içinde homojen olarak dağılmasını sağlanmıştır. Daha sonra polimer/bentonit çözeltisi kurutularak adsorpsiyon deneylerinde kullanılmıştır.

Bazik mavi 41'in giderimini etkileyen proses parametreleri, Desing Expert Software (7.0 trial version) kullanılarak oluşturulan merkezi kompozit tasarım kullanılarak incelenmiştir. Başlangıç boya konsantrasyonu, pH ve zamanı içeren üç bağımsız değişkenli merkezi kompozit tasarımda, boya giderimi yanıt olarak alınmıştır. Tablo 1'de bu faktörler ve seviyeleri verilmiştir. Veriler istatistiksel yöntemle (ANOVA) analiz edilmiştir.

**Tablo 1.** Faktörler ve seviyeleri

Faktör	Sembol	Seviye				
		-α	-1	0	+1	+α
pH	A	3	4,5	6	7,5	9
Başlangıç boya konsantrasyonu, mg/L	B	5	8,75	12,5	16,25	20
Zaman, dakika	C	10	37,5	65	92,5	120

Kesikli adsorpsiyon deneyleri farklı başlangıç boya konsantrasyonlarında 100 mL boya çözeltisi içeren 250 mL'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin pH'ı, 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılarak adsorpsiyondan önce ayarlanmıştır. Erlenlere 0,04 g adsorbent ilave edilmiştir. Daha sonra erlenler farklı temas süreleri için 30 °C sıcaklıkta 200 rpm'de bir orbital inkübatörde çalkalanmıştır. Adsorpsiyondan sonra örnekler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Çözeltilerde kalan boya miktarı 610 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. Bazik mavi 41 giderim verimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Bazik mavi 41 giderim verimi (\%)} = \frac{C_i - C_t}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

Burada C<sub>i</sub>, bazik mavi 41'in başlangıç konsantrasyonu (mg/L) ve C<sub>t</sub>, herhangi bir t zamanındaki bazik mavi 41 konsantrasyonudur (mg/L).

## Bulgular ve Tartışma

Bazik mavi 41 giderimini optimize etmek için merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Tablo 2'de dizayn matrisi ve yanıt değerleri verilmiştir. Bu adsorpsiyon prosesi için, Eşitlik (2)'de gösterildiği gibi ikinci dereceden bir model denklemi elde edilmiştir:

$$\text{Boya giderimi, \%} = +93,62 + 4,56A - 6,08B + 9,90C + 5,29AB - 5,09A^2 - 0,57B^2 \quad (2)$$

**Tablo 2.** Farklı deneysel şartlar için yanıt değerleri.

Deney No	pH	Başlangıç boya konsantrasyonu (mg/L)	Zaman (dakika)	Boya giderimi (%)
1	4,22	16,96	97,70	85,20
2	9,00	12,50	65,00	89,95
3	6,00	12,50	10,00	55,95
4	7,78	16,96	97,70	90,44
5	7,78	16,96	32,30	77,89
6	6,00	12,50	65,00	93,78
7	4,22	8,04	97,70	99,07
8	4,22	8,04	32,30	87,56
9	7,78	8,04	32,30	75,12
10	6,00	5,00	65,00	98,03
11	6,00	12,50	65,00	93,78
12	6,00	12,50	65,00	93,78
13	6,00	20,00	65,00	80,43
14	6,00	12,50	120,00	89,13
15	3,00	12,50	65,00	62,96
16	6,00	12,50	65,00	93,78
17	6,00	12,50	65,00	93,78
18	4,22	16,96	32,30	53,54
19	6,00	12,50	65,00	93,78
20	7,78	8,04	97,70	98,79

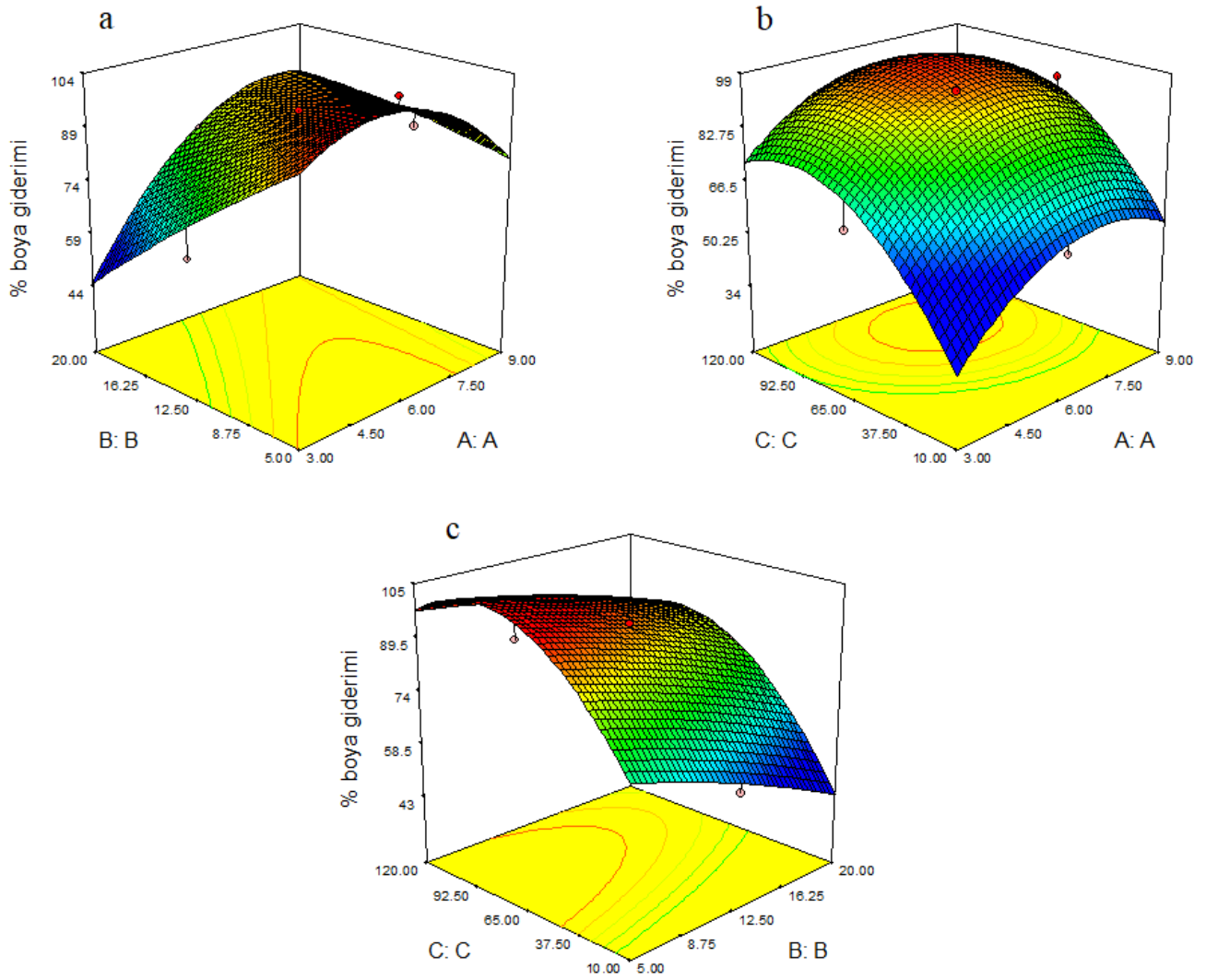
Elde edilen model için bulunan denklemin uyumunu test etmek için varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Model için ANOVA testinin sonuçları Tablo 3’de gösterilmektedir.

**Tablo 3.** Varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	F- değeri	p-değeri Prop>p
Model	3262,10	9	362,46	11,25	0.0004
A-pH	283,85	1	283,85	8,81	0.0141
B-Başlangıç boya konsantrasyonu	505,28	1	505,28	15,68	0.0027
C-Zaman	1338,29	1	1338,29	41,52	< 0.0001
AB	223,77	1	223,77	6,94	0,0250
AC	6,04	1	6,04	0,19	0,6743
BC	10,19	1	10,19	0,32	0,5863
A <sup>2</sup>	373,13	1	373,13	11,58	0,0067
B <sup>2</sup>	4,71	1	4,71	0,15	0,7102
C <sup>2</sup>	603,74	1	603,74	18,73	0,0015
Kalan	322,31	10	32,23		
Saf hata	7,500E-006	5	1,500E-006		
R <sup>2</sup>			0,9101		
R <sup>2</sup> -Ayarlanmış			0,8291		
Yeterli hassasiyet			12,099		
Varyasyon katsayısı			6,65		

Modelin F-değeri ne kadar büyük ve p-değeri ne kadar küçükse, uygulanan modelin o kadar anlamlı olduğu söylenebilir. 11,25 olan modelin F-değeri ve p-değerinin 0,0500’den düşük olması modelin %95 güven seviyesinde anlamlı olduğunu göstermektedir (Tablo 3). Benzer şekilde, A, B, C, AB, A<sup>2</sup> ve B<sup>2</sup> için 0,0500’den küçük olan p-değerleri, bu model terimlerinin (pH, başlangıç boya konsantrasyonu, zaman, pH-başlangıç boya

konsantrasyonu, pH-pH ve başlangıç boya konsantrasyonu-başlangıç boya konsantrasyonu) istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. Modelden sınırlı etkiye sahip olan önemsiz model terimleri kaldırılmıştır. Bu çalışmada, 0,9101 olarak hesaplanan  $R^2$  değeri, adsorpsiyondaki değişikliklerin %91,01'inin model ile açıklanabileceğini gösterir. Bu uygulanan modelin giderim verimliliğini (%) öngörmeye güvenilir olabileceğini göstermiştir. Yeterli hassasiyet, sinyal/gürültü oranını ölçer ve 4,0'den büyük olması arzu edilir. Tablo 3'de görüldüğü gibi yeterli hassasiyet değeri 12,099'dur ve bu da yeterli sinyal olduğunu gösterir. Varyasyon katsayısı, standart sapmayı ortalamanın yüzdesi olarak ifade eden bir ölçüdür. Verilerin ne ölçüde dağıldığını açıklar. Varyasyon katsayısının düşük değerleri daha iyi tekrarlanabilirlik sağlar (Asfaram ve ark., 2015). Bu çalışmada, varyasyon katsayısı değeri (%6,65), ortalama değerdeki değişimin kabul edilebilir ve tatmin edici olduğunu gösteren kabul edilebilir aralıktadır (% 0,5-13,5) (Dil ve ark., 2016). Çalışılan bağımsız değişkenlerin bazik mavi 41 adsorpsiyonu üzerindeki etkileşim etkisini analiz etmek için üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri (3-D) çizilmiştir (Şekil 1a-c).



Şekil 1. Merkezi kompozit tasarım için yüzey eğrileri a) A-B, b) A-C, c) B-C.

Şekil 1a'da, başlangıç boya konsantrasyonu ve pH'nin bir fonksiyonu olarak yanıt yüzeyi grafiği gösterilmiştir (zaman 65 dakikada sabit tutulmuştur). Şekil 1a'dan görülebileceği gibi, başlangıçtaki boya konsantrasyonunun artırılmasıyla boyanın giderim etkinliği düşmüştür. Yüksek boya konsantrasyonlarında boya giderme verimindeki (%) azalma, adsorbentin adsorptif alanlarının doygunluğundan kaynaklanabilir (Soltani ve ark., 2014). Ayrıca, başlangıçtaki boya konsantrasyonlarının azalması ile boya giderme verimindeki (%) artış, bazik mavi 41 adsorpsiyonunun başlangıç konsantrasyonlarına bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 2b'de pH ve zamanın etkileşim etkisi başlangıç boya konsantrasyonunun 12,5 mg/L'de sabit tutularak sunulmuştur. Boya giderim veriminin yaklaşık olarak 6-7,5 pH aralığında daha yüksek olduğu

şekilden görülmektedir. Adsorbentin yüzeyi, pH 7 civarında negatif yüke sahiptir ve yüzeyinde bir miktar hidroksil grubu vardır. Bu nedenle katyonik boya moleküllerinin etkileşimi, elektrostatik etkileşim ve hidrojen bağı ile gerçekleşebilir (Zarezadeh-Mehrizi ve Badiei, 2014). Zamanın giderim yüzdesi üzerindeki etkileşim etkisi, Şekil 1c'de gösterilmiştir (pH 6'da sabit tutulmuştur). Boya birikimi başlangıçta hızlı olmuştur ve temas süresinin artmasıyla giderim yüzdesi artmıştır ve sonra doygunluğa ulaşıncaya kadar adsorpsiyon hızı yavaşlamıştır (Gregorio, 2008).

Maksimum bazik mavi 41 giderimini sağlayan proses şartlarını optimize etmek için Desing Expert'in desirability

fonksiyonu kullanılmıştır. Maksimum bazik mavi 41 giderimi için optimum sonuçlar; pH 7,70, başlangıç boya konsantrasyonu 17,43 mg/L ve zaman 92,05 dakika olarak elde edilmiştir (desirability:0,961). Bu şartlarda giderim verimi %95,59 olmuştur.

## SONUÇLAR

Bu çalışmada bazik mavi 41 giderimi üzerine pH (A), başlangıç boya konsantrasyonu (B) ve zaman (C) gibi çeşitli işletme parametrelerinin etkisi adsorbent olarak P(ε-CL-ko-MMA)/bentonit kompoziti kullanarak araştırılmış ve optimize edilmiştir. Sonuçlar P(ε-CL-ko-MMA)/bentonit kompozitinin bazik mavi 41 giderimi için etkili bir adsorbent olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Asfaram A, Ghaedi M, Goudarzi A, Rajabi M 2015. Response surface methodology approach for optimization of simultaneous dye and metal ion ultrasound assisted adsorption onto Mn doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NP<sub>s</sub> loaded on AC: kinetic and isothermal studies. Dalton Transactions, 44:14707-14723.
- Boudechiche N, Fares M, Ouyahia S, Yazid H, Trari M, Sadaoui Z 2019. Comparative study on removal of two basic dyes in aqueous medium by adsorption using activated carbon from *Ziziphus lotus* stones. Microchemical Journal, 146:1010-1018.
- Darvishi Cheshmeh Soltani R, Khataee AR, Godini H, Safari M, Gha-nadzadeh MJ, Rajaei MS 2014. Response surface methodological evaluation of the adsorption of textile dye onto biosilica/alginate nanobiocomposite: thermo-dynamic, kinetic, and isotherm studies. Desalination and Water Treatment, 56(5):1-14.
- Dil EA, Ghaedi M, Ghaedi AM, Asfaram A, Goudarzi A, Hajati S, Soylak M, Agarwal S, Gupta VK 2016. Modeling of quaternary dyes adsorption onto ZnO-NR-AC artificial neural network: analysis by derivative spectrophotometry. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 34:186-197.
- Gregorio C 2008. Kinetic and equilibrium studies on the removal of cationic dyes from aqueous solution by adsorption onto a cyclodextrin polymer. Dyes and Pigments 77:415-426.
- Lozano-Morales V, Gardi I, Nir S, Undabeytia T 2018. Removal of pharmaceuticals from water by clay-cationic starch sorbents. Journal of Cleaner Production 190:703-711.
- Mehrizi MZ, Badiei A 2014. Highly efficient removal of basic blue 41 with nanoporous silica open overlay panel. Water Resources and Industry, 5:49-57.



## Fonksiyonelleştirilmiş MWCNT ile desteklenmiş PC/PLA kompozitlerinin karakterizasyonu

Gizem URTEKİN<sup>1</sup>, Ayşe AYTAC<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kocaeli-TÜRKİYE

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi, Polimer Bilimi ve Teknolojisi Programı, Kocaeli-TÜRKİYE

[aaytac@gmail.com](mailto:aaytac@gmail.com)

### Özet

Poli(laktik asit) (PLA), dayanımı, sertliği ve gaz geçirgenliği gibi birçok özelliğinden dolayı biyobozunur polimerler arasında en fazla tercih edilen polimerlerden biridir. Endüstri için iyi özelliklerinin yanı sıra düşük ısı kararlılığına sahip olması onun birçok alanda kullanımı sınırlandırmaktadır. Bu aşamada endüstrinin en çok tercih ettiği yöntem polimerleri karışım haline getirip kullanmaktır. Bu çalışmada polikarbonat (PC), PLA ile karıştırılarak bir karışım oluşturulmuştur. PC, yüksek mekanik özellikler, yüksek ısı dayanıklılık ve gelişmiş tokluk özellikleri ile birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle otomotiv sektöründe tercih edilir. Bu polimere biyobozunurluk özellikler kazandırılmaya çalışılarak, bir biyobozunur malzeme ile karışım haline getirilip kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır. Bu iki polimerin karışımının özelliklerini iyileştirmek için bazı katkı maddeleri ilave edilmektedir. Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT), yüksek elektriksel, mekanik ve termal özellikleri ile polimerlere farkındalık kazandıran nano katkılardır. MWCNT'lerin matris içinde iyi dispersiyonu polimer karışımının birçok özelliğini geliştirmede etkili olan parametrelerin en önemlisidir. Bu çalışma kapsamında matris olarak %70 PC-%30 PLA seçilerek, modifiye edilmiş MWCNT ilave edilerek nanokompozitler oluşturulmuştur. Kontrol numunesi olarak 70/30 oranında PC/PLA karışımı seçilmiştir. MWCNT yükleme oranı olarak %0.5-1-3-5 değerleri tercih edilmiştir. Malzemeler laboratuvar ölçekli çift vidalı mini ekstruder cihazında 260 °C'de 100 rpm vida dönme hızında eriyik haline getirilmiştir. Ekstruderden alınan eriyik enjeksiyon cihazında kalıplanmıştır. Hazırlanan numunelerin karakterizasyonları için termal gravimetrik analiz cihazı (TGA), diferansiyel taramalı kalorimetre cihazı (DSC), çekme testi cihazı ve iletkenlik ölçüm cihazları kullanılmıştır. Elde edilen termal iletkenlik ölçümleri sonucunda karbon nanotüp ilavesinin iletkenlik değerlerini arttırdığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** nanokompozit, iletkenlik, poli(laktik asit), polikarbonat, karbon nanotüp

### Characterization of the functionalized MWCNT reinforced PC/PLA composites

#### Abstract

Poly (lactic acid) (PLA) is one of the most preferred biodegradable polymers due to its many properties such as strength values, hardness, gas permeability. Low thermal stability values as well as good properties for the industry limit it to use in many areas. At this stage, the most preferred method for the industry is to mix polymers. In this study, polycarbonate (PC) was mixed with PLA to form a blend. PC is used in many fields with its high mechanical properties, high thermal strength and improved toughness. It is especially preferred in the automotive sector and it has begun to be used as a mixture with a biodegradable material by trying to give biodegradability properties to this polymer. To improve the properties of the mixture of these polymers, some additives are added. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) are nano-additions that give awareness to polymers with their high electrical, mechanical and thermal properties. The good dispersion of MWCNTs in the matrix is the most important parameter in improving the many properties of the polymer mixture. Within the scope of this study, nanocomposites were prepared by adding modified MWCNT by selecting 70% PC-30% PLA as matrix. 70/30 PC / PLA mixture was selected as the control sample. 0.5-1-3-5% values were preferred as loading ratio. The materials were melted in a laboratory scale twin screw mini extruder at 260 °C at 100 rpm. The melt from the extruder was molded in the injection device. Thermal gravimetric analyzer (TGA), differential scanning calorimeter (DSC), tensile tester and conductivity meter were used for characterization of the prepared samples. As a result of the thermal conductivity measurements, the addition of carbon nanotube increased the conductivity values.

**Keywords :** nanocomposite, conductivity, poly(lactic acid), polycarbonate, carbon nanotube

## 1.GİRİŞ

Farklı yöntemler ile üretimi gerçekleştirilen, zamanla da polimer kavramı yerine kullanılmakta olan plastik, son zamanlarda daha sık kullanılan bir kelime olmuştur. Günümüze gelindiğinde ise birçok polimer türü yaşantımızın birçok farklı noktalarında karşımıza çıkmaya devam etmektedirler (Mishra ve ark., 2017).

Poli(laktik asit) (PLA); mısır, şeker kamışı ve buğday gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyobozunur bir polimerdir. Alifatik poliester sınıfında termoplastik bir malzemedir. PLA'nın dayanım, sertlik ve gaz geçirgenliği özelliklerine bakıldığında petrol kaynaklı polimerlerinki ile karşılaştırılabilir özellikte olduğu görülmektedir. Fakat, PLA'nın avantajlarının yanı sıra düşük tokluk ve düşük ısıl kararlılık gibi birtakım eksiklikleri de bulunmaktadır. PLA karışımları, biyobozunurluk özelliği ile tarım ürünlerinde, yapıstırıcılarda, ambalaj ürünlerinde veya tıbbi ürünlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Hamad ve ark., 2018).

Polikarbonat (PC) sahip olduğu yüksek ısıl kararlılık ve mükemmel tokluk değerleriyle en çok tercih edilen mühendislik plastiklerinden bir tanesidir. Sertliğine rağmen darbeler karşısında kırılğan değildir ve sünek bir davranış sergiler. Enjeksiyon, eriyikten harmanlama, ekstrüzyon ve şişirme ile kalıplama gibi birçok yöntem ile kalıplanabilmektedir (Peacock ve ark., 2006). Bununla birlikte, PC'nin bozunması uzun süreler gerektirdiğinden çevre sorunlarını da beraberinde getirir. Bu sebeple, PC gibi oldukça iyi mekanik özelliklere sahip polimerlerin eksikliklerini en aza indirmek için polimer karışımları hazırlanmaktadır. Mükemmel mekanik özelliklere sahip PC ile biyobozunur özellik sergileyen PLA'nın karışımlarının hazırlanması ile PC'nin saf olarak kullanımından kaynaklı çevre sorunlarına az da olsa çözüm getirilmektedir. PC/PLA karışımları, otomotiv parçaları, cep telefonları ve bilgisayarlar gibi çeşitli teknolojik alanlarda kullanılmaktadır (Niaonakis ve ark., 2015, Hazer ve ark., 2018).

PLA'nın üstün özellikleri ile PC'nin güçlü özellikleri harmanlandığında, elde edilen karışımdan farklı özellikte malzemeler ortaya çıkmaktadır. Literatür incelendiğinde, PLA ile birlikte kullanılan birçok farklı polimer bulunmaktadır. Polietilen, poliamid, polipropilen, poli (p-kaprolakton), poli (metil metakrilat), polikarbonat (PC), poli (hidroksibütirat), poli (propilen karbonat) gibi birçok polimer ile çalışmalar mevcuttur (Wang ve ark., 2001, Reddy ve ark., 2008, Park ve ark., 2011, Arrieta ve ark., 2014, Lee ve ark., 2011, Eitan ve ark., 2006).

PC ve PLA'nın ısıl ve elektriksel özelliklerini geliştirmek için matris içerisine çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) eklenip nanokompozitler oluşturulmuş, oluşan nanokompozitlerin kalitesi de çoğunlukla polimer matrisi içerisindeki MWCNT dağılımı ile belirlenmiştir. MWCNT'nin homojen dağılımı, nanotüpler arasındaki van der Waals kuvvetleri etkisiyle oldukça zordur. Karbon nanotüpler, birim hacim başına geniş yüzey alanlarına sahip olması ve benzersiz mekanik özelliklerinden dolayı takviye malzemesi olarak polimerlere ilave edilmektedir (Jang ve ark., 2015, Eitan ve ark., 2006).

Bu çalışmada, %30 PC- %70 PLA içeren karışıma farklı fonksiyonel gruplara sahip MWCNT ilave ederek, üretimi yapılan nanokompozitlerin özelliklerindeki değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. İki farklı özellikte karbon nanotüp, %0,5-5 arasında 4 farklı yükleme oranı belirlenerek karışımın içerisine eklenmiştir. PC/PLA karışımı çalışma süresince kontrol numunesi olarak seçilmiştir. Kontrol numunesi ve nanokompozitler ekstrüderde ile hazırlanmış ve enjeksiyon kalıplama cihazı ile kalıplanmıştır. Son olarak, MWCNT katkılı nanokompozitlerin ısıl, mekanik ve iletkenlik özellikleri incelenerek, elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Malzemeler

Poli(laktik asit) (PLA), NatureWorks firmasından alınmıştır. PLA-2003D'nin,  $T_m$  değeri 150-155 °C arasında değişiklik gösterirken,  $T_g$  50-55°C aralığında bir değer vermektedir ve eriyik akış indeksi(MFI) 10–30 g/10 dak(190 °C)'dir. Polikarbonat (PC), PC110 koduyla Kemprow'dan temin edilmiştir. Yoğunluğu 1.2 g/cm<sup>3</sup>, MFI değeri 12 g/10dak.(300 °C)'dir. OH fonksiyonel grubuna sahip MWCNT, Grafen firmasından alınmıştır. Saflik oranları %90-95 aralığındadır.

### 2.2 Numune Hazırlama

Çalışmaya ilk olarak kullanılan polimerlerin saf halleri üretilerek başlanmıştır. Daha sonrasında yüzde 0,5-5 aralığında 4 farklı fonksiyonel gruba sahip MWCNT içeren nanokompozitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanokompozitlerin bileşenleri Tablo 1'de gösterilmektedir. Üretime başlanmadan önce kullanılacak olan PLA, 24 saat süresince vakumlu etüvde kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, laboratuvar ölçekli eş zamanlı dönen, çift vidalı ekstrüderde eriyik harmanlama yöntemi kullanılarak karıştırılmıştır. Ekstrüderdeki süreç koşulları 260 °C sıcaklık, 100 rpm dönme hızı ve 3 dakika alıkonma süresi olarak belirlenmiştir. Eriyik halinde ekstrüderden alınan karışım enjeksiyon kalıplama cihazı kullanılarak

kalıplanmıştır. Burada da tabanca sıcaklığı 260 °C, kalıp sıcaklığı 45 °C ve enjeksiyon basıncı da 10 bar olarak seçilmiştir.

**Tablo 1.** MWCNT katkısı yapılan PC/PLA karışımının bileşenleri

ÖRNEKLER	PC	PLA	MWCNT-OH	PC-g-MWCNT
	(%wt)	(%wt)	(%wt)	(%wt)
PC	100		----	----
PLA		100	----	----
70PC/30PLA	70	30	----	----
PC/PLA/MWCNT-OH%0,5	70	30	0,5	----
PC/PLA/MWCNT-OH%1	70	30	1	----
PC/PLA/MWCNT-OH%3	70	30	3	----
PC/PLA/MWCNT-OH%5	70	30	5	----
PC/PLA/PC-g-MWCNT%0,5	70	30	----	0,5
PC/PLA/PC-g-MWCNT%1	70	30	----	1
PC/PLA/PC-g-MWCNT%3	70	30	----	3
PC/PLA/PC-g-MWCNT%5	70	30	----	5

### 2.3 Karakterizasyon Yöntemleri

Termal özelliklerin incelenmesi için Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) cihazları ile iki farklı ısıl analiz yöntemi gerçekleştirilmiştir. TGA cihazı ile karışımların bozunmaya başlama, bitiş sıcaklıkları ve %kalıntı miktarları belirlenmiştir. Burada 25 °C'den 800 °C'ye dakikada 10 °C'lik bir ısıtma hızıyla bir analiz gerçekleştirilmiştir.

DSC cihazı ile karışımların erime ve kristalizasyon entalpileri, erime ve camsı geçiş sıcaklıkları belirlenmiştir. Çift ısıtma Metodu kullanılmıştır. Sıcaklık aralığı 25 °C'den 200 °C'ye dakikada 10 °C'lik ısıtma ve soğutma hızı kullanılmıştır. Numuneye ilk olarak soğutma, 200 °C'ye geldiğinde 5 dakika bekleme, 25 °C'ye soğutma ve en son tekrar 200 °C'ye ısıtma işleme uygulanmıştır. Numune 5-10 mg boyut aralığında kullanılmıştır.

Çekme testi oda sıcaklığında Instron(2712-020) marka evrensel test cihazıyla gerçekleştirildi. ISO 527 5 A standartına göre 5mm/dak. çekme hızı ile numuneler test edildi. Isıl iletkenlik testi için TPS 2500 S Sıcak Disk Termal Sabitleri Analizörü cihazı kullanıldı. Bu test sonucunda üretilmiş olan malzemelerin ısıl iletkenlik katsayıları elde edildi. Sonuçların doğruluğundan emin olmak için 20 deneme yapıldı.

Elektriksel iletkenlik ölçümleri LCR meter (Sourcetronic ST2826A, Almanya) cihazında gerçekleştirildi. Ölçüm oda sıcaklığında yapıldı. Çekme kalıbından elde edilen numunenin kulakçık kısmından kare numuneler elde edildi ve ölçümü gerçekleştirilmeden önce numune gümüş pasta ile boyandı. Farklı frekans taramasındaki elektriksel iletkenlik değerleri elde edildi.

## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 3.1 Termal Gravimetrik Analiz

Tablo 2 MWCNT katkılı 70PC/30PLA karışımlarının TGA sonuçlarını göstermektedir. Karışımın bozunma başlama sıcaklığı karbon nanotüp eklenmesi ile artmıştır. PC-g-MWCNT'nin kalıntı kül miktarları MWCNT-OH'a göre daha yüksek gelmiştir. Karışımda ve %0,5-%1 katkılı nanokompozitlerde ikili bozunma verirken, katkı malzeme miktarları arttırdığında tekli bir bozunma sergilenmiştir.

**Tablo 2.** MWCNT katkılı 70PC/30PLA karışımlarının TGA verileri

ÖRNEKLER	Bozunma Başlama Sıcaklığı (°C)	Bozunma Bitiş Sıcaklığı (°C)	Maksimum Bozunma Sıcaklığı (°C)		%5 Bozunma Sıcaklığı (°C)	% Kalıntı
PC	480,2	515,2	495,8		449,3	21,6
PLA	334,0	366,2	355,7		307,0	0
70PC/30PLA	314,8	498,2	353,4	455,2	302,2	6,3
MWCNT-OH %0,5	320,2	443,1	354,6	387,5	327,7	7,1
MWCNT-OH %1	345,2	461,0	367,8	403,7	336,5	12,2
MWCNT-OH %3	350,3	442,9	392,3		346,2	13,5
MWCNT-OH %5	354,6	438,6	383,4		350,8	14,8
PC-g-MWCNT %0,5	336,2	392,4	354,0	400,0	332,5	10,5
PC-g-MWCNT %1	362,3	513,2	367,0	445,0	346,2	11,1
PC-g-MWCNT %3	370,2	522,8	365,5	414,2	342,2	13,8
PC-g-MWCNT %5	352,0	448,0	385,4		345,5	16,4

### 3.2 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

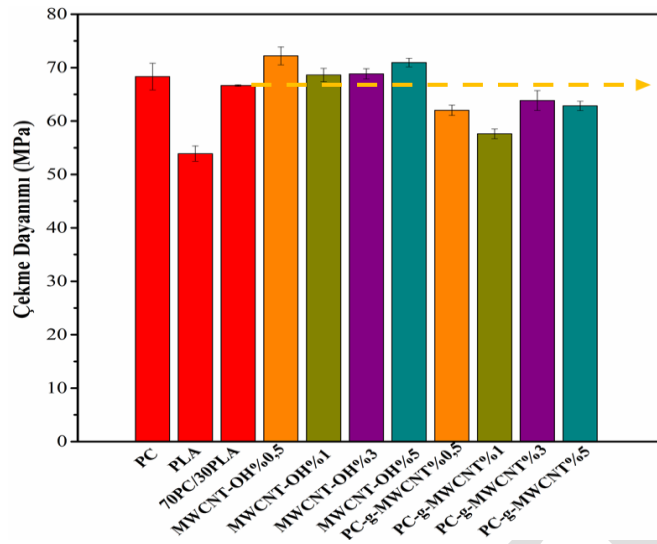
Tüm karışımlara DSC analizi yapılmıştır. PC/PLA karışımının  $T_g$  değerine Tablo 3'ten bakıldığında; iki polimerden de düşük bir değerde çıktığı görülmektedir. -OH fonksiyonlu MWCNT ilavesi artan yüzde oranlarında artan  $T_g$  değerleri vermiştir. PC-g-MWCNT de ise  $T_g$  değerlerinde düşüşler söz konusudur. PC-g-MWCNT eklenmesi ile artan % kristanilite değerleri elde edilmiştir.

**Tablo 3.** Hazırlanan Nanokompozitlerin DSC verileri

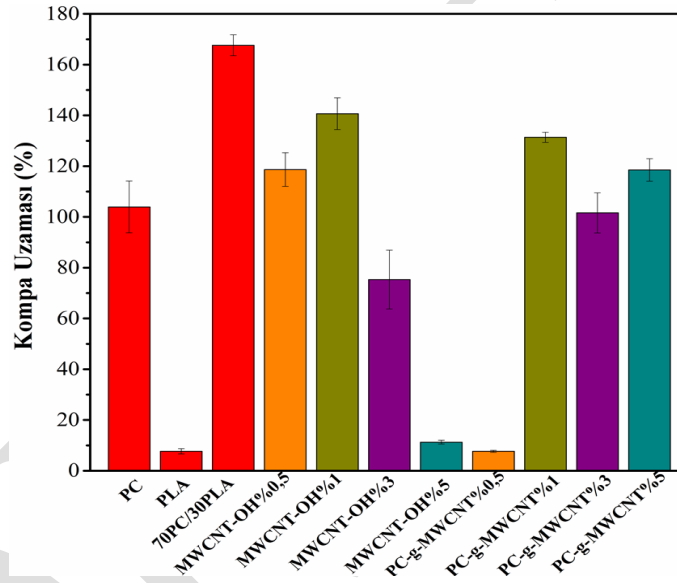
	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	% $X_c$
PC	145,0	---	---	---
PLA	63,0	151,3	-17,4	28,9
70PC/30PLA	52,1	151,1	-6,2	21,9
MWCNT-OH %0,5	57,2			
MWCNT-OH %1	57,6	149,3	-2,6	9,5
MWCNT-OH %3	58,2	149,5	-3,8	14,0
MWCNT-OH %5	62,7	148,7	-3,3	12,2
PC-g-MWCNT %0,5	59,5	148,9	-1,9	6,6
PC-g-MWCNT %1	56,9	149,2	-3,9	14,0
PC-g-MWCNT %3	55,9	148,6	-3,8	14,1
PC-g-MWCNT %5	54,5	148,3	-4,3	16,1

### 3.3 Çekme Testi

Şekil 1 incelendiğinde; 70PC/30PLA karışımı, polimerlerin çekme dayanımları arasında bir değer göstermiştir. MWCNT-OH katkılı nanokompozitler arasında en yüksek değer, 72,2 MPa ile %0,5 katkılı kompozitte elde edilmiştir. PC-g-MWCNT katkısının çekme dayanımı değerlerini karışımına göre azalttığı saptanmıştır. Şekil 2'de ise kopmada uzama değerleri görülmektedir. 70PC/30PLA karışımı, polimerlere kıyasla daha fazla uzama göstermiştir. Karışıma yapılan katkıların tümü bu değeri düşürmüşlerdir. %0,5 ve %1 ilavelerde MWCNT-OH'da yüksek uzama değerleri elde edilirken, %3 ve %5'lik ilavelerde PC-g-MWCNT katkılarında yine yüksek uzama değerlerine ulaşılmıştır.



Şekil 1. Polimerlerin ve nanokompozitlerinin çekme dayanımı değerleri



Şekil 2. Polimerlerin ve nanokompozitlerinin % kopmada uzama değerleri

### 3.4 Isıl İletkenlik

70PC/30PLA karışımının ısı iletkenlik değeri 0,27 W/mK olarak ölçülmüştür. Karışıma göre en yüksek ısı iletkenlik değeri %19 artış sağlayan %3 MWCNT-OH katkıli nanokompozitte elde edilmiştir. %1 oranında PC-g-MWCNT ilavesinin iletkenlik değerine bir katkısı olmayıp karışım ile aynı iletkenlik değerini vermiştir.

### 3.5 Elektriksel İletkenlik

Artan frekanslarda elektriksel iletkenlik değerlerinde artışlar meydana gelmiştir (Tablo 4.). Yükleme oranlarının artırılması, elektriksel iletkenliğin artmasını sağlamıştır. En yüksek elektriksel iletkenlik değeri %5 PC-g-MWCNT katkıli nanokompozitte elde edilmiştir.

**Tablo 4.** 70PC/30PLA ve nanokompozitlerinin elektriksel iletkenlikleri

	$\sigma_{AC} \times 10^{-8}$ (S/m)			
	1 kHz	10 kHz	100 kHz	1 MHz
<b>70PC/30PLA</b>	1,90	2,10	7,86	57,6
<b>MWCNT-OH%1</b>	1,72	1,90	17,7	150
<b>MWCNT-OH%3</b>	10,2	11,4	21,6	178
<b>MWCNT-OH%5</b>	6,95	7,63	485	3000
<b>PC-g-MWCNT%1</b>	1,66	2,05	3,79	40,3
<b>PC-g-MWCNT%3</b>	8,6	10,75	15,4	84,8
<b>PC-g-MWCNT%5</b>	<b>60,9</b>	<b>264</b>	<b>1850</b>	<b>14800</b>

#### 4. SONUÇLAR

PC-g-MWCNT katkısının çekme dayanımı değerlerini karışımına göre azalttığı saptanmıştır. %0,5 ve %1 ilavelerde MWCNT-OH'da yüksek uzama değerleri elde edilirken, %3 ve %5'lik ilavelerde PC-g-MWCNT ile yüksek kopmada uzama değerlerine ulaşılmıştır. 70PC/30PLA karışımının ısı iletkenlik değeri 0,27 W/mK olarak ölçülmüştür. En yüksek ısı iletkenlik değeri karışıma göre %19 artış sağlayan %3 MWCNT-OH katkılı nanokompozitte görülmüştür. En yüksek elektriksel iletkenlik değeri %5 PC-g-MWCNT katkılı nanokompozitte elde edilmiştir.

#### TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını 2019/038 proje nolu yüksek lisans projesi kapsamında destekleyen Kocaeli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

#### KAYNAKLAR

- Arrieta MP, López J, Rayón E, and Jiménez A 2014, Disintegrability under composting condition of plasticized PLA-PHB blends. *Polym. Degrad. Stab.*, 108: 307.
- Eitan A, Fisher FT, Andrews R, Brinson LC, Schadler LS 2006. Reinforcement mechanisms in MWCNT-filled polycarbonate, *Composites Science and Technology*, 66: 1162-1173.
- Hamad K., Kaseem M., Ayyoob M., 2008, Joo J., et al., Polylactic Acid Blends: The Future of Green, Light and Tough, *Progress in Polymer Science*, 85, 83-127.
- Hazer S., Coban M., Aytac A., 2018 A Study on Carbon Fiber Reinforced Poly(lactic acid)/Polycarbonate Composites, *Journal of Applied Polymer Science*, 135, 1-9.
- Jang M.G., Lee Y.K., Kim W.N., 2015, Influence of Lactic Acid-Grafted Multi-Walled Carbon Nanotube (LA-g-MWCNT) on the Electrical and Rheological Properties of Polycarbonate / Poly (lactic acid) / LA-g-MWCNT Composites, *Macromolecular Research*, 23, 916-923.
- Lee JB, Lee YK, Choi GD, Na SW, Park TS, and Kim WN 2011. Compatibilizing effect for improving mechanical properties of biodegradable poly(lactic acid) and polycarbonate blends. *Polym. Degrad. Stab.*, 96: 553.
- Mishra J., Tiwari S.K., Abolhasani M.M., Azimi S., et al., 2017, *Fundamental of Polymer Blends and Its Thermodynamics*, Editörler: Mishra R.K., Thomas S., Kalarikkal N., *Micro and Nano Fibrillar Composites (MFCs and NFCs) from Polymer Blends*, 1st ed., Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering, Kerala, 27-55.
- Niaounakis M., 2015, *Blending*, Editörler: Ebnesajjad S., *Biopolymers: Processing and Product*, 1st ed., Elsevier, Waltham, 117-185.
- Park DH, Kim MS, Yang JH, Lee DJ, Kim KN, Hong BK, and Kim WN 2011. Rheological and thermal properties of polyamide 6 and polyamide 6/glass fiber composite with repeated extrusion. *Macromol. Res.*, 19:105.
- Peacock A.J., Calhoun A., 2006, *Polymer Chemistry: Properties and Application*, 1st ed., Cincinnati.
- Reddy N, Nama D, Yang Y 2008, Polypropylene-Based Biocomposites and Bionanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.*, 93: 233.
- Wang Y. and Hillmyer MA., 2001, Polyethylene/poly(lactide) diblock copolymers: Synthesis and compatibilization of poly(lactide)/polyethylene blends. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 39: 2755.

## Akvaryum koşullarında *Anubias barteri* Schott'un gelişiminin izlenmesi

Muhammet Dogan, Kubra Ugur\*

\*Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi , Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

\*Corresponding author e-mail: kubraugur001@gmail.com

### Özet

Günümüzde akvaryum sektörü önemli bir endüstri kolu haline gelmiştir. Bu sektörün iki önemli bileşeni balık ve bitkidir. Bu çalışmada, akvaryumlarda süs amaçlı yaygın kullanılan *Anubias barteri* Schott'nin akvaryumdaki gelişimi incelenmiştir. *A. barteri* özellikle yüksek akvaryumların dizaynlarında vazgeçilmez bir türüdür. Yaklaşık 7-10 cm uzunluklarında *A. barteri* bitkileri akvaryumun aktarılmıştır. Bitkinin gövdesi akvaryum içerisinde kuma gömülmemiştir. Bitkilerin rizomları dipteki kayalara tutturulmuştur. Yüksek (5000 lüks) ve düşük ışık (1000 lüks) seviyelerinde dört ay bekletilmiştir. İki ay sonunda yüksek ışık altındaki *A. barteri*'lerin yapraklarında sararmalar görülmüştür. Özellikle yeni çıkan yapraklarda sararmalar daha fazlaydı. Ayrıca yüksek ışık altında bitkilerin yapraklarında yosunlaşmalar tespit edilmiştir. Bu yosunlar yaprak üzerinde noktasal olarak gözlenmiştir. Düşük ışık yoğunluğu altında ise *A. barteri*'ler daha hızlı bir gelişim göstermiştir ve yapraklarda yosunlaşmalar gözlenmemiştir. Bitkilerin rizomları nispeten hızlı bir gelişim gösterirken, yaprakları ve sürgünleri yavaş bir gelişim göstermiştir. Gelişen ve büyüyen bitkiler akvaryumda beyaz renkli çiçek açmıştır. Çiçekler ana gövdeye çiçek sapı ile bağlı olarak çıkmıştır. Özetle bu çalışma, akvaryum sektörü için önemli bir tür olan *A. barteri*'nin akvaryumdaki davranışını sunmuştur. Bu çalışma, hobi amaçlı bu bitkiyi üretmek isteyenlere veya akvaryum sektörü ile uğraşanlara yardımcı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *A. barteri* , akvaryum, rizom, ışık

### Monitoring the development of *Anubias barteri* Schott under aquarium conditions

#### Abstract

Today, the aquarium sector has become an important industry branch. Two important components of this sector are fish and plants. In this study, the development of *Anubias barteri* Schott which was widely used as ornament in aquariums was examined. *A. barteri* is an indispensable species especially in the design of high aquariums. *A. barteri* plants about 7-10 cm in length were transferred to the aquarium. The body of the plant was not buried in the sand in the aquarium. The rhizomes of the plants were attached to the rocks at the bottom. High (5000 lux) and low light (1000 lux) levels were kept for four month. After four month, the leaves of *A. barteri* under high light showed yellowing. Yellowing was more frequent, especially in newly emerging leaves. In addition, mosses were detected in the leaves of plants under high light. These mosses were observed on the leaf as spots. Under low light intensity, *A. barteri* showed a faster growth and no moss formation was observed in the leaves. The rhizomes of the plants showed a relatively rapid development, while the leaves and shoots showed a slow development. Developing and growing plants have blossomed white in the aquarium. The flowers were attached to the main stem with a flower stem. In summary, this study presents the behavior of *A. barteri*, an important species for the aquarium sector, in the aquarium. This study can help those who want to produce this plant for hobby purposes or those interested in the aquarium sector.

**Keywords:** *A. barteri*, aquarium, rhizome, light

## GİRİŞ

Sucul bitkilerin süs amaçlı olarak akvaryumlarda yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Yalnızca ABD'de 11 milyondan fazla akvaryum hobicisi var. Bunların çoğu posta siparişi ile veya internet üzerinden akvaryum bitkilerin temin etmektedir. Temin edilebilen akvaryum ve su süs bitkileri dünya çapında 25 yılda 25 milyar dolarlık endüstriyi destekliyor (Kay ve Hoyle, 2001).

Su bitkilerinin önemini aşağıda kısaca verilmiştir (Cirik ve ark., 2011).

- Su bitkileri, klorofilleri sayesinde su ve suda eriyik halde bulunan karbondioksiti ve ışık enerjisini kullanarak fotosentez olayı sonucunda organik madde ve oksijen üretirler.
- Su bitkileri sucul ortamda bitkisel protein kaynaklarını oluşturduklarından dolayı besin zincirinin ilk halkasıdır. Bu bitkiler daha sonra gıda zincirinde hayvansal proteine dönüştükleri için çok önemlidir.
- Su bitkileri patojen bakterilerin ortamdan uzaklaştırılmalarında rol alırlar. Patojen bakteriler yaşamak için asidik ortamları tercih ederler.
- Su bitkileri, suyun sertliğini ayarlayarak yumuşak sularda yaşayan canlılar için yaşam ortamı oluştururlar
- Bazı su bitkileri insan gıdası olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan sucul bitkilerden biri pirinçtir. Uzak Doğu'da su kestanesi yetiştiriciliği yapılmaktadır.
- Bazı su bitkileri çiftlik hayvanlarının yemi olarak kullanılmaktadır. Bu bitkiler protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineralleri yeterli düzeyde içermelerinden dolayı çiftlik hayvanları için iyi bir besin kaynağını oluştururlar

Tatlı su bitkilerini yetiştirme teknikleri eşeyli ve eşeysiz olmak üzere ikiye ayrılır. Eşeyli üretimde yapay polenleme ve tohumla üretimden yararlanılmaktadır. Yapay polenleme, kendini döleyemeyen türlerde uygulanan bir yöntemdir. Diğer üretim şekli eşeysiz üretimdir. Bu yöntem ticari olarak en yaygın kullanılan yöntemdir. Çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Örneğin; ana bitkiden kesilen parçaların toprağa dikilmesiyle, rizoma sahip bazı su bitkilerinde, rizomlar üzerinde yeni çıkan bitkilerin kesilip toprağa aktarılmasıyla ve çiçek açmayan bazı su bitkilerinde ana bitkinin yapraklarından yeni bitkilerin gelişmesiyle (Cirik ark., 2011).

Bunların yanında bir diğer üretim yöntemi bitki doku kültürü teknikleridir. *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson (Dogan, 2019a) ve *Ceratophyllum demersum* L. (Dogan, 2019b) gibi birçok sucul bitkinin doku kültürü ile üretimi bildirilmiştir.

*Anubias barteri* Schott, sürünen bir rizomdan çıkan morfolojik olarak değişken yaprakları olan çok yıllık bir su bitkisidir. Su yollarının kenarındaki nemli ve gölgeli bölgelerde, kayalarda yetişir (Crusio, 1979). Bu türün akvaryum ticaretindeki popülerliğine rağmen, üreme ve dağılık biyoloji ile ilgili yönlerini de içeren ekolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir (Martin ve Coetzee, 2011).

Bu çalışma, akvaryum sektörü için önemli bir tür olan *A. barteri*'nin akvaryumdaki davranışını sunmuştur. Bu çalışma, hobi amaçlı bu bitkiyi üretmek isteyenlere veya akvaryum sektörü ile uğraşanlara yardımcı olabilir.

## MATERYAL ve METOD

*A. barteri* İstanbul'da (Türkiye) bulunan akvaryumculardan temin edilmiştir. Bitkiler akvaryuma koyulmadan önce akvaryum iç dizaynı ve ekipmanları yerleştirilmiştir. Denemelerde özdeş iki akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumların su seviyeleri ve sıcaklıkları (24 °C) aynı tutulurken, ışık yoğunlukları farklı olarak dizayn edilmiştir. Akvaryumlardan birine 1000 lüks ışık yerleştirilirken, diğerine 5000 lüks ışık yerleştirilmiştir.

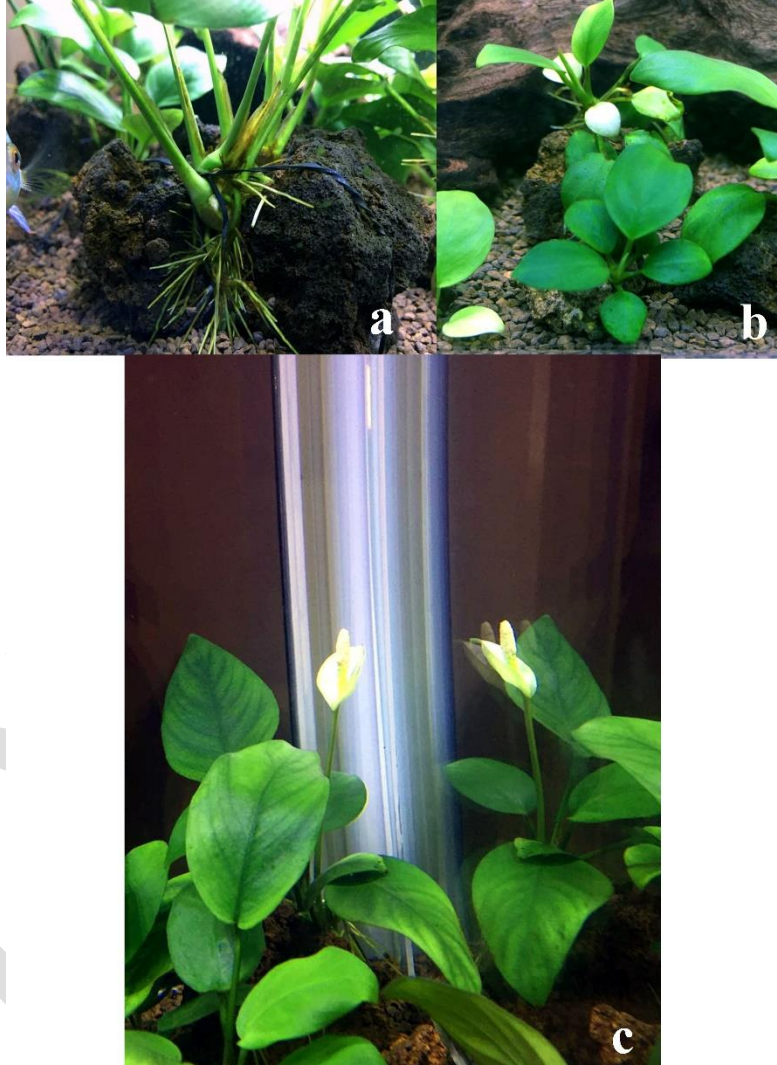
Bitkiler akvaryumcudan alındıktan sonra üzerindeki kalıtlardan ve yıpranmış yapılardan uzaklaştırılması için akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir (1 saat). Ardından iki hafta süre ile %10'luk Hoagland besin eriği formülleri bulunan su ortamına aktarılmıştır. Yaklaşık 7-10 cm uzunluklarında *A. barteri* bitkileri akvaryumun aktarılmıştır. Bitkinin gövdesi akvaryum içerisinde kuma gömülmemiştir. Bitkilerin rizomları dipteki kayalara tutturulmuştur. Dört ay boyunca gelişimleri izlenmiştir.



## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma, *A. barteri*'nin akvaryumdaki gelişimi incelenmiştir. Bitkiler akvaryuma rizomların ile tutturularak yerleştirilmiştir (Şekil 1a,b). Akvaryuma yerleştirilen bitkiler yüksek (5000 lüks) ve düşük ışık (1000 lüks) seviyelerinde dört ay bekletilmiştir. İki ay sonunda yüksek ışık altındaki *A. barteri*'lerin yapraklarında özellikle de yeni çıkan yapraklarında sararmalar tespit edilmiştir. Yüksek ışık nedeniyle *A. barteri* bitkilerinin yapraklarında siyah noktasal yosunlaşmalar gözlenmiştir. *A. barteri* bitkileri nispeten yavaş bir gelişim göstermiştir.

Düşük ışık yoğunluğu altında ise *A. barteri*'ler daha hızlı bir gelişim göstermiştir ve yapraklarda yosunlaşmalar gözlenmemiştir. Bitkilerin rizomları nispeten hızlı bir gelişim gösterirken, yaprakları ve sürgünleri yavaş bir gelişim göstermiştir.



Şekil 1. Akvaryuma tuturulan bitkiler (a, b) ve akvaryumda çiçek açan bitkiler (c).

Akvaryum koşullarında *A. barteri*'lerin bazıları beyaz renkli çiçek açmıştır (Şekil 1c). Çiçekler ana gövdeye çiçek sapı ile bağlı olarak çıkmıştır. Bu çalışma, hobi amaçlı bu bitkiyi üretmek isteyenlere veya akvaryum sektörü ile uğraşanlara yardımcı olabilir.

## KAYNAKLAR

- Cirik Ş, Cirik S, Conk-Dalay M 2011. Su Bitkileri II (İçsu Bitkilerinin Biyolojisi, Ekolojisi, Yetiştirme Teknikleri). E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, No:61, 4-150 s, İzmir.
- Crusio W 1979. A revision of *Anubias* Schott (Araceae), (Primitiae Africanae XII). Meded. Landbouwhogeschool Wageningen 79(14):1-48.

- Dogan M 2019a. The effects of different agar concentrations and light emitting diodes on *in vitro* shoot regeneration of *Hygrophila polysperma* (Roxb.) T. Anderson. Fresenius Environmental Bulletin, 28(7): 5382-5389.
- Dogan M 2019b. Multiple Shoot Regeneration Via Indirect Organogenesis from Shoot Tip and Nodal Meristem Explants of *Ceratophyllum demersum* L. Journal of Animal and Plant Sciences, 29 (2): 568-577.
- Kanchanapoom K, Chunui P, Kanchanapoom K 2012. Micropropagation of *Anubias barteri* var. Nana from shoot tip culture and the analysis of ploidy stability. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 40(2):148- 151.
- Kay S, Hoyle S 2001. Mail order, the internet, and invasive aquatic weeds. J Aquat Plant Manage. 39: 88– 91.
- Martin GD, Coetzee JA 2011. Pet stores, aquarists and the internet trade as modes of introduction and spread of invasive macrophytes in South Africa. Water Sa 37(3):371-380.

DRAFT

## Kallus ve Bitki Doku Kültüründeki Önemi

Muhammet Dogan, Merve Şifa Hane Köse\*

\*Karamanoglu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

\*Corresponding author e-mail: mervesifahane@gmail.com

### Özet

Aseptik koşullarda bitkinin doku, hücre veya organlarının çeşitli besin ortamlarında kültüre alınması ve onlardan yeni hücreler, dokular, organlar, yeni bitkiler veya bitkisel ürünlerin üretilmesi işlemlerine bitki doku kültürü denilmektedir. Kalluslar farklılaşmamış hücreler yığıdır ve farklı bitki doku veya parçalarının (tohum, node, tomurcuk, yapraklar, meristem ve kök uçları vb.) spesifik büyüme düzenleyicilerini içeren kültür ortamında inkübasyonu ile elde edilir. Başarılı kallus oluşumu genotipe ve büyüme düzenleyicilerine bağlıdır. Kallus, yakın özelliklere sahip parankima hücrelerinden oluşmakla birlikte bileşim açısından heterojen bir dokudur. Kalluslar, dış kaynaklı büyüme düzenleyicileri tarafından indüklenerek yeni rejenerasyonun oluşmasına yardımcı olurlar. Kallus yolu ile üretim embriyo ve sürgün ucu ile üretim gibi doku kültürü tekniklerinde kullanılan önemli çoğaltma yöntemleridir. Bitki doku kültürü çalışmalarında kallus kültürleri çoklu sürgün rejenerasyonu, çeşitli sekonder metabolit eldesi ve gen aktarımı gibi birçok çalışmada kullanılmaktadır. Kallus yapıları küçük parçalara ayrılabilirliği özellikleri ile hücre süspansiyon kültürleri için tercih nedenidir. Kalluslardan bitki rejenerasyonu, organogenezis veya somatik embriyogenezis ile mümkündür. Kallus kültürleri ayrıca sınırlı bitki materyalinin amplifikasyonunu kolaylaştırır. Kalluslar, somatik hücrelerde var olan bir genetik değişkenlik, çevresel kaynaklı mutasyonlar, kromozom sapmaları ve epigenetik değişiklikler nedeniyle ortaya çıkan somaklonal varyantların izolasyonuna izin verir. Tüm bunların yanında kallus kültürleri, sekonder metabolitlerin üretilmesi konusunda önemli avantajlara sahiptir sistemlerdir. Bu derleme raporda, kallus ve bitki doku kültüründe kallusun önemi değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kallus, farklılaşma, organogenezis, sürgün rejenerasyonu

### Callus and Its Importance in Plant Tissue Culture

#### Abstract

The process of culturing the tissue, cells or organs of the plant under aseptic conditions in various nutrient media and producing new cells, tissues, organs, new plants or plant products from them is called plant tissue culture. Calluses are a pile of undifferentiated cells and are obtained by incubation of different plant tissues or fragments (seed, node, bud, leaves, meristem and root tips, etc.) in culture medium containing specific growth regulators. Successful callus formation depends on genotype and growth regulators. Callus is composed of parenchyma cells with similar properties but is heterogeneous in composition. Calluses are induced by exogenous growth regulators to help form new regenerated shoots. Callus production is an important propagation method used in tissue culture techniques such as embryo and shoot tip production. In plant tissue culture studies, callus cultures are used in many studies such as multiple shoot regeneration, various secondary metabolite production and gene transfer. Callus structures are the preferred cause for cell suspension cultures with their small disintegration properties. Plant regeneration from calluses is possible by organogenesis or somatic embryogenesis. Callus cultures also facilitate amplification of limited plant material. Calluses allow the isolation of somaclonal variants due to genetic variability, environmental mutations, chromosomal aberrations and epigenetic changes in somatic cells. In this review report, callus and the importance of callus in plant tissue culture was evaluated.

**Keywords :** Callus, differentiation, organogenesis, shoot regeneration

## GİRİŞ

Hücre farklılaşması için yüksek plastisiteye sahip olmak, bitki hücrelerinin genel bir özelliğidir. Bitkiler, yaralanma veya patojen enfeksiyonu gibi strese cevap olarak, kallus veya tümörler gibi örgütlenmemiş hücre kütleleri oluşturur. Bazı ağaçlarda kallus oluşumu 200 yıldan daha uzun bir süre önce tanımlanmıştır (Neely, 1979).

"Kallus" terimi, zor anlamına gelen Latince "callum" kelimesinden gelir ve tıpta dermal dokunun kalınlaşması anlamına gelir. Bitki biyolojisinin ilk zamanlarında "Kallus", hücrelerin büyümesi ve yaralanmayla ilişkili kalloz birikimi anlamına gelmekteydi. Bugün aynı kelime daha geniş bir şekilde kullanılıyor ve düzensiz hücre kitlelerine topluca kallus deniyor. Kallus, tek bir farklılaşmış hücreden üretilebilir ve birçok kallus hücresi, tüm bitki gövdesini yeniden oluşturabilme özelliğine sahiptir (totipotent) (Steward ve ark., 1958; Nagata ve Takebe, 1971). Belirli koşullar altında, kallus hücreleri aynı zamanda erişkin somatik hücrelerden embriyoların üretildiği bir işlem olan somatik embriyogeneze maruz kalır (Steward ve ark., 1958). Bu nedenle, en azından bazı kallus oluşum biçimlerinin, hücre diferensiyasyonunu içerdiği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, kallusların çok çeşitli olduğu ve makroskopik özelliklerine göre alt gruplara ayrılabilceği kabul edilmiştir. Örneğin, belirgin organ rejenerasyonu olmayan kalluslar tipik olarak gevşek veya kompakt kallus olarak adlandırılır. Bazı organ rejenerasyon derecelerini gösteren diğer kalluslar, ürettikleri organlara bağlı olarak kök, sürgün veya embriyonik kallus olarak adlandırılır (Zimmerman, 1993; Frank ve ark., 2000). *Arabidopsis thaliana*'daki farklı kallus türlerinin farklı gen ekspresyon profillerine sahip olduğu da bilinmektedir (Iwase ve ark., 2011). Bu nedenle, kallus terimi, farklı derecelerde farklılaşma derecelerine sahip hücreleri içerir.

Çığır açan kallusun yapay olarak *in vitro* olarak üretilebildiğinin keşfedilmesinden sonra (Gautheret, 1939; White, 1939) ve iki bitki hormonu, auxin ve sitokinin arasındaki dengenin farklılaşma ve ayrılma durumundan sonra (Skoog ve Miller, 1957) kallus, hem temel araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmıştır (Bourgaud ve ark., 2001).

Bu derleme çalışmada, bitki doku kültürü tekniklerinde kallusun yeri ve kallus ile yapılan bazı çalışmalar raporlaştırılmıştır.

## ***İN VİTRO* KÜLTÜR KOŞULLARI ALTINDA OLUŞTURULAN KALLUSLAR**

Kallus, bitkilerin farklı kısımlarının aseptik şartlarda kültürlenmesi ile meydana gelen farklılaşmamış hücre topluluğudur. Kallus oluşumu için çoğunlukla kök, kotiledon, hipokotil, yaprak damarı, embriyo ve gövde parçaları tercih edilmektedir. Ayrıca kallusun üretim miktarı kültürün süresine ve ışık yoğunluğuna göre de değişebilir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Yağcı ve ark., 2008).

Oksin ve sitokininlerin eksojen uygulaması, çeşitli bitki türlerinde kallusu indükler. Genel olarak konuşursak, oksin ve sitokininin orta bir seviyesi kallus indüksiyonunu arttırırken, oksinin veya sitokininin yüksek bir oranı sırasıyla kök ve sürgün rejenerasyonunu indükler (Skoog ve Miller, 1957). Bu rejenerasyon sisteminin keşfedilmesinden bu yana, örneğin ekonomik açıdan önemli özelliklerin yayılmasında ve transgenlerin kullanılmasında yaygın olarak kullanılmıştır.

Brassinosteroidler veya abisik asidi gibi diğer hormonlar da kallusu indükler ve bazı türlerde kallus oluşumunda oksin veya sitokinin yerini alabilir (Goren ve ark., 1979). Bununla birlikte, oksin ve sitokinin, kallus formasyonu ve daha sonra organ rejenerasyonu bağlamında en yaygın kullanılan ve çalışılan hormonlardır.

*In vitro* kallus üretim çalışmaları genellikle, somatik embriyogenez, indirekt organogenez, hücre süspansiyon kültür çalışmalarında ve özellikle sekonder metabolit üretiminde yararlanılmaktadır. Bunların yanı sıra, bitkilerin tüm yıl süresince çoklu üretimi için kallus kültürlerinden yararlanılmaktadır (Aktaş ve Çölgeçen, 2017; Erdemen ve Aygün, 2016)

## DOKU KÜLTÜRÜNDE KALLUS İLE İLGİLİ YÜRÜTÜLEN BAZI ÇALIŞMALAR

Jan ve ark (2014) *Ajuga bracteosa* Wall ex. Benth'in farklı eksplantlarını ile kallustan rejenere bitkiler elde etmeyi amaçlamıştır. En fazla kallus indüksiyonu yaprak eksplantlarında 5.0 mg/L BAP, petiyol eksplantlarında 2.0 mg/L BAP + 3.0 mg/L IAA ve internodal eksplantlarda 2.0 mg/L BAP + 5.0 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında tespit etmiştir.

Sahakyan ve ark. (2016), *A. genevensis*'in yaprak ve kök eksplantlarını 0.2 mg/L -1 Kin ve 2 mg/L -1 IAA 2 mg/L-1 glisin bulunan MS besi ortamında kültüre alarak kallus elde etmişlerdir. Elde ettiği kalluslar ile doğal ortamdaki bitkilerin biyolojik aktivitelerini ve kimyasal içeriğini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak; hem yaprak hemde kök orjinli kallus dokusunun doğal ortamdaki bitkilerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Abu Bakar ve ark. (2019), *Phyla nodiflora* (L.) Greene'de etkin *in vitro* callus indüksiyonu ve mikro çoğaltılması için bir altyapı ve protokol geliştirmişleridir. Kallus indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonu, oksin ve sitokinin tek veya kombinasyonları ile desteklenmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı üzerinde yaprak ve kök eksplantlarının kültürlenmesiyle elde edilmiştir. Bu bitki büyüme düzenleyicileri naftalenetik asit (NAA), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4D), indol-3-asetik asit (IAA), indol-3-bütirik asit (IBA) ve benziladen (BA), kinetindir (KN). Tekli bitki büyüme düzenleyicileri üzerindeki maksimum %92.5 kallus tepkisi, açık yeşil gevrek kallus ile 2.5 mg/L NAA (118.6 mg/L), % 90.0 yeşil kompakt kallus ile 2.0 mg/L BA'dan (42.0 mg/L) ve % 89.2 yeşil kompakt ve kırılğan kallus ile 3.0 mg/L NAA: 2.0 mg/L KN kombinasyonundan ve yeşil kompakt kallus ile 2.5 mg/L IBA:1.0 mg/L BA (139.6 mg/L) kombinasyonundan elde edilmiştir. En yüksek sürgün rejenerasyonu yüzdesi (%90), bitki büyüme düzenleyicileri olmayan MS ortamından belirlenmiştir.

Anum ve ark. (2019) bu çalışmada, gümüş nanoparçacıklar (AgNP), *Olea europea*'nın yaprakları kullanılarak yeşil yöntemle sentezlenmiş ve sentezlenen AgNP'ler, UV görünür spektroskopi, SEM ve enerji dağıtıcı X-ışını ile karakterize etmişlerdir. Ardından *Citrus reticulata*'nın kallus kültüründe gelişme ve ikincil metabolitlerin üretimini incelemek için MS ortamına Thidiazuron (0.5, 1.0 m L) ile birlikte farklı AgNP konsantrasyonları (10, 20, 30 ppm) ilave edilmiştir. Kallus indüksiyon yüzdesi (% 96), 20 ppm AgNP'ler ve 1 mg/L TDZ konsantrasyonunda daha fazla çıkmıştır. Ayrıca, yüksek toplam fenolik, flavonoid içerikleri ve antioksidan aktivitesi 20 ppm AgNP'lerde, 0.5 ve 1 mg/L TDZ kombinasyonunda gözlenmiştir. Toplam protein içeriği (TPC), sadece TDZ ile muamele edilen kallus kültürlerinde anlamlı çıkmıştır.

Dogan (2019) Lythraceae familyasına ait tıbbi sucul bir bitki olan *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb.) Koehne'nin tam yaprak, yaprak üst yarısı ve yaprak alt yarısı eksplantlarından *in vitro* kallus oluşumu üzerine 0,05-1,25 mg/L Giberellik asit (GA<sub>3</sub>) ve 0,25 mg/L Thidiazuron (TDZ) kombinasyonunun etkisini araştırmıştır. Tam yaprak, üst yaprak ve alt yaprak eksplantlarından kallus oluşturma oranı (%100) sırasıyla 0,25 mg/L GA<sub>3</sub> ve 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında, 0,05 ve 0,25 mg/L GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında ve 0,05 mg/L GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında elde edilmiştir. GA<sub>3</sub>'yü düşük konsantrasyonlarda içeren kültür ortamlarında daha fazla kallus yoğunluğu kaydedilmiştir. En kısa kallus oluşturma süresi 0,25 mg/L GA<sub>3</sub> + 0,25 mg/L TDZ içeren MS ortamında yaprak eksplantlarında ve 10. günde belirlenmiştir.

Ricco ve ark. (2019) *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh'nin embriyolarından kallus oluşumu için kültüre almışlardır. Embriyolardan (%85) en yüksek kallus oluşma sıklığı, %4 sukroz ve 2.5 mu M 1-naftalen asetik asit ve 9.2 uM kinetin içeren White besin ortamında elde edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi, kallus metanolik ekstraktının yabani bitkilere kıyasla daha düşük flavonoid ve proantosiyenin içeriğine sahip olduğunu gösterirken hidrokisisamik asit olarak yüksek içeriğe sahip olduğunu göstermiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (HPLC-MS / MS), hem ana bitkiden hem de embriyodan elde edilen kallustan metanolik özütlerde kersetin glikozitleri ve fenolik asitlerin varlığını göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Abu Bakar D, Veeramohan R, Ahmed ABA, Baron NW, Mat-Taha R 2019. Ultrastructure, callus induction and micropropagation of *Phyla nodiflora* (L.) Greene. Pakistan Journal of Botany, 51(5): 1695-1702.
- Aktaş T, Çölgeçen H 2017, Farklı Bitki Türlerinden Bitki Doku Kültürü Teknikleriyle Flavonoidlerin Üretimi, Kara elmas Fen ve Müh. Dergisi, 7(2): 665- 673.
- Anum F, Raja NI, Hussain M, Iqbal M, Chaudhari SK, Ehsan M, Javaid U 2019. Effect of green synthesised silver nanoparticles on morphogenic and biochemical variations in callus cultures of kinnow mandarin (*Citrus reticulata* L.). IET Nanobiotechnology, 13(5): 541-545.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E, 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. Plant Sci. 161: 839-851.
- Dogan M 2019. Callus Formation from Full Leaf and Leaf Parts of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. Acta Biologica Turcica, 32(2): 78-83.
- Erdemen BH, Aygün A 2016. Bazı *Prunus Spp* Türlerinin Tohumlarından Kallus Kütürlerinin Oluşturulması. Akademik Ziraat Dergisi 5(1): 9-12.
- Frank M, Rupp HM, Prinsen E, Motyka V, Van Onckelen H, Schmülling T 2000. Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of *Arabidopsis* with altered cytokinin and auxin content or signaling. Plant Physiol. 122: 721-729.
- Gautheret R 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. C. R. Soc. Biol. Paris 208: 118-120.
- Goren R, Altman A, Giladi I 1979. Role of ethylene in abscisic acid-induced callus formation in *Citrus* bud cultures. Plant Physiol. 63: 280-282.
- Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K, Kojima M, Arai T, Inoue Y, Seki M, Sakakibara H, Sugimoto K, Ohme-Takagi M. 2011. The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. Curr. Biol. 21: 508-514.
- Jan M, Singh S, Kaloo ZA, Maqbool F 2014. Callus induction and multiple shoot regeneration in *Ajuga bracteosa* Wall. ex Benth.-an important medicinal plant growing in Kashmir Himalaya. J Sci Innov Res 3: 319-324.
- Nagata T, Takebe I 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta 99: 12-20.
- Neely D 1979. Tree wounds and wound closure. J. Arboriculture 5: 135-140.
- Ramachandra RS, Ravishankar GA 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101-153.
- Ricco MV, Bari ML, Bagnato F, Cornacchioli C, Laguia-Becher M, Spairani LU ve ark. 2019. Establishment of callus-cultures of the *Argentinean mistletoe*, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) and screening of their polyphenolic content. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 138(1): 167-180.
- Sahakyan N, Petrosyan M, Trchounian A 2016. Comparative analysis of chemical composition and biological activities of *Ajuga genevensis* L. in *in vitro* culture and intact plants. Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng 10: 322-326.
- Skoog F, Miller CO 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K, 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 705-708.
- White PR 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Am. J. Bot. 26: 59-64.
- Yağcı C, Toker MC, Toker G 2008. Bitki doku kültürü yoluyla üretilen flavonoidler, Türk Bilimsel Derlemler Dergisi, 1(1): 47-58.
- Zimmerman JL 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. Plant Cell 5: 1411-1423.

## Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/calcium carbonate composite film

Özge Bildi Ceran<sup>1</sup>, Barış Şimşek<sup>1\*</sup>, Osman Nuri Şara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Çankırı, Turkey.

<sup>2</sup>Bursa Technical University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Chemical Engineering, Bursa, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: bsimsek@karatekin.edu.tr

### Abstract

Calcium carbonate is widely used as a filler material both in plastics and in the pharmaceutical industry in recent years. In this study, the synthesis and characterization of calcium carbonate reinforced polyvinyl alcohol composite film is provided. The synthesized composite film was characterized by FTIR and UV-VIS spectroscopy, the properties of the film were determined by measuring pH and film thickness. Finally, the morphology of the composite film was analyzed by optical microscope. The results show that the polyvinyl alcohol/calcium carbonate composite film was successfully synthesized. According to the results of the optical microscope the calcium carbonate was homogeneously dispersed into the film matrix.

**Keywords:** Composite films, calcium carbonate, polyvinyl alcohol.

### INTRODUCTION

The preparation of composites reinforced with fillers attracts great interest due to their wide application areas. In addition, obtained of strong composites with the use of safe, eco-friendly, easily accessible and easily manufactured components with active functional groups is an important issue for eco-friendly production (Yang, Park, and Park 2019). The use of polyvinyl alcohol (PVA) as a polymer matrix in the production of composite materials is a popular choice due to its biological compatibility (Kaler, Pandel, and Duchaniya 2018), excellent chemical and physical properties (Mohamed, Heiba, and Imam 2018), thermal and chemical stability (Afrashi et al. 2019). At the same time, low-cost, easy-to-prepare, non-carcinogenic, film forming ability and high film flexibility make PVA an excellent host material for composite production (Karthikeyan et al. 2019; Das, Uppaluri, and Das 2019).

Nano or micro scale fillers are more preferred to enhance the functional performance of film based composite materials. In recent years, researchers have focused on composites which has been to design better quality products using less material with nano or micro scale fillers (Hebbar et al. 2019). Structure of PVA contains plenty of reactive hydroxyl groups. This makes PVA easy good distribution of fillers and thus, homogeneous composite films are obtained (Kaler, Pandel, and Duchaniya 2018).

Considering the various fillers, calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) is one of the most widely used fillers due to its low cost and eco-friendly (Aliotta et al. 2019). It is commonly found in living organisms such as sea shell, coral and sea urchin backbone, egg shells and shells of rocks. Calcium carbonate which is a natural substance, has thermally stable, non-toxic, pH sensitive, biocompatible and a good distribution in aqueous solutions (Wang et al. 2015; Elsayed, Zada, and Allam 2019; Yang, Park, and Park 2019). Due to these advantages, CaCO<sub>3</sub> has a significant potential as a filler for various applications such as paper, paint, plastics, rubber, pharmaceuticals, food, ceramics and biological (Feng, Wu, and Qing 2016; Zhou et al. 2016; Yaseen, Yiseen, and Li 2018). Studies in the literature, have demonstrated the importance of using micro size CaCO<sub>3</sub> in polymer matrices such as acrylonitrile-butadiene-styrene (Sudeepan et al. 2014), polypropylene (Zhu et al. 2014; Oladele et al. 2019), polyvinyl alcohol (Cao, Xie, and Guan 2019) for the development of mechanical, thermal and rheological properties and in biopolymer matrices such as poly (lactic acid) (Nekhamanurak, Patanathabutr, and Hongsrphan 2014), cellulose (Ma et al. 2012), chitosan (Tanimoto, Nishii, and Kanaoka 2019), starch (Cheng 2019) for tissue engineering, packaging applications and drug delivery.

In the light of this information, in this study CaCO<sub>3</sub> reinforced PVA composite film was synthesized and characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and UV-VIS spectroscopy. The surface image was evaluated by optical microscope image and finally the pH and film thickness were measured.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Polyvinyl alcohol (Mw ~ 125,000 and 8.0-98.8 mol% hydrolysis) and calcium carbonate (precipitated for analysis) were obtained from Merck Millipore.

### Characterization of PVA/CaCO<sub>3</sub> Composite Film

The chemical structure of the composite was investigated by FTIR spectroscopy. In the analysis, Bruker Tensor II device with a wavelength range of 400 to 4000 cm<sup>-1</sup> was used. The optical transmittance of the composite was recorded with the UV-VIS spectrophotometer in the wavelength range of 200 nm to 800 nm. Surface image of the composite film was obtained using the Nikon SMZ800 stereoscopic zoom microscope. pH value and film thickness were measured with Thermo Scientific Orion device and digital micrometer, respectively.

### Synthesis of PVA/CaCO<sub>3</sub> Composite Film

24 mg CaCO<sub>3</sub> is added in 20 ml deionized water and allowed to mix in ultrasonic bath for 3 hours. 1,2 g PVA is dissolved in 40 ml deionized water at 80°C for 1 hour in a magnetic stirrer. The stirred CaCO<sub>3</sub> solution is added to the dissolved PVA at the end of 3 hours and after 1 drop of glycerin is added, it is allowed to mix for another 1 hour. Before the obtained composite is poured into the petri dish, the pH value is measured. Then the 20 ml of composite is poured into petri dish and allowed to dry at room temperature for 3 days. The experimental setup is shown in Figure 1.



Figure 1. Experimental setup a) pH meter, b) composite film

## RESULTS AND DISCUSSION

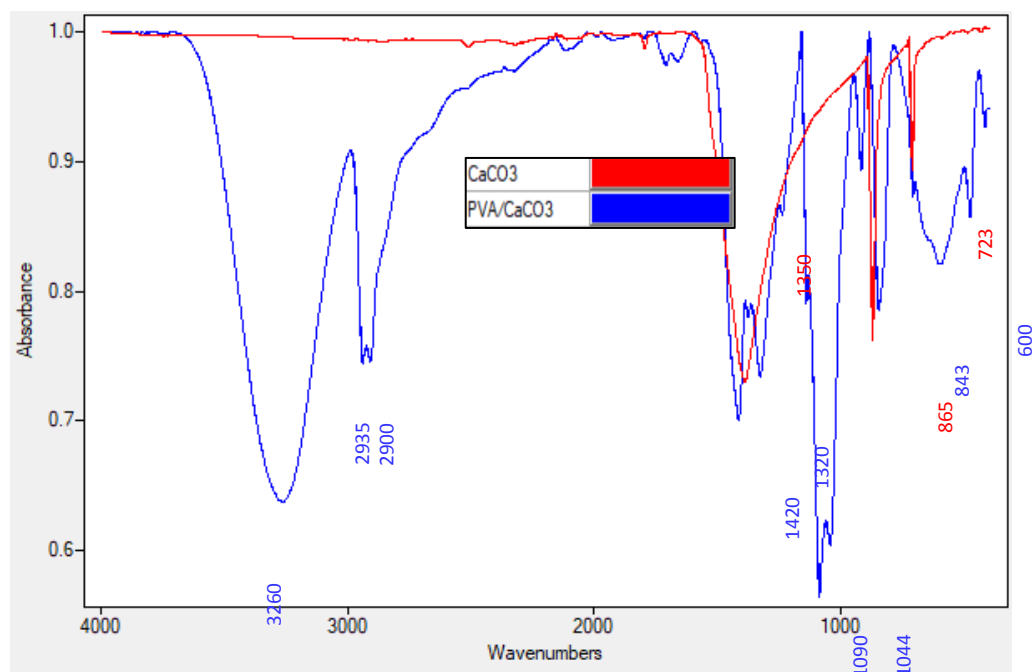
### pH and Film Thickness

The pH value of PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film was measured 8,47 using pH meter. In addition, film thicknesses were measured at 5 points of the surface and the average thickness was calculated as 75.2 μm.

### FTIR Characterization

The presence of functional groups in pure CaCO<sub>3</sub> and PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film were analyzed by FTIR spectroscopy (Figure 2). CaCO<sub>3</sub> exhibited characteristic bands in region of 1350, 865 and 723 cm<sup>-1</sup>. The peak located at 1350 cm<sup>-1</sup> attributed to C=O stretching vibration, the peaks located at 865 and 723 cm<sup>-1</sup> showed O-C-O stretching vibration (Mallakpour and Khadem 2017). In the FTIR spectrum of the PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film, a large and intense band was observed at 3260 cm<sup>-1</sup> depending on the presence of the hydroxyl group in the PVA chain. Moreover, peaks at 2935 and 2900 cm<sup>-1</sup> associated with C-H stretching vibration, peaks at 1420 and 1320 cm<sup>-1</sup> related to methyl group C-H stretching vibration, peaks located at 1090, 1044, 843 and 600 cm<sup>-1</sup> attributed to C-O stretching vibration, C-O-C stretching vibration and C-H stretching vibration (Mallakpour and Khadem 2017).

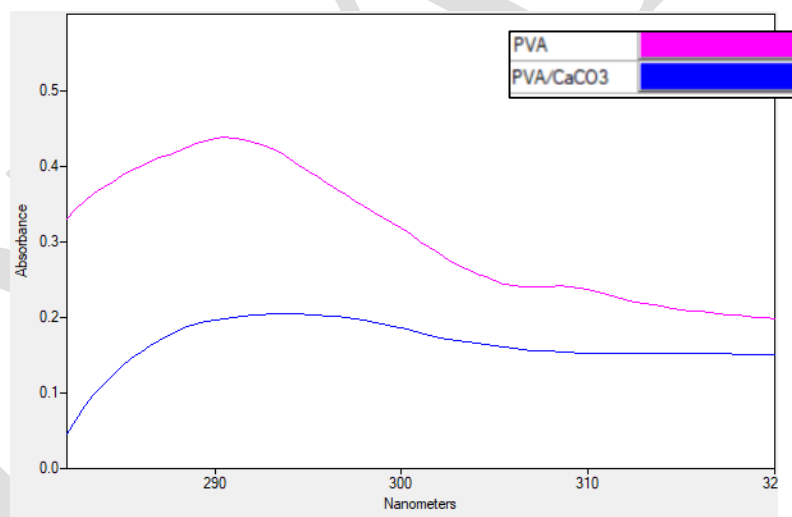




**Figure 2.** FTIR spectrum of PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film

### UV-VIS Characterization

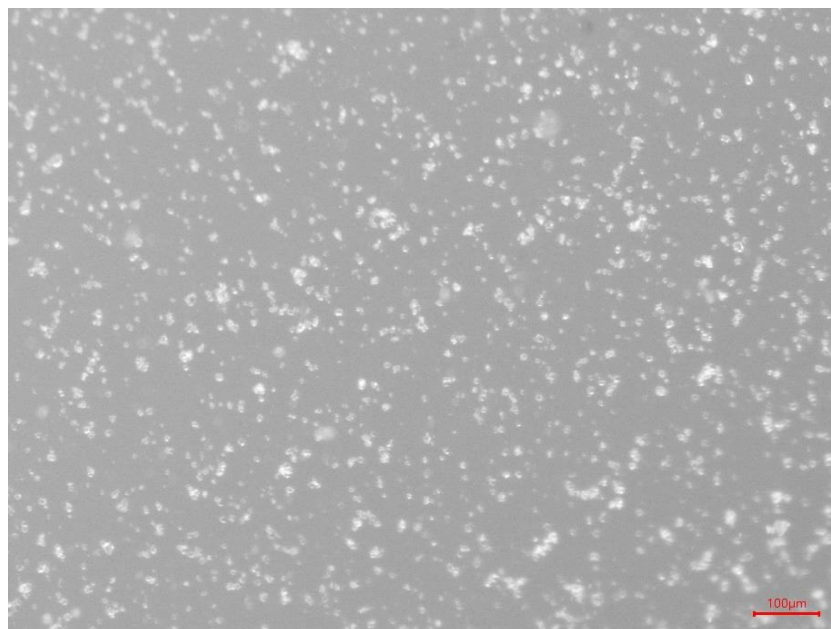
The UV-VIS spectrum showed an absorption band at the wavelength of about 300 nm (Figure 3). The addition of CaCO<sub>3</sub> decreased the absorbance intensity. It was found that the absorbance of the composite film was also reduced due to the very low absorbance of CaCO<sub>3</sub> (Tao, He, and Zhao 2015).



**Figure 3.** UV-VIS spectrum of PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film

### Morphological Analysis

Surface image of PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film obtained by optical microscope. According to the optical microscope image, it was observed that CaCO<sub>3</sub> was distributed homogeneously in PVA film and formed a compact film matrix with PVA film. (Figure 4).



**Figure 4.** Optical microscope image of PVA/CaCO<sub>3</sub> composite film

## CONCLUSION

In this study, CaCO<sub>3</sub> reinforced PVA composite film was successfully synthesized. The characterization of the synthesized composite film was carried out with FTIR and UV-VIS spectroscopy. The results showed that homogeneous and compact composite film was obtained. It was observed that CaCO<sub>3</sub> filling material dispersed in the polymer matrix without creating any clumping.

## REFERENCES

- Afrashi, Mehran, Dariush Semnani, Zahra Talebi, Parvin Dehghan, and Mehrnoosh Maherolnaghsh. 2019. 'Comparing the drug loading and release of silica aerogel and PVA nano fibers', *Journal of Non-Crystalline Solids*, 503-504: 186-93.
- Aliotta, Laura, Patrizia Cinelli, Maria Beatrice Coltelli, and Andrea Lazzeri. 2019. 'Rigid filler toughening in PLA-Calcium Carbonate composites: Effect of particle surface treatment and matrix plasticization', *European Polymer Journal*, 113: 78-88.
- Cao, Mingli, Chaopeng Xie, and Junfeng Guan. 2019. 'Fracture behavior of cement mortar reinforced by hybrid composite fiber consisting of CaCO<sub>3</sub> whiskers and PVA-steel hybrid fibers', *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 120: 172-87.
- Cheng, Wenxi. 2019. 'Preparation and properties of lignocellulosic fiber/CaCO<sub>3</sub>/thermoplastic starch composites', *Carbohydrate Polymers*, 211: 204-08.
- Das, Aritra, Ramagopal Uppaluri, and Chandan Das. 2019. 'Feasibility of poly-vinyl alcohol/starch/glycerol/citric acid composite films for wound dressing applications', *International Journal of Biological Macromolecules*, 131: 998-1007.
- Elsayed, Nihal A., Suher Zada, and Nageh K. Allam. 2019. 'Mineralization of electrospun gelatin/CaCO<sub>3</sub> composites: A new approach for dental applications', *Materials Science and Engineering: C*, 100: 655-64.
- Feng, Jianhua, Gang Wu, and Chengsong Qing. 2016. 'Biomimetic synthesis of hollow calcium carbonate with the existence of the agar matrix and bovine serum albumin', *Materials Science and Engineering: C*, 58: 409-11.
- Hebbar, Vidyashree, R. F. Bhajantri, H. B. Ravikumar, and S. Ningaraju. 2019. 'Role of free volumes in conducting properties of GO and rGO filled PVA-PEDOT:PSS composite free standing films: A positron annihilation lifetime study', *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 126: 242-56.
- Kaler, Vandana, U. Pandel, and R. K. Duchaniya. 2018. 'Development of TiO<sub>2</sub>/PVA nanocomposites for application in solar cells', *Materials Today: Proceedings*, 5: 6279-87.

- Karthikeyan, B., S. Hariharan, Arya Sasidharan, V. Gayathri, T. Arun, Ali Akbari-Fakhrabadi, and C. Madhumitha. 2019. 'Optical, vibrational and fluorescence recombination pathway properties of nano SiO<sub>2</sub>-PVA composite films', *Optical Materials*, 90: 139-44.
- Ma, Ming-Guo, Lian-Hua Fu, Run-Cang Sun, and Ning Jia. 2012. 'Compared study on the cellulose/CaCO<sub>3</sub> composites via microwave-assisted method using different cellulose types', *Carbohydrate Polymers*, 90: 309-15.
- Mallakpour, Shadpour, and Elham Khadem. 2017. 'Facile and cost-effective preparation of PVA/modified calcium carbonate nanocomposites via ultrasonic irradiation: Application in adsorption of heavy metal and oxygen permeation property', *Ultrasonics Sonochemistry*, 39: 430-38.
- Mohamed, Mohamed Bakr, Zein K. Heiba, and N. G. Imam. 2018. 'Optical and thermogravimetric analysis of Zn<sub>1-x</sub>Cu<sub>x</sub>S/PVA nanocomposite films', *Journal of Molecular Structure*, 1163: 442-48.
- Nekhamanurak, Bawornkit, Pajaera Patanathabut, and Nattakarn Hongsrirphan. 2014. 'The Influence of Micro-/Nano-CaCO<sub>3</sub> on Thermal Stability and Melt Rheology Behavior of Poly(Lactic Acid)', *Energy Procedia*, 56: 118-28.
- Oladele, Isiaka Oluwole, Ibrahim Oghie Ibrahim, Akeem Damilola Akinwekomi, and Segun Isaac Talabi. 2019. 'Effect of mercerization on the mechanical and thermal response of hybrid bagasse fiber/CaCO<sub>3</sub> reinforced polypropylene composites', *Polymer Testing*, 76: 192-98.
- Sudeepan, J., K. Kumar, T. K. Barman, and P. Sahoo. 2014. 'Study of Tribological Behavior of ABS/ CaCO<sub>3</sub> Composite Using Grey Relational Analysis', *Procedia Materials Science*, 6: 682-91.
- Tanimoto, Satoshi, Izuka Nishii, and Shokyoku Kanaoka. 2019. 'Biomimetic fabrication of chitosan/calcium carbonates core-shell type composite microparticles as a drug carrier', *International Journal of Biological Macromolecules*, 129: 659-64.
- Tao, Hong, Yangyang He, and Xu Zhao. 2015. 'Preparation and characterization of calcium carbonate–titanium dioxide core–shell (CaCO<sub>3</sub>@TiO<sub>2</sub>) nanoparticles and application in the papermaking industry', *Powder Technology*, 283: 308-14.
- Wang, Yuemeng, Anjun Liu, Ran Ye, Wenhong Wang, and Xin Li. 2015. 'Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin–calcium carbonate composite films', *Food Chemistry*, 166: 414-22.
- Yang, Guijun, Mira Park, and Soo-Jin Park. 2019. 'Recent progresses of fabrication and characterization of fibers-reinforced composites: A review', *Composites Communications*.
- Yaseen, Sarah Abduljabbar, Ghadah Abdaljabar Yiseen, and Zongjin Li. 2018. 'Synthesis of calcium carbonate in alkali solution based on graphene oxide and reduced graphene oxide', *Journal of Solid State Chemistry*, 262: 127-34.
- Zhou, Zhihang, Yanbao Li, Song Yao, and Haichen Yan. 2016. 'Preparation of calcium carbonate@graphene oxide core–shell microspheres in ethylene glycol for drug delivery', *Ceramics International*, 42: 2281-88.
- Zhu, Y. D., G. C. Allen, P. G. Jones, J. M. Adams, D. I. Gittins, P. J. Heard, and D. R. Skuse. 2014. 'Dispersion characterisation of CaCO<sub>3</sub> particles in PP/CaCO<sub>3</sub> composites', *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 60: 38-43.

## The effects of myriocin on blood pressure and vascular reactivity in DOCA-Salt hypertensive rats

Sevtap Han

Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: sevtap.han@gazi.edu.tr

### Abstract

Hypertension is one of the most prevalent cardiovascular disease with high mortality. Studies to clarify the pathogenesis of hypertension and to develop new therapeutic approaches still remain important. Ceramide is a sphingolipid that mediates many cellular functions such as proliferation, differentiation, apoptosis and inflammation. This study was set out to examine the effects of ceramide inhibitor myriocin on blood pressure and vascular responses in hypertension.

Eight-weeks old, Wistar albino male rats were used in this study. Deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension model was induced through unilateral nephrectomy, DOCA pellet implantation and adding NaCl+KCl in drinking water for 12 weeks. Myriocin administration (0.3 mg/kg, 3 day/week) was performed for the final eight weeks. Blood pressures were measured by tail-cuff method. At the end of the experiment, thoracic aortas were isolated and vascular relaxation and contraction responses were recorded.

DOCA-salt application lead to an increase in the systolic pressure and impairment in the vasorelaxation. Myriocin did not affect systolic blood pressure in the both normotensive and hypertensive rats. Myriocin-treated hypertensive rats exhibit a worsened endothelium dependent relaxation response compared to control and DOCA-salt groups. In addition, myriocin lead to reduced endothelium independent vasorelaxations in the hypertensive animals. Phenylephrine induced contractions response did not change but KCl induced vasoconstrictions were enhanced in the DOCA-salt group. Myriocin did not alter contraction responses in the hypertensive rats. These results indicate that ceramide inhibition does not have a positive effect on hypertension and vascular relaxation responses.

**Keywords:** hypertension, myriocin, ceramide, endothelial dysfunction, DOCA-salt.

### Myriocin'in DOCA-tuz hipertansif sıçanlarda kan basıncı ve damar cevapları üzerine etkisi

#### Özet

Hipertansiyon, yüksek mortaliteye sahip ve en sık görülen kardiyovasküler hastalıklardan biridir. Hipertansiyonun patogenezini aydınlatmak ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek için yapılan çalışmalar halen önemini korumaktadır. Seramid, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve inflamasyon gibi birçok hücrel fonksiyona aracılık eden bir sfingolipittir. Bu çalışma seramid inhibitörü myriocin'in hipertansiyonda kan basıncı ve vasküler yanıtlar üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

Bu çalışmada sekiz haftalık Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deoksikortikosteron asetat (DOCA)-tuz hipertansiyon modeli, tek taraflı nefrektomi, DOCA pelet implantasyonu ve 12 hafta boyunca içme suyuna NaCl + KCl eklenerek oluşturulmuştur. Myriocin uygulaması (0,3 mg / kg, 3 gün / hafta) son sekiz hafta boyunca yapılmıştır. Kan basıncı tail-cuff yöntemiyle ölçülmüştür. Deneyin sonunda torasik aortalar izole edilmiş ve vasküler gevşeme ve kasılma yanıtları kaydedilmiştir.

DOCA-tuz uygulaması, sistolik basınçta bir artışa ve damar gevşemesinde bozulmaya neden olmuştur. Myriocin, hem normotansif hem de hipertansif sıçanlarda sistolik kan basıncını etkilememiştir. Myriocin verilen hipertansif sıçanlar, kontrol ve DOCA-tuz gruplarına kıyasla daha kötü endotel bağımlı gevşeme cevabı göstermişlerdir. Ek olarak, myriocin, hipertansif hayvanlarda endotelden bağımsız damar gevşemelerinin azalmasına yol açmıştır. Fenilefrin kaynaklı kasılma yanıtı değişmemiş, ancak DOCA-tuz grubunda KCl kaynaklı damar kasılmaları artmıştır. Myriocin, hipertansif sıçanlarda kasılma yanıtlarını değiştirmemiştir. Bu sonuçlar seramid inhibisyonunun hipertansiyon ve vasküler gevşeme cevapları üzerinde olumlu bir etkisi olmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** hipertansiyon, myriocin, seramid, endotel disfonksiyonu, DOCA-tuz.

## GİRİŞ

Hipertansiyon kan basıncının sürekli yüksek seyretmesi ile karakterize bir hastalıktır. En sık görülen kardiyovasküler hastalıklar arasındadır ve yol açtığı komplikasyonlar nedeniyle toplum sağlığını ciddi derecede tehdit eden durumlardan biridir (Coffman, 2011). Hipertansiyon oldukça karmaşık bir patogeneze sahiptir (Oparil ve ark., 2003). Çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Birçok sistem kan basıncı yükselmesine katkıda bulunurken, vasküler sistem özellikle önemlidir. Çünkü damar disfonksiyonu hipertansiyonun hem bir nedeni hem de sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hipertansiyon damarlarda yapısal, mekanik ve fonksiyonel değişimlere neden olmaktadır (Cameron ve ark., 2016). Bu değişimler içinde endotel disfonksiyonu, artmış arteriyel sertlik, azalmış elastikiyet, artmış vasküler tonus sayılabilir. Vasküler değişikliklere katkıda bulunan moleküler mekanizmalar, azaltılmış nitrik oksit (NO) biyoyararlanımını, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi sonucu artan oksidatif stres, artan hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artışı, pro-inflamatuar ve mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu ve vasküler fibrozis sayılabilir (Taddei ve ark., 2002).

Seramidler, lipid moleküllerinin sfingolipid ailesine ait önemli bir biyoaktif lipid ailesidir. Sfingosin ve amid bağlı bir yağ asidinden oluşurlar (Aburasayn ve ark., 2016). Hücre zarında bulunan bir sfingolipit olan seramid birçok hücresel işlevde rol almakta, ayrıca endotel işlevlerini ve NO salgılama düzeyini etkilemektedir. Hücrede seramid artışının mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (Di Paola ve ark., 2000). Seramidlerin oluşumu, ateroskleroz ve iskemi / reperfüzyon hasarı dahil olmak üzere birçok inflamasyon durumunda, esas olarak TNF-alfa ve interlökinler gibi birkaç anahtar sitokin yoluyla önemli ölçüde artabilmektedir (Bismuth ve ark., 2008).

Membran yapısındaki rollerine ek olarak, seramidler, farklılaşma, çoğalma, apoptoz, ROS üretimi ve sitokinler gibi gen ekspresyonu dahil olmak üzere birçok hücre yanıtını ve fonksiyonunu düzenleyen bir sinyal molekülü olarak hareket edebilmektedirler (Bismuth ve ark., 2008). Hipertansiyona bağlı oluşan damar fonksiyon bozuklukları üzerindeki etkileri ise henüz ortaya konmamıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 8 haftalık Wistar albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bütün deneyler, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı ile ilgili Ulusal Sağlık Enstitüsü Kılavuzuna uygun olarak yapılmış ve etik kurul onayı alınmıştır. Hayvanlar 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık periyodunda sabit sıcaklıkta ( $24 \pm 1^\circ C$ ) tutulmuş ve standart sıçan yemi ile beslenmiştir.

### İn vivo deneyler

Deoksikortikosteron asetat (DOCA)-tuz hipertansiyon modeli, tek taraflı nefrektomi, DOCA pelet implantasyonu ve 12 hafta boyunca içme suyuna NaCl + KCl eklenerek oluşturulmuştur. Hayvanlar ketamin ksilazın karışımı ile anesteziye edilmiş ve steril şartlarda sol böbrekleri alınmıştır. Hayvanların sırt derilerinin altına DOCA pelletleri yerleştirilmiştir. Bir hafta iyileşme süresinin sonunda içme sularına %1 NaCl ve %0,2 KCl eklenmiştir.

Myriocin uygulaması ise (0,3 mg / kg, 3 gün / hafta) son sekiz hafta boyunca yapılmıştır.

Hayvanların kan basınçları ikişer hafta arayla tail-cuff yöntemiyle ölçülmüştür. Hayvanlar ölçüm öncesi ısıtılmış ve kan basınçları kuyruklarından ölçülmüştür.

### İn vitro deneyler

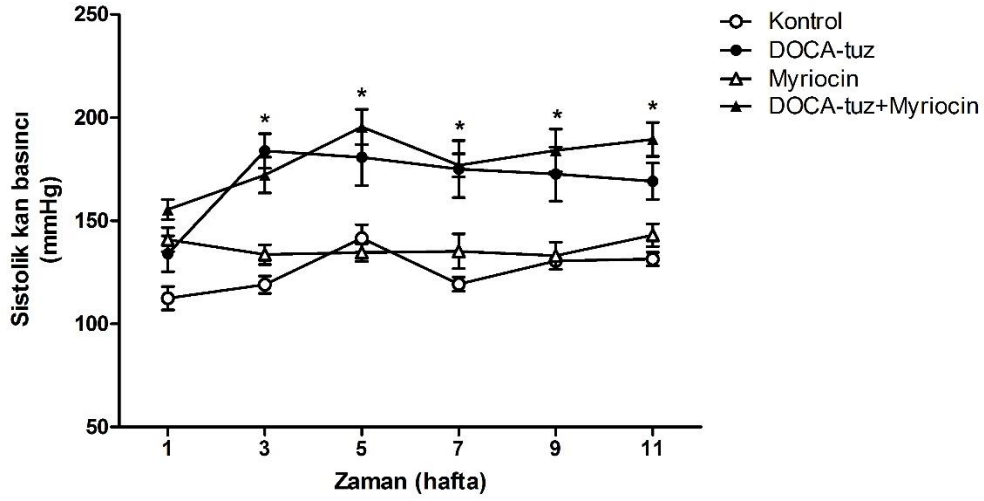
Deneyin sonunda hayvanlar anesteziye edilmiş ve torasik aortalar izole edilerek izole organ banyosu sistemine yerleştirilmiştir. Dengelenme süresinin sonunda 90 mM KCl ile kasılmalar kaydedilmiştir. Yıkamadan sonra fenilefrin (FE) ( $10^{-6}$  M) ile kastırılan damarlarda asetilkolin ( $10^{-5}$  M –  $10^{-8}$  M) doz cevapları alınmıştır. Daha sonra FE ( $10^{-6}$  M) ile kastırılan damarlarda sodyum nitroprussid (SNP) ( $10^{-5}$  M –  $10^{-9}$  M) doz cevap eğrileri kaydedilmiştir. Gevşeme cevapları FE kasılma cevabının yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

### İstatistiksel analiz

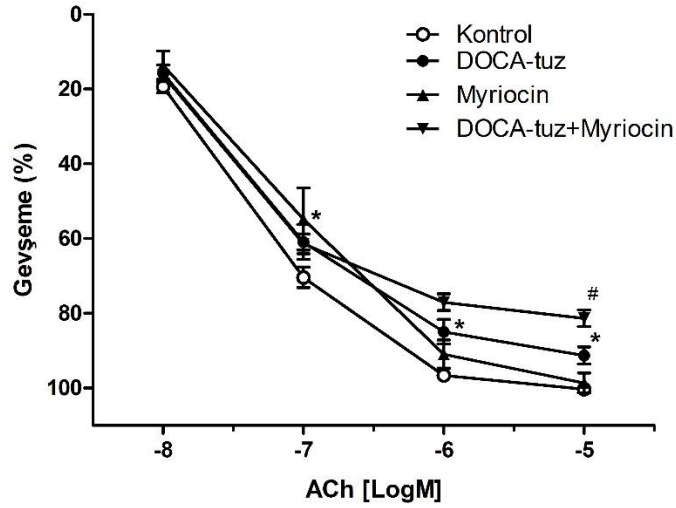
Tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için; kan basıncı ve gevşeme cevaplarında “Repeated measures 2way ANOVA” ve Bonferroni posttest, kasılma cevaplarında “Student t-test” kullanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

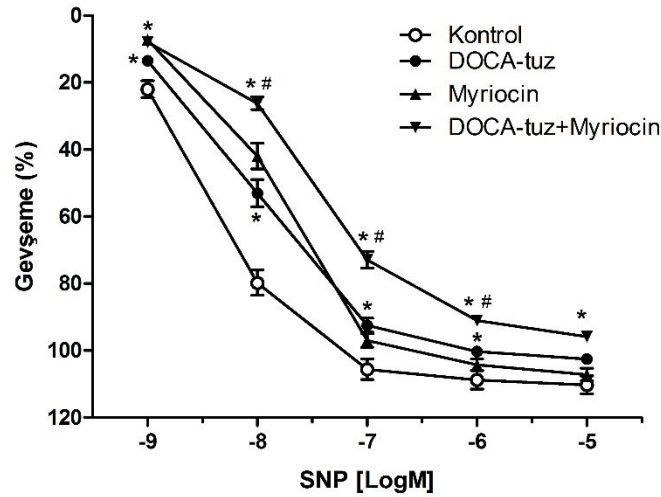
DOCA-tuz modelinin uygulanmaya başlanmasından sonra 3. haftada sistolik kan basınçlarının anlamlı olarak yükseldiği bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Myriocin uygulaması ise normotansif ve hipertansif sıçanlarda kan basınçlarını değiştirmemiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Myriocin uygulamasının sistolik kan basıncı üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM şeklinde gösterilmiştir. \* $p<0,05$  Kontrolден farklı.

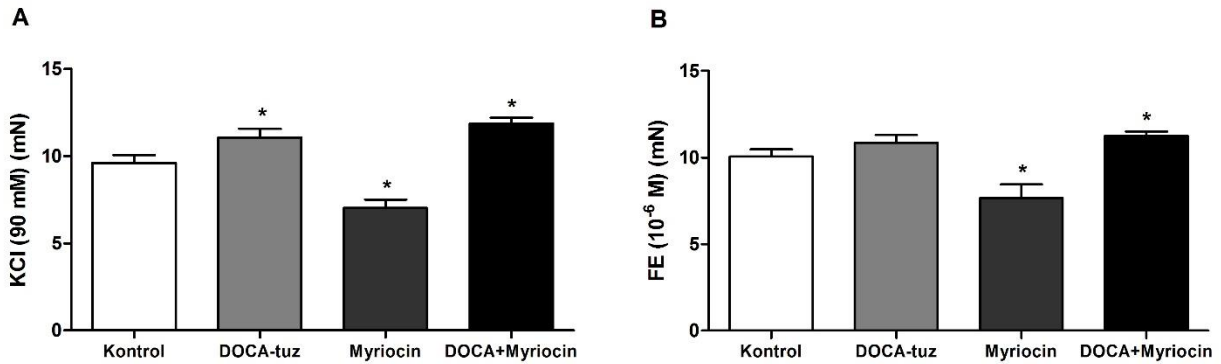


Şekil 2. Myriocin uygulamasının endotel bağımlı gevşeme cevapları üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM şeklinde gösterilmiştir. \* $p<0,05$  Kontrolден farklı; # $p<0,05$  DOCA-tuz grubundan farklı.



**Şekil 3. Myriocin uygulamasının endotelden bağımsız gevşeme cevapları üzerine etkileri.** Sonuçlar ortalama±SEM şeklinde gösterilmiştir. \*p<0,05 Kontrolden farklı; #p<0,05 DOCA-tuz grubundan farklı.

DOCA-tuz hipertansif sıçanlardaki endotel bağımlı gevşeme cevapları, kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0,05). Hipertansif gruptaki endotelden bağımsız gevşeme cevapları ise değişmemiştir. Bu bulgular daha önceki çalışma sonuçlarıyla uyumludur. Pek çok araştırmada hipertansiyon nedeniyle gelişen endotel disfonksiyonu gösterilmiştir (Mordi ve ark., 2016; Niazi ve ark., 2017; Ye ve ark., 2019).



**Şekil 4. Myriocin uygulamasının damar kasılma cevapları üzerine etkileri.** Sonuçlar ortalama±SEM şeklinde gösterilmiştir. \*p<0,05 Kontrolden farklı.

Bu çalışmada seramid sentezinin inhibisyonu için, bir serin palmitoil transferaz inhibitörü olan myriocin kullanılmıştır. Myriocin uygulaması sonucu normotansif sıçanlardaki gevşeme cevapları değişmemiştir. Hipertansif sıçanlarda myriocin uygulaması endotel bağımlı gevşeme cevaplarında bir düzelme sağlamamıştır; endotelden bağımsız damar gevşemeleri ise anlamlı olarak düşürmüştür (p<0,05) (Şekil 2 ve 3). Bazı çalışmalarda seramidlerin endotel fonksiyonlarını ve NO salgılama düzeyini etkilediği gösterilmiş olmakla birlikte bu konudaki çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Li ve ark., 2002; Matsunaga ve ark., 2004; Mogami ve ark., 2005). Hücre kültürü çalışmasında, seramidin, endotel hücrelerinde hücre içi süperoksit ve hidrojen peroksiti indüklediği gösterilmiştir (Matsunaga ve ark., 2004). Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde yapılan bir çalışmada, myriocin ile seramid inhibisyonunun maksimum damar gevşeme cevaplarını etkilemediği bulunmuştur (Zhang ve ark., 2012). Bu çalışma da ayrıca myriocinin, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda KCl ve FE ile alınan damar kasılma cevaplarını azalttığı belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2012). Bu çalışmada, hipertansif sıçanlara myriocin verilmesi kasılma yanıtlarını etkilememiştir; normotansif sıçanlarda ise kasılmaları azaltmıştır. Seramidlerin ve inhibisyonlarının, hipertansiyonda damarlar üzerindeki etkilerini açıklayabilmek için daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## SONUÇ

Myriocin, normotansif ve hipertansif sıçanlarda sistolik kan basıncını değiştirmemiştir. Myriocin uygulanan hipertansif sıçanlarda, kontrol ve DOCA-tuz gruplarına kıyasla endotel bağımlı gevmeme cevapları azalmıştır. Ayrıca myriocin, hipertansif hayvanlarda endotelden bağımsız damar gevmemelerinin azalmasına neden olmuştur. Myriocin, hipertansif sıçanlarda kasılma yanıtlarını ise değiştirmemiştir. Bu sonuçlar myriocin ile seramid inhibisyonunun hipertansiyonda damarlar üzerinde olumlu bir etkisi olmadığını dūřündürmektedir.

## TEŞEKKÜR

Çalışmaya katkılarından dolayı Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz'a ve Prof. Dr. Mecit O. Uludağ'a teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR. 2016. Targeting ceramide metabolism in obesity. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 311(2): 423-435. doi: 10.1152/ajpendo.00133.2016.
- Bismuth J, Lin P, Yao Q, Chen C. 2008. Ceramide: a common pathway for atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 196(2) :497-504.
- Cameron AC, Lang NN, Touyz RM. 2016. Drug Treatment of Hypertension: Focus on Vascular Health. *Drugs*, 76(16): 1529-1550.
- Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nature Medicine*, 2011 17(11): 1402-9. doi: 10.1038/nm.2541.
- Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. 2000. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry*, 39: 6660–6668.
- Li H, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J, Förstermann U. 2002. Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(17): 2250-2256.
- Matsunaga T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Dhanasekaran A, Joseph J, Kalyanaraman B. 2004. Ceramide-induced intracellular oxidant formation, iron signaling, and apoptosis in endothelial cells: protective role of endogenous nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27): 28614-24
- Mogami K, Kishi H, Kobayashi S. 2005. Sphingomyelinase causes endothelium-dependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide production without cytosolic Ca(2+) elevation. *FEBS Letter*, 579(2): 393-397.
- Mordi I, Mordi N, Delles C, Tzemos N. 2016. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 34(8): 1464-1472.
- Niazi ZR, Silva GC, Ribeiro TP, Leon-Gonzalez AJ, Kassem M, Mirajkar A, Alvi A, Abbas M, Zgheel F, Schini-Kerth VB, Auger C. 2017. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. *Hypertens Research*, 40(12): 966-975.
- Oparil S, Zaman A, Calhoun DA. 2003. Pathogenesis of hypertension. *Annals of Internal Medicine*. 139: 761-76
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. 2002. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs*, 62(2): 265–84.
- Ye F, Wu Y, Chen Y, Xiao D, Shi L. 2019. Impact of moderate- and high-intensity exercise on the endothelial ultrastructure and function in mesenteric arteries from hypertensive rats. *Life Science*. 222: 36-45.
- Zhang QJ, Holland WL, Wilson L, Tanner JM, Kearns D, Cahoon JM, Pettey D, Losee J, Duncan B, Gale D, Kowalski CA, Deeter N, Nichols A, Deesing M, Arrant C, Ruan T, Boehme C, McCamey DR, Rou J, Ambal K, Narra KK, Summers SA, Abel ED, Symons JD. 2012. Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes*, 61(7): 1848-59.



## The role of adiponectin, leptin and dietary antioxidant capacity in the pathogenesis of colorectal cancer

Büşra ATABİLEN\*, Gamze AKBULUT

Gazi University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetics Department, Ankara, Turkey  
\*busra.atbln@hotmail.com

### Abstract

Colorectal cancer is the third most common type of cancer worldwide. Although genetic predisposition contributes to disease development, colorectal cancer occurs more sporadically. Especially today, the increase in the prevalence of obesity and the change in the ratio of adipokines released from adipose tissue can cause carcinogenesis regulated by various pathways. The aim of this study was to evaluate leptin adiponectin and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels and dietary antioxidant capacity in patients with colorectal cancer with different body mass index (BMI). The study was carried out with 40 male subjects with the diagnosis of colorectal cancer aged between 39-65 years and a control group of the same number of healthy men who applied to Medical Oncology Polyclinic of Ankara Numune Training and Research Hospital. Subjects in the case and control groups were subdivided according to BMI as normal (BMI 20-24 kg /m<sup>2</sup>) or overweight/obese (BMI ≥25 kg / m<sup>2</sup>). Total antioxidant capacities of the diets of the individuals were calculated from antioxidant food consumption frequency form and three-day food consumption records. At the end of the study, according to control group adiponectin levels were significantly lower (p <0,05) and leptin levels were significantly higher (p <0,05) in the case group classified as normal BMI. Serum leptin and 8-OHdG levels were found to be significantly higher in case group subjects with body mass index ≥25 kg / m<sup>2</sup> compared to controls (p <0,05). Dietary total antioxidant capacity was higher in the control group than the case group, but the difference between the two groups was not significant (p > 0,05). A significant positive correlation was found between leptin and 8-OHdG in the case group (r = 0,423; p = 0,007). As a result, adiponectin and especially leptin may be an important factor in the pathogenesis of colorectal cancer, but there was no significant effect of dietary antioxidant capacity on the examined adipokines.

**Keywords:** colorectal cancer, adiponectin, leptin, dietary antioxidant capacity, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

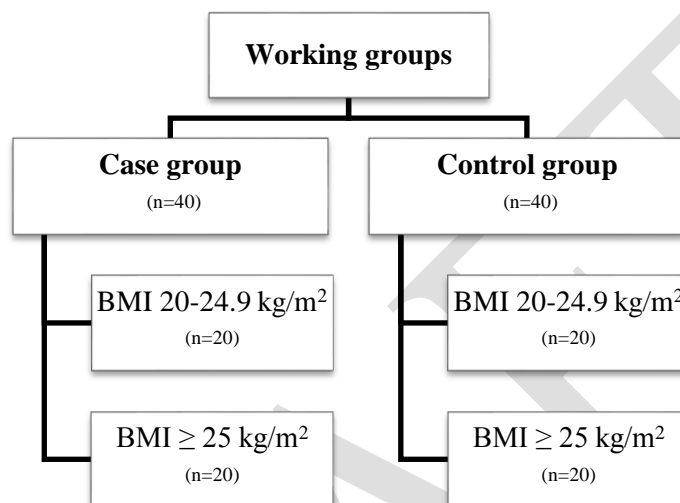
### INTRODUCTION

Colorectal cancer is a type of cancer that begins as tumor or tissue growth in the inner wall of the colon or rectum and develops slowly over 10-20 years (Marley and Nan, 2016). Especially the high turnover rate of intestinal epithelium makes this tissue the focal point for malignant transformations (Aran et al., 2016). Colorectal cancer that is the third most common cancer worldwide and the fourth most common cause of cancer-related mortality is a major health problem (Favoriti et al., 2016). Although genetic predisposition contributes to disease development, colorectal cancer occurs more sporadically (Bogaert and Prenen, 2014). Therefore many environmental, lifestyle and nutrition related risk factors actually play an important role in the development of colorectal cancer (Hagggar and Boushey, 2009). Nowadays with the increase in the prevalence of obesity, changes in the ratio of adipokines such as leptin and adiponectin released from adipose tissue can cause carcinogenesis regulated by various pathways (Grossmann and Cleary, 2012). Especially in terms of leptin and adiponectin, these adipokines normally have protective effects against cancer development. Leptin achieves this effect by protecting T-lymphocytes from apoptosis and by regulating the proliferation and activation of T-cells. It also has an effect on cytokine production in T-lymphocytes and can stimulate oxidative stress and upregulation of adhesion molecules in endothelial cells. Adiponectin, on the other hand, has anti-inflammatory effects and it shows this effect by reducing the production of interleukin-6 (IL-6) by inhibiting nuclear factor kappa B (NF-kB) and increasing the production of anti-inflammatory cytokines, interleukin-10 (IL-10) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) (Fantuzzi, 2005). Under normal circumstances, these adipokines play a protective role against cancer by regulating the immune response. However the change in the ratio of these adipokines may also cause carcinogenesis regulated by various pathways. The increase in adiponectin/leptin ratio plays a protective role against cancer by increasing apoptosis and preventing tumor proliferation; although decrease in adiponectin/leptin ratio increases the survival of cancer cells and supports the proliferation of tumor cells (Grossmann and Cleary, 2012). At the same time, changes in the levels of these adipokines in the case of inflammation may further contribute to the state of inflammation and cause carcinogenesis. While proinflammatory cytokines suppress adiponectin production, low adiponectin level also promotes inflammation and can initiates a vicious cycle (Fantuzzi, 2008).

Antioxidant nutrients are involved in capturing reactive oxygen species and protecting cells against oxidative stress responsible for processes that initiate carcinogenesis such as inflammation, cell proliferation, gene mutation formation and DNA damage (Reuter et al., 2010). Therefore, the relationship between colorectal cancer and antioxidant nutrients is another issue that needs to be addressed. The aim of this study was to evaluate the relationship between dietary antioxidant capacity and leptin, adiponectin and DNA damage in patients with colorectal cancer with different body mass index (BMI).

## MATERIALS AND METHODS

The study was carried out with male patients with colorectal cancer aged between 39-65 years who were admitted to the Medical Oncology Polyclinic of Ankara Numune Training and Research Hospital. Four different working groups were formed for the research:



Although male subjects with newly diagnosed or relapsed disease without active radiotherapy or chemotherapy and without a history of metastasis were included in the case group; totally healthy individuals were included in the control group. The aim of forming different study groups according to body mass index is to limit the effect of BMI on adipokines to be evaluated. In addition, only male subjects were included in the study due to the examination of biochemical parameters such as adiponectin and leptin, which differed in body fat distribution and hormone levels (Cnop et al., 2003). Also, the study groups were matched according to age, smoking and alcohol use in order to avoid significant differences in the biomarkers planned for the study. Ethical committee approval was obtained before the study started and the participants in the case and control groups were signed a written consent form that they voluntarily participated in the study.

The data required for the study were collected with a questionnaire form prepared by the researcher and applied to the patients with colorectal cancer and healthy control group by face to face interview technique. The questionnaire consists of questions about general information, health information, nutritional habits, anthropometric measurements, biochemical findings, frequency of antioxidant food consumption, and 3-day food consumption record (2 days weekday and 1 day weekend). Body weight, body fat ratio (%), which were evaluated under the title of anthropometric measurements, were determined with Tanita BC 532 device. Height was measured with stadiometer. Body mass index was calculated by dividing the body weight by the square of the height (in meters). The same day the patient's records were taken, 1 tube (10 ml) venous blood sample was taken from participants and biochemical parameters such as adiponectin, leptin and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were evaluated. Adiponectin, leptin and 8-OHdG kits were studied by "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" method.

Nutritional habits, nutritional status and antioxidant capacity of the diets were evaluated by taking "3-Day Food Consumption Records" and "Antioxidant Food Consumption Frequency Form". With the food consumption records, the specified measurements of the food and/or beverages consumed by the participants on a daily basis were converted into quantities. In order to evaluate the frequency of antioxidant food consumption, the form which was developed by Satia et al. used (Satia et al., 2009). With this form; in the last 1 month the frequency and amount of consumption of fruits, vegetables, cereals, legumes and oil seeds, meat, eggs and dairy products, mixed dishes, chocolate, sauces, oils and beverages were questioned. Antioxidant contents of foods were taken from analysis of the antioxidant content of 3100 food by Carlsen et al. (Carlsen

et al., 2010). Dietary total antioxidant capacity obtained as a result of analysis and calculations was recorded as total antioxidant capacity obtained from dietary consumption frequency. Energy, macro and micro nutrients obtained by daily diet, distribution according to food groups and antioxidant capacity of the diet were analyzed from the data obtained from the three-day food consumption records by using "Nutrition Information Systems Package Program" (BEBİS). However, since there is no database related to total antioxidant contents of foods in BEBİS, a database of antioxidant contents of foods was formed by using the results obtained from Carlsen et al. (Carlsen et al., 2010) and then total antioxidant capacity of the diet was calculated. The total antioxidant capacity of the diet was recorded as the total antioxidant capacity obtained from the food consumption records.

The data obtained from the researches were analyzed by using SPSS 22.0 program with appropriate statistical methods. Descriptive values are expressed as number (n), percentage (%), arithmetic mean ( $\bar{x}$ ) and standard deviation (ss). Pearson's chi-square and Fisher's exact chi-square tests were used to compare categorical variables. The suitability of the variables to normal distribution was examined by visual (histogram and probability graphs) and analytical methods (Kolmogorov-Smirnov / Shapiro-Wilk tests). Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test were used to compare the data without normal distribution. The relationship between the variables was examined by Spearman Correlation Analysis. The level of statistical significance was determined as  $p < 0,05$ .

## RESULTS and DISCUSSION

In the section of demographic characteristics, factors such as age, genetics, smoking and alcohol use that are effective in the development of colorectal cancer are discussed. The gender factor was excluded at the beginning of the study because the risk of developing colorectal cancer was higher in male subjects than in women (Davies et al., 2005), and in particular, biochemical parameters such as adiponectin and leptin were affected by body fat distribution or hormone levels (Kelesidis et al., 2006). In conclusion, no significant difference was found between the groups in terms of demographic characteristics (Table 1). However, although there is no significant difference, age is one of the factors that affect the incidence of colorectal cancer. Because the incidence of colorectal cancer increases with age (Favoriti et al., 2016). In general, colorectal cancer is not common in individuals aged 40 and under; incidence rate starts to increase especially after 50 years of age. According to cancer statistics 2015 of Turkey, similarly, the incidence of colon and rectal cancers in male subjects increases significantly, especially after 40 years of age (Turkey cancer statistics, 2015). In this study, the mean age of individuals with colorectal cancer was found to be  $55,8 \pm 7,48$  years in accordance with the literature.

Obesity is a known risk factor for many cancers. There is clear evidence that adipose tissue is associated with cancer of the kidney, gallbladder, liver, endometrial, ovary, pancreas, colorectal and especially postmenopausal breast and esophageal cancer (WCRF/AICR Report, 2007). In studies investigating the relationship between anthropometric measurements and colorectal cancer, an increase in BMI was generally associated with an increased risk of colorectal cancer. The change in anthropometric measurements is not only a risk factor for the development of the disease, but also a factor that negatively affects the prognosis of the disease. Studies examining the effect of body mass index on colorectal cancer prognosis have reported an increased risk of mortality (Doleman et al., 2016; Wang et al., 2017) and recurrence of disease (Doleman et al., 2016) in overweight and obese subjects compared with normal body weight subjects. The mechanisms suggested by the obesity factor to adversely affect disease prognosis are that increased body fat may alter chemotherapy and radiotherapy response (Doleman et al., 2016) or obesity may be responsible for biochemical changes such as increased in IGF-1 production and decreased immune function (Abar et al., 2018; Doleman et al., 2016). In this study, although the difference was not significant, the BMI was higher in the control group than in the case group. Similarly, although the difference was not significant, the percentage of body fat was higher in the case group than in the control group (Table 1). Higher body fat percentage is a risk factor for colorectal cancer. Because adipose tissue are responsible for an undesirable metabolic risk profile such as hyperinsulinemia, systemic inflammation, low adiponectin and high leptin levels, and all of them may be potential underlying mechanisms for colorectal cancer (Hanley et al., 2002; Neeland et al., 2013).

**Table 1.** Demographic characteristics and anthropometric measurements of individuals in the case and control groups

Demographic characteristics and anthropometric measurements	Case group(n: 40)		Control group(n: 40)		P
	n	%	n	%	
<b>Age (year)</b>					
X±SS (min-max)	55,8±7,48 (39-65)		53,7±6,28 (43-65)		p <sup>a</sup> =0,112
<b>Educational status</b>					
Not literate	3	7,5	-	-	p <sup>b</sup> =0,178
Literate	2	5	1	2,5	
Primary school	18	45	19	47,5	
Secondary school	7	17,5	5	12,5	
High school	7	17,5	9	22,5	
University	2	5	6	15	
Postgraduate	1	2,5	-	-	
<b>Smoking</b>					
Yes	14	35	21	52,5	p <sup>c</sup> =0,064
No	7	17,5	10	25	
Quit smoking	19	47,5	9	22,5	
<b>Alcohol use</b>					
Yes	1	2,5	2	5	p <sup>c</sup> =1,000
No	39	97,5	38	95	
<b>Family history of cancer</b>					
Yes	16	40	13	32,5	p <sup>c</sup> =0,485
No	24	60	27	67,5	
<b>Anthropometric measurements (X±SS)</b>					
Height (cm)	167,9±6,87		174,7±7,21		p <sup>a</sup> <0,001
Body weight (kg)	70,8±11,97		80,5±12,3		p <sup>a</sup> =0,001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,1±3,62		26,4±3,57		p <sup>a</sup> =0,090
Body fat percentage (%)	21,4±6,55		21,9±4,77		p <sup>a</sup> =0,648

<sup>a</sup>Mann Whitney U test

<sup>b</sup>Kruskal Wallis test

<sup>c</sup>Pearson chi square test

Another important risk factors in the development of colorectal cancer is the change in the level of adipokines released from adipose tissue due to obesity factor. In particular, one of these adipokines, leptin has the primary function of controlling body fat tissue, but also increases in leptin level with obesity can induce cellular proliferation and prevent apoptosis by increasing IL-6 production in colon epithelial cells (Fenton et al., 2005; Sierra-Honigmann et al., 1998). In contrast, adiponectin normally exhibits an anti-inflammatory effect and inhibits angiogenesis. However, a decrease in adiponectin level due to obesity factor may cause hyperinsulinemia and an increase in IGF-1 levels and may increase cellular proliferation and inhibit apoptosis (Gialamas et al., 2011). Studies have also shown that serum adiponectin levels are decreased (An et al., 2012; Gialamas et al., 2011; Gonullu et al., 2010; Nakajima et al., 2010; Otake et al., 2010; Öztürk et al.; Saetang et al., 2016) and leptin levels are increased in individuals with colorectal cancer (Koda et al., 2007; Yamaji et al., 2010). In addition, when compared to colorectal cancer with normal body weight, the decrease in serum adiponectin level by 23,5% and the increase in serum leptin level by 57,7% in overweight/obese individuals with colorectal cancer was shown (Zhu et al., 2018). In this study, in accordance with the literature, adiponectin level was found to be significantly lower (p <0,001) in the case group with normal BMI compared to the control group, whereas leptin level was found to be significantly higher in the case group with normal and high BMI compared to the control group (p = 0,001) (Table 2). The reason why there was no difference in adiponectin levels between case and control groups with high BMI or between case subgroups may be due to an increase in adiponectin level, especially in high BMI group due to disease-related weight loss. Because weight loss can increase adiponectin levels (Chandran et al., 2003).

**Table 2: Mean, standard deviation and min-max values for the biochemical parameters and dietary antioxidant capacity of the subjects in the case and control groups**

Variables	Case group (n: 40)		Control group (n: 40)		p	Difference between groups
	BMI 20-24.9 kg/m <sup>2</sup> (G1) (n:20) X̄±SS (min-max)	BMI ≥25 kg/m <sup>2</sup> (G2) (n:20) X̄±SS (min-max)	BMI 20-24.9 kg/m <sup>2</sup> (G3) (n:20) X̄±SS (min-max)	BMI ≥25 kg/m <sup>2</sup> (G4) (n:20) X̄±SS (min-max)		
<b>Biochemical parameters</b>						
Adiponectin	10,1±2,30 (4,3-12,1)	10,6±1,77 (3,8-12,3)	22,3±3,01 (16,4-24,4)	14,2±6,18 (2,7-30,3)	<b>&lt;0,001</b> 0,118	G1-G3 G2-G4
Leptin	70,9±16,99 (48,3-106,8)	79,5±21,52 (55,1-106,7)	56,0±12,0 (14,9-68,6)	54,7±18,25 (0,02-73,1)	<b>0,017</b> <b>0,002</b>	G1-G3 G2-G4
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)	355,7±244,64 (42,8-722,7)	507,1±230,04 (144,9-757,9)	187,6±113,40 (19,2-397,5)	156,1±117,8 (0-393,2)	0,057 <b>&lt;0,001</b>	G1-G3 G2-G4
<b>Dietary Antioxidant Capacity</b>						
Dietary total antioxidant capacity <sup>a</sup>	1,93±1,02 (1-4,9)	2,40±1,09 (0,9-4,3)	2,21±0,75 (0,9-3,8)	2,52±1,48 (1,1-6)	0,386	Case-Control
Dietary total antioxidant capacity <sup>b</sup>	2,18±0,51 (1,2-3,1)	3,02±1,13 (1,5-5,4)	2,66±0,93 (1,4-5,3)	3,14±0,81 (1,6-4,8)	0,096	Case-Control

Mann Whitney U test and Tamhane test

Statistically significant p values (p <0.05) were written in bold.

<sup>a</sup> Dietary total antioxidant capacity obtained from the antioxidant food consumption frequency form

<sup>b</sup> Dietary total antioxidant capacity obtained from food consumption records

DNA damage is one of the important markers in the evaluation of oxidative stress in colorectal cancer. Biomarkers reflecting oxidized nucleosides such as 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) or 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) are used in the detection of DNA damage and 8-OHdG levels were significantly higher in patients with colorectal cancer (Chang et al., 2008; Guz et al., 2008). In this study, DNA damage was determined by serum 8-OHdG level and this biomarker was significantly higher in the case group with high BMI compared to the control group (p <0,001). In addition, when the case subgroups were considered, the case group with high BMI have significantly higher serum 8-OHdG level than the case group with normal BMI (p <0,001) (Table 2).

Antioxidant nutrients are involved in capturing free radicals and protecting cells against oxidative stress responsible for processes that initiate carcinogenesis, such as inflammation, cell proliferation, mutation in genes, and DNA damage (Reuter et al., 2010). However, instead of evaluating the antioxidant nutrients that play a protective role against oxidative stress, it is more important to collectively evaluate antioxidants in the diet. Because antioxidants can act synergistically to play a protective role against carcinogenesis by reducing oxidative stress (Mekary et al., 2010). According to the results of a prospective cohort study, total antioxidant capacity of the diet was not found to be associated with colorectal or colon cancer but was found negative relationship with rectal cancer (Mekary et al., 2010). Similarly, in another study, although dietary total antioxidant capacity was not significantly associated with colorectal cancer incidence; the risk of developing colon cancer was significantly lower in the category with the highest total dietary antioxidant capacity (HR:0,63; 95%CI: 0,44–0,89; p=0,008) (Vece et al., 2015). According to the results of a large case-control study conducted in Italy, a negative relationship was reported between total antioxidant capacity of the diet and the risk of colorectal cancer (Vecchia et al., 2013). In this study, total antioxidant capacity of the diet was calculated from the antioxidant food consumption frequency form and food consumption records. Dietary total antioxidant capacity obtained from antioxidant food consumption frequency form and food consumption records was higher in the control group compared to the case group, but no significant difference was found between the groups (p > 0,05). Significant difference for the total antioxidant capacity of the diet was found only by comparing the case and control subgroups within itself. This may be due to the fact that the food consumption of the groups with high BMI is higher than the normal BMI groups. Because the difference is not significant for dietary antioxidant capacity obtained from antioxidant food consumption frequency form. As a result, although the data were not significant, dietary total antioxidant capacity was lower in the case group compared to the control group, suggesting that oxidative stress and inflammation may be a risk factor for

disease development. Finally, the significant negative correlation between leptin level and adiponectin/leptin ratio and 8-OHdG especially in the case group ( $p < 0.05$ ) proves that the change in the level of adipokines in colorectal cancer is associated with DNA damage (Table 3). Increase in leptin level or decrease in adiponectin/leptin ratio increases the survival of cancer cells and supports the proliferation of tumour cells (Grossmann and Cleary, 2012). At the same time, changes in the levels of these adipokines increase the inflammation status and increase the risk of carcinogenesis. Therefore, changes in the level of adipokines may contribute to inflammatory status and oxidative stress and cause DNA damage.

**Table 3.** Relationship between adiponectin, leptin and adiponectin/leptin ratio and DNA damage and dietary antioxidant capacity

Variables	Adiponectin		Leptin		Adiponectin/Leptin ratio	
	r	p	r	p	r	p
<b>Case group (n=40)</b>						
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	-0,104	0,523	<b>0,423</b>	<b>0,007</b>	<b>-0,355</b>	<b>0,025</b>
Dietary total antioxidant capacity <sup>a</sup>	-0,077	0,637	0,015	0,928	-0,064	0,694
Dietary total antioxidant capacity <sup>b</sup>	-0,016	0,923	0,083	0,610	-0,111	0,494
<b>Control group (n=40)</b>						
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine	<b>-0,314</b>	<b>0,048</b>	<b>0,395</b>	<b>0,012</b>	-0,134	-0,411
Dietary total antioxidant capacity <sup>a</sup>	0,032	0,843	0,146	0,368	-0,080	0,624
Dietary total antioxidant capacity <sup>b</sup>	-0,106	0,517	0,130	0,424	-0,068	0,679

Spearman correlation analysis

Statistically significant p values ( $p < 0.05$ ) were written in bold.

<sup>a</sup> Dietary total antioxidant capacity obtained from the antioxidant food consumption frequency form

<sup>b</sup> Dietary total antioxidant capacity obtained from food consumption records

#### Limitations of the study:

The fact that weight changes in the last 1 month was not questioned especially for the individuals in the case group made it impossible to discuss the role of weight changes on adiponectin and leptin levels. In addition, seasonal differences due to long study time may be an important factor affecting the results of antioxidant food consumption frequency form and dietary antioxidant capacity. Lastly, it may be useful to strengthen the results of the study by reaching more samples in studies to be planned similar to this study.

#### CONCLUSION

Colorectal cancer is an important health problem with a high prevalence both in the world and in our country. Therefore, especially the factors that play a role in the development of the disease or the underlying mechanisms should be well known and appropriate recommendations should be made for the risk factors that can be modified. Obesity and the change in the ratio of adipokines are important risk factors in the formation of the colorectal cancer. In this study, adiponectin and leptin were found to play an important role in disease development. Therefore, it is necessary to maintain the ideal body weight and especially prevent abdominal adiposity. In obese individuals, achieving body weight loss is also important in preventing colorectal cancer development. In addition, increasing the level of physical activity is important both effect of body weight loss on adipokines and to improve disease prognosis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Gazi University Scientific Research Projects Unit (project code: 47/2018-01).

## REFERENCES

- Abar L, Vieira AR, Aune D, Sobiecki JG, Vingeliene S, Polemiti E, Stevens C, Greenwood DC, Chan DS, Schlesinger S 2018. Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF–AICR systematic review of published prospective studies. *European journal of nutrition*, 57(5): 1701-1720.
- An W, Bai Y, Deng S-X, Gao J, Ben Q-W, Cai Q-C, Zhang H-G, Li Z-S 2012. Adiponectin levels in patients with colorectal cancer and adenoma: a meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(2): 126-133.
- Aran V, Victorino AP, Thuler LC, Ferreira CG 2016. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. *Clinical colorectal cancer*, 15(3): 195-203.
- Bogaert J, Prenen H 2014. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1): 9.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, Willey C, Senoo H, Umezono Y, Sanada C 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition journal*, 9(1): 3.
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR 2003. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes care*, 26(8): 2442-2450.
- Chang D, Wang F, Zhao Y-S, Pan H-Z 2008. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21(4): 286-289.
- Cnop M, Havel P, Utzschneider K, Carr D, Sinha M, Boyko E, Retzlaff B, Knopp R, Brunzell J, Kahn SE 2003. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 46(4): 459-469.
- Davies RJ, Miller R, Coleman N 2005. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature reviews cancer*, 5(3): 199.
- Doleman B, Mills K, Lim S, Zelhart M, Gagliardi G 2016. Body mass index and colorectal cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Techniques in coloproctology*, 20(8): 517-535.
- Fantuzzi G 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(5): 911-919.
- Fantuzzi G 2008. Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(2): 326-330.
- Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi REM, Corcione F 2016. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in surgery*, 68(1): 7-11.
- Fenton JI, Hord NG, Lavigne JA, Perkins SN, Hursting SD 2005. Leptin, insulin-like growth factor-1, and insulin-like growth factor-2 are mitogens in ApcMin/+ but not Apc+/+ colonic epithelial cell lines. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 14(7): 1646-1652.
- WCRF/AICR, 2007. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Available at: <https://www.wcrf.org/sites/default/files/english.pdf> [09.07.2019]
- Gialamas SP, Petridou ET, Tseleni-Balafouta S, Spyridopoulos TN, Matsoukis IL, Kondi-Pafiti A, Zografos G, Mantzoros CS 2011. Serum adiponectin levels and tissue expression of adiponectin receptors are associated with risk, stage, and grade of colorectal cancer. *Metabolism*, 60(11): 1530-1538.
- Gonullu G, Kahraman H, Bedir A, Bektas A, Yücel I 2010. [Association between adiponectin, resistin, insulin resistance, and colorectal tumors]. *International journal of colorectal disease*, 25(2): 205-212.
- Grossmann ME, Cleary MP 2012. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis—focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie*, 94(10): 2164-2171.
- Guz J, Foksinski M, Siomek A, Gackowski D, Rozalski R, Dziaman T, Szpila A, Olinski R 2008. The relationship between 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 640(1): 170-173.
- Haggar FA, Boushey RP 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22(4): 191.
- Hanley AJ, McKeown-Eyssen G, Harris SB, Hegele RA, Wolever TM, Kwan J, Zinman B 2002. Cross-sectional and prospective associations between abdominal adiposity and proinsulin concentration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1): 77-83.
- Kelesidis I, Kelesidis T, Mantzoros C 2006. Adiponectin and cancer: a systematic review. *British journal of cancer*, 94(9): 1221.
- Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Surmacz E, Sulkowski S 2007. Overexpression of the obesity hormone leptin in human colorectal cancer. *Journal of clinical pathology*, 60(8): 902-906.

- Marley AR, Nan H 2016. Epidemiology of colorectal cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 7(3): 105.
- Mekary RA, Wu K, Giovannucci E, Sampson L, Fuchs C, Spiegelman D, Willett WC, Smith-Warner SA 2010. Total antioxidant capacity intake and colorectal cancer risk in the Health Professionals Follow-up Study. *Cancer Causes & Control*, 21(8): 1315-1321.
- Nakajima TE, Yamada Y, Hamano T, Furuta K, Matsuda T, Fujita S, Kato K, Hamaguchi T, Shimada Y 2010. Adipocytokines as new promising markers of colorectal tumors: adiponectin for colorectal adenoma, and resistin and visfatin for colorectal cancer. *Cancer science*, 101(5): 1286-1291.
- Neeland IJ, Ayers CR, Rohatgi AK, Turer AT, Berry JD, Das SR, Vega GL, Khera A, McGuire DK, Grundy SM 2013. Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity*, 21(9): E439-E447.
- Otake S, Takeda H, Fujishima S, Fukui T, Orii T, Sato T, Sasaki Y, Nishise S, Kawata S 2010. Decreased levels of plasma adiponectin associated with increased risk of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 16(10): 1252.
- Öztürk B, Kutlutürk F, Sezer E Üç Farklı Solid Tümörde Serum Adiponektin Düzeyleri. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*, 2(2): 65-71.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11): 1603-1616.
- Saetang J, Boonpipattanapong T, Palanusont A, Maneechay W, Sangkhathat S 2016. Alteration of leptin and adiponectin in multistep colorectal tumorigenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(4): 2119-2123.
- Satia JA, Watters JL, Galanko JA 2009. Validation of an antioxidant nutrient questionnaire in whites and African Americans. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 109(3): 502-508. e506.
- Sierra-Honigmann MRo, Nath AK, Murakami C, García-Cardeña G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281(5383): 1683-1686.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2018. Türkiye kanser istatistikleri 2015, Türkiye kanser istatistikleri raporu, Ankara: 17-64.
- Vecchia C, Decarli A, Serafini M, Parpinel M, Bellocco R, Galeone C, Bosetti C, Zucchetto A, Polesel J, Lagiou P 2013. Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer: A large case-control study in Italy. *International journal of cancer*, 133(6): 1447-1451.
- Vece MM, Agnoli C, Grioni S, Sieri S, Pala V, Pellegrini N, Frasca G, Tumino R, Mattiello A, Panico S 2015. Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer in the Italian EPIC cohort. *PloS one*, 10(11): e0142995.
- Wang N, Khankari NK, Cai H, Li HL, Yang G, Gao Yt, Xiang Yb, Shu XO, Zheng W 2017. Prediagnosis body mass index and waist-hip circumference ratio in association with colorectal cancer survival. *International journal of cancer*, 140(2): 292-301.
- Yamaji T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S 2010. Interaction between adiponectin and leptin influences the risk of colorectal adenoma. *Cancer research*: 0008-5472. CAN-0010-0178.
- Zhu H, Liu M, Zhang N, Pan H, Lin G, Li N, Wang L, Yang H, Yan K, Gong F 2018. Circulating and Adipose Tissue mRNA Levels of Zinc- $\alpha$ 2-Glycoprotein, Leptin, High-Molecular-Weight Adiponectin, and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Colorectal Cancer Patients With or Without Obesity. *Frontiers in endocrinology*, 9.



## Tetanoz teşhisi konulmuş bir tayda intratekal tetanoz antitoksini uygulaması

Ümit ÖZCAN<sup>1\*</sup>, Didem PEKMEZCİ<sup>1</sup>, Mehmet TÜTÜNCÜ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>2</sup>Üniversite, Fakülte, Bölüm, Şehir, Ülke

\*Sorumlu yazar e-mail: umit.ozcan@omu.edu.tr

### Özet

Tetanoz bütün evcil hayvanlarda ve insanlarda görülen enfeksiyöz bir hastalıktır. Hatalığın etkeni *Bacillaceae* ailesinden *Clostridium Tetani*'dir ve Atlarda etkene karşı pasif bağışıklık 1892 yılından beri pratikte uygulanmaktadır. Bu sebepten dolayı atlarda tetanoz olguları oldukça nadir halde görülmeye başlamış olsa dahi; aşılama programlarının tam olarak oturtulamadığı yeni gelişmekte olan ılıman ülkelerde enzootik olarak kendini göstermektedir. Tek tırnaklılar tetanoz hastalığına karşı duyarlıdır ve çoğunlukla bu türde ölümcül olarak seyretmektedir. Üç aylık, saf İngiliz tayı kliniğimize ayağa kalkamama şikâyeti ile getirildi. Alınan ilk anamnez doğrultusunda 1 hafta önce halsizlik ve hareket etmede isteksizlik olduğu bu sebepten dolayı 5 gün süre ile günde 1 kez kas içi uygulama yolu ile penisilin-dihidrostreptomisin kombinasyonu olan preparatın kullanıldığı öğrenildi. Klinik muayenesi sonucunda bütün ekstremitelerde ekstensiyon, kulaklar ve yüzde gerginlik, üçüncü göz kapağında düşme ve hiperestezik bir mental durum gözlemlendi. Ayrıca vücut sıcaklığı 40,2 C° ve omfaliti olduğu tespit edildi. Tam kan sayımında lökosit 12,5x10<sup>9</sup>/L, nötrofil 10,91x10<sup>9</sup>/L, lenfosit 1,18x10<sup>9</sup>/L, monosit 0,34x10<sup>9</sup>/L, eozinofil 0,02x10<sup>9</sup>/L, bazofil 0,05x10<sup>9</sup>/L, eritrosit 8,82x10<sup>12</sup>/L, hematokrit %35 ve platelet ise 184x10<sup>9</sup>/L olarak belirlendi. Yapılan klinik ve hematolojik muayene sonucunda hastaya tetanoz teşhisi konuldu. Bu vakamızda ise tetanoz antitoksini atlanto-occipital eklemden *cisterna magna* 'ya verilerek merkezi sinir sistemindeki toksinlerin nötralizasyonu amaçlandı. Bu amaçla 7 adet Tetagam P (3,000 IU tetanoz antitoksini, toplamda 21,000 IU) tek doz intratekal olarak anestezi altında uygulandı. Hospitalize edilen tay sessiz ve karanlık bir bölmeye alınarak yüksek bir altlığa alındı ayrıca günlük 2 lt laktatlı ringer solüsyonu, 1 lt %5 dextroz solüsyonu, b kompleks vitaminleri (iv) ve penisilin (15,000 iu/kg i.m. q 12 saat) uygulaması ile omfalit için lokal yara tedavisi ve lokal penisilin (lezyon içi) antibiyotik uygulamaları gerçekleştirildi. İkinci günün sonunda çene kaslarının felci şekillendi ve 5. gün sonunda solunum kaybına bağlı olarak tay ex oldu. Bu vakada da kronikleşmiş bir tetanoz hastalığının prognozunun olumsuz olduğu gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tetanoz, antitoksin, intratekal

### Intrathecal administration of tetanus antitoxin in a case of tetanus in a foal

#### Abstract

Tetanus is an infectious disease that occurs in all domestic animals and humans. The causative agent of the defect is *Clostridium Tetani* from the *Bacillaceae* family, and in horses passive immunity has been practiced in practice since 1892. For this reason, even though the cases of tetanus in horses started to be seen very rarely; It appears to be enzootically present in the new developing temperate countries where vaccination programs are not fully established. Equidae are susceptible to watch such as tetanus and often fatal. A three-month-old purebred foal was brought to our clinic with complaints of inability to stand up. According to the first medical history taken, it was learned that the preparation which was combined with penicillin-dihydrostreptomycin by intramuscular administration once a day for 5 days due to weakness and unwillingness to move 1 week ago. As a result of clinical examination, extension of all extremities, tension in the ears and face, drop in the third eyelid and a hyperesthetic mental state were observed. In this case, tetanus antitoxin was given to the *cisterna magna* from the atlanto-occipital joint to neutralize the toxins in the central nervous system. The hospitalized foal was taken to a quiet and dark compartment. 2 lt lactate ringer solution, 1 lt 5% dextrose solution, b complex vitamins (iv) and penicillin (15,000 iu / kg i.m. q 12 hours), local wound therapy and local penicillin (intralesion) antibiotic applications were performed daily. At the end of the second day, paralysis of the jaw muscles was formed and at the end of the 5th day the foal died due to respiratory loss. In this case, the prognosis of chronic tetanus cases was observed to be negative.

**Keywords:** Tetanus, Antitoxin, intrathecal

## GİRİŞ

Tetanoz, insanlarda ve hayvanlarda *Clostridium tetani*'nin üretmiş olduğu toksinlerin neden olduğu oldukça ölümcül enfeksiyöz bir hastalıktır. Tek tırnaklılar, özellikle atlar hastalığa oldukça duyarlıdır (Radostits ve ark., 1994; Cullinane ve ark. 1999). Etkene karşı aşılamanın rutinde uygulanıyor olması hastalığın insidansını oldukça düşürmesine rağmen (Green ve ark., 1994) gelişmekte olan aşılama prosedürünün tam oturmadığı ılıman kuşak ülkelerinde sporadik olarak ortaya çıkmaktadır (Kay ve Knottenbelt 2007).

CII. tetani insanların ve hayvanların mide barsak sisteminin kommersal bakterisidir. Sporları çevresel etkenlere, dezenfektanlara, asit ve alkali ortamlara karşı oldukça dirençlidir. Etken toprakta yıllarca yaşayabilir.

Etken organizmaya genellikle yaralar vasıtasıyla girer. Genellikle derine penetre olmuş yaralar etkenin anaerobik ortama ulaşmasını sağlar. Ayrıca kronikleşmiş, anaerobik ortam oluşmuş kronik yaralar veya apseler etkenin patolojik sayıya ulaşmasında predispoze faktörlerdir (Cullinane ve ark., 1999).

Neonatalerde umbilikal kontaminasyonlar, kısıraklarda doğum sonrası plasenta artıkları veya metritis ve yaralanmalar etkenin canlıya diğer giriş yollarıdır.

Tetanozun klinik semptomları, bakterinin anaerobik ortamda üretmiş olduğu kompleks yapıda ki 3 toksinin organizmada ki etkileri sonucunda oluşur.

Tetanospazmin primer toksindir ve klinik semptomların oluşmasından birincil sorumludur (Kay ve Knottenbelt 2007). Tetanospazmin bakteri tarafından 150 kd. tek bir polipeptid zinciri şeklinde sentezlenir. Canlıda ise proteaz enzimleri ile iki alt fragmente ayrılır. Toksinler enfekte dokudan komşu dokulara difüzyon ile yayılır, buradan lenfoid dokuya daha sonrasında ise kan dolaşımına karışır (Hatheway 1990). Toksinler retrograd aksonal taşıma ile ilk önce periferik sinir uçlarına daha sonra duyu ve otonomik fiberlere ve son olarak da merkezi sinir sistemine ulaşır. Burada omuriliğin ventral boynuzunda gri maddesinde "Renshaw hücreleri" olarak adlandırılan inhibitör internöronlara tutunur. Bu aşamadan sonra ise toksin; sinir hücresi membranına tutunur, endositoz ile hücre içine girer, nörotransmitter salınımını engeller (Poulain 1994). Sonuç olarak tetanospazmin; gaba ve glisin gibi inhibitör nörotransmitterleri bloke ederek, postsinaptik inhibitör yanıtı bloke eder ve bu durum kaslara devamlı kasılma uyarımının gitmesine neden olur (Montecucco ve ark., 1994; Montecucco ve ark., 1995).

Tetanoz antitoksinin intratekal olarak uygulanması veteriner literatürde rutin yardımcı tedaviler arasında yerini almaktadır (Mayhev 1989, Cox ve ark., 1995). Tetanoz antitoksini sık bilindik olarak intravenöz, kas içi veya deri altı olarak uygulanır. Fakat bu uygulamalar merkezi sinir sistemine geçmiş olan toksinlerin nötralizasyonunu sağlamaz (Coleman 1998). Tetanoz antitoksinin intratekal uygulanması kan-beyin bariyerini ekarte ederek merkezi sinir sisteminde ki serbest halde dolaşan toksinin nötralizasyonunu sağlamaktadır (Green ve ark., 1994). Ayrıca bazı araştırmacılar intratekal olarak verilen antitoksinin merkezi sinir sistemine bağlanmış olan toksini de nötralize edebileceği, bu durumun hastalığın progresyonunu yavaşlatacağını ve hayatta kalma oranını arttıracığını düşünmektedir (Muylle ve ark.1975).

İntratekal antitoksin uygulaması literatürde yerini alsada bu alanda yayınlanan tebliğler az sayıdadır.

Bu vaka takdimi ile, tetanoz teşhisi konulmuş bir İngiliz tayında tedavi amaçlı olarak tetanoz antitoksinin intratekal uygulanması ve bakımı sunulmuştur.

Tedavide; toksin kaynağının eliminasyonu, serbest haldeki toksinin nötralizasyonu, ağrının azaltılması, toksine karşı immunitenin şekillendirilmesi ve nöromusküler düzensizliklerin ortadan kaldırılması hedeflenir. Penisilinler bakterinin vejetatif formuna karşı etkilidir ve tetanozun bütün vakalarında endikedir (Green ve ark., 1994). Tedavi süresinde mükemmel bir hasta bakımı gerekmekle birlikte, çevresel uyarılardan arı (sessiz, karanlık) bir ortam da gereklidir (Reed ve ark., 2017).

## MATERYAL

Bu vaka takdiminin materyalini 3 aylık saf İngiliz ırkı bir tay oluşturmaktadır. Kliniğimize ayağa kalkamama şikayeti ile getirilen hastanın, 1 hafta önce başlayan hareket etmede isteksizlik şikayeti ile 5 gün boyunca günde bir kez penisilin kullanıldığı öğrenildi. Yapılan klinik muayenesinde, hiperestezik mental durum, yüzde ve kulaklarda gerginlik, arka ayaklarda ekstensiyon, üçüncü göz kapağında düşme olduğu belirlendi. Ayrıca hayvanda omfalit olduğu ortaya konuldu. Vücut sıcaklığı 40,5 C, tam kam sayımı bulguları ise lökosit 12,5x10<sup>9</sup>/L, nötrofil 10,91x10<sup>9</sup>/L, lenfosit 1,18x10<sup>9</sup>/L, monosit 0,34x10<sup>9</sup>/L, eozinofil 0,02x10<sup>9</sup>/L, bazofil

0,05x10<sup>9</sup>/L, eritrosit 8,82x10<sup>12</sup>/L, hematokrit %35 ve platelet ise 184x10<sup>9</sup>/L olduğu belirlendi. Aspartat amino transferaz ve kreatinin kinaz enzimlerinin normalin 4 katı olduğu yapılan tetkikler sonucunda ortaya kondu.

Yapılan klinik, laboratuvar muayeneleri sonucunda taya tetanoz teşhisi konuldu ve tedaviye başlandı.

## TEDAVİ

Tedavi amacı ile 7 adet 3000 IU insan tetanoz toksini bulunan preparat (Tetagam P) intratekal olarak merkezi sinir sistemine verildi. Bu uygulama için hayvan detomidin hidroklorid ile anesteziye alındı. Atlantookspital eklemden girilerek antitoksin cisterna magna'ya uygulandı.

Hospitalize edilen tay sessiz ve karanlık bir bölme'ye alınarak yüksek ve yumuşak bir altlığa alındı ayrıca günlük 2 lt laktatlı ringer solüsyonu, 1 lt %5 dextroz solüsyonu, b kompleks vitaminleri (iv) ve penisilin (15,000 IU/kg i.m. q 12 saat) uygulaması ile omfalit için lokal yara tedavisi ve lokal penisilin (lezyon içi) antibiyotik uygulamaları gerçekleştirildi. Çene kaslarının felci şekillenene kadar biberon ve el ile beslenen hayvan yutma gücünü şekillendikten sonra sonda uygulaması ile beslendi.

İkinci günün sonunda çene kaslarının felci şekillendi ve 5. gün sonunda solunum kaybına bağlı olarak ölüm şekillendi.

## TARTIŞMA

İntratekal tedavi uygulamaları ders kitaplarında yerini alsada bu konu uygulama ile alakalı olarak çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Var olan çalışmalar ise birbiri ile ters sonuçlar vermişlerdir muylle ve ark., 1975 intratekal tedavi uyguladığı hayvanların hızlı bir şekilde iyi olduğunu söylesede daha sonra yayınlanan retrospektif, vaka sunumu ya da çalışmalarda intratekal uygulamanın tedavide ki etkinliği tartışmalıdır. Ayrıca bu çalışmalarda verilen doz miktarı da standardize edilmemiş hatta bazı hastalara birden fazla kez antitoksin uygulaması yapılmış, buna rağmen tedavide başarı elde edilememiştir (Steinman ve ark., 2000; Kay ve Knottenbelt 2007)

Tedavide; toksin kaynağının eliminasyonu, serbest haldeki toksinin nötralizasyonu, ağrının azaltılması, toksine karşı immunitenin şekillendirilmesi ve nöromusküler düzensizliklerin ortadan kaldırılması hedeflenir. Penisilinler bakterinin vejetatif formuna karşı etkilidir ve tetanozun bütün vakalarında endikedir (Green ve ark., 1994). Tedavi süresinde mükemmel bir hasta bakımı gerekmele birlikte, çevresel uyarılardan arı (sessiz, karanlık) bir ortam da gereklidir (Radostits ve ark., 1994). Bizim vakamızda da etkenin duyarlı olduğu bilinen penisilin-dihidrostreptomisin kombinasyonu antibiyotik parenteral olarak kullanıldı. Ayrıca tetanozun muhtemel kontaminasyon yeri olan göbek kordonuna da lokal olarak penisilin uygulandı. Anjos ve ark., (2016) bildirdikleri bir vaka takdiminde 6 günlük tetanoz teşhisi konulmuş bir taya tetanoz antitoksini uygulamışlar. Yapılan uygulama 25,000 IU damar içi, 20,000 derialtı ve 20,000 intratekal olmak üzere toplamda 65,000 IU tetanoz antitoksini kullanmış olmalarına rağmen tedavi de başarı sağlayamamışlardır.

Steinman ve ark., (2000)'nın intratekal antitoksin uyguladıkları tetanoz teşhisi konulmuş 3 taya bildirdikleri vaka takdiminde 5,000 IU intratekal antitoksin günde 1 kez toplamda 2 gün olmak üzere uygulanmış ve bir taya klinik iyileşme gözlenirken diğer iki tay prognozun olumsuz olması dolayısıyla ötenazi edilmiştir. Tedaviye yanıt alınan tayın teşhisi 1 gün önce konulmuş olup diğer iki tay ise 1 haftadır tetanozun klinik semptomlarını gösterdiği bildirilmektedir. Bizim vakamızda da hastanın 1 hafta önce hareket etmede isteksizliğinin olması hastalığın kronik formda iken kliniğimize başvurduğunu düşündürmektedir. Tetanospazminin omurilikte gri maddeye bağlandıktan sonra serbest hale geçmesi olanak dahilinde değildir. Bu yüzden tetanoz vakalarına mümkün olduğunca kısa sürede teşhis konulması ve antitoksin uygulamasının en kısa sürede yapılması hayatidir.

Tetanoz vakalarında kaslardaki düzensizliklerin giderilmesi amacıyla sedatifler uygulanabilir. Bunun yanısıra ağrı yönetimi de önem arz etmektedir. Bu amaçla hayvan karanlık ve sessiz bir otama alınacak çevresel uyarıların önüne geçilmesi amaçlandı. Oral alım olduğu süreçte ağızdan, çene kaslarının spazmı şekillendiği sonraki süreçte ise sonda ile besleme yapıldı. Kay ve Knottenbelt (2007) yayınladıkları retrospektif çalışmada tetanoz teşhis konan tekturaklılarda %50 oranında iyileşme sağladıklarını bildirmişlerdir. İyileşen bu hayvanlardan birçoğu ise 7 güne kadar hospitalize edildiği, hospitalize edilen bu hayvanlarda iyileştikten sonra az miktarda sekel kaldığını ortaya koymuşlardır.

İntratekal uygulama sonrasında tayda herhangi bir yan etki veya komplikasyon gözlenmedi. İatrojenik merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, anesteziye bağlı ölümler ve ekipmanların kontaminasyonu sonucunda sepsis şekillenmesi intratekal uygulamanın potansiyel komplikasyonları arasındadır. Ayrıca Green ve ark., (1994) uygulama sonrasında ayağa kalkamama ve nöbetler gibi bazı komplikasyonlar bildirmişlerdir. Tetanoz vakalarında beşeri hekimlikte steroidler hem lokal hemde sistemik olarak kullanılmaktadır. Tektırnaklılarda ise rutin prosedürde böyle bir uygulama yoktur. Neequaye ve Nkrumah (1983) tetanoz teşhisi konulmuş atlarda steroid uygulamaları, uygulamaya bağlı komplikasyonları önlediği yorumunu yapmaktadır.

## SONUÇ

Tetanoz tektırnaklılarda oldukça ölümcül seyreden enfeksiyöz bir hastalıktır. Hastalık aşılama takvimine tam uyulmayan yeni gelişmekte olan ve ılıman iklim bölgelerinde sporadik olarak seyretmektedir. Hastalıktan korunmak amacı ile doğumdan önce annenin, doğumdan sonra 3 haftalık yaşta ise yavrunun toksoid aşılama ile aşılması önem arz etmektedir.

Hastalığa yakalanan hayvanlarda ise tedavinin en kısa sürede başlanması, antitoksin uygulamalarının mümkün olduğunca kısa sürede yapılması önemlidir. Toksinlerin merkezi sinir sisteminde gri maddeye bağlandıktan sonra uzaklaştırılması mümkün değildir. Bu yüzden toksinlerin merkezi sinir sisteminde nötralizasyonu için intratekal uygulamalar klinik pratikte uygulanabilir manipülasyonlardır. Fakat şu ana kadar elde edilen verilerin bir standartizasyonunun olmaması, çalışmaların genelde vaka takdimi veya retrospektif çalışma özelliğinde olması intratekal tetanoz toksini uygulamasının daha fazla araştırılmaya ihtiyaç duyduğunun göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Anjos, C, Magalhães LQ, Garcia FG, Teixeira BS, Troncha PMR, Silva BT, Nogueira GM 2016. Treatment with intrathecal administration of anti-tetanus toxoid immunoglobulin in neonatal foal tetanus-case report. *Veterinária Notícias*, 22(1): 43-46.
- Coleman, ES 1998. Clostridial neurotoxins: Tetanus and Botulism. *Comp. cont. Educ. pract. Vet.* 20: 1089-1097.
- Cox JH, Murray RC, Debowes RM 1995. Tetanus. In: *The Horse: Diseases and Clinical Management*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 455-457.
- Cullinane AA, Bernard W, Duncan JL, Smith IM Timoney F 1999. Infectious diseases. In: *The Equine Manual*, Higgins AJ, Wright IM, Saunders WB, London, pp: 65-70, 979-980.
- Green SL, Little CB, Baird JD, Tremblay RRM, Smith-Maxie LL 1994. Tetanus in the horse: A review of 20 cases (1970-1990). *Journal of veterinary internal Medicine*, 8: 128-132.
- Hatheway CL 1990. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev.* 3: 66-98.
- Kay G, Knottenbelt DC 2007. Tetanus in equids: a report of 56 cases. *Equine Veterinary Education*, 19(2): 107-112.
- Mayhew IG 1989. *Large Animal Neurology*. Lea and Febiger, Philadelphia. pp: 202-205.
- Montecucco C, Papini E, Schiavo G 1994. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett.* 346: 92-98.
- Montecucco C, Schiavo G 1995. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q Rev Biophys.* 28: 423-472.
- Muylle E, Oyaert W, Ooms L, Decraemere H 1975. Treatment of tetanus in the horse by injections of tetanus antitoxin into the subarachnoid space. *Journal American veterinary medical Association*, 167: 47-48.

- Neequaye J, Nkrumah FK 1983. Failure of intrathecal antitetanus serum to improve survival in neonatal tetanus. *Arch. Dis. Child.* 58: 276-278.
- Poulain B 1994. Molecular mechanism of action of tetanus toxin and botulinum neurotoxins. *Pathol Biol*, 42: 173–182.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC 1994 Tetanus. In: *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, Bailliere Tindall, London. Pp: 677-680.
- Reed SM, Bayly WM, Sellon D C 2017. *Equine Internal Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences. Pp: 668 – 671.
- Steinman A, Haik R, Elad D, Sutton GA 2000. Intrathecal administration of tetanus antitoxin to three cases of tetanus in horses. *Equine Veterinary Education*, 12(5): 237-240.

## Kedi ve köpeklerde postpartum dönem hastalıkları

Gamze Evkuran Dal\*, Zeynep Günay Uçmak

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: gamzevkrn@istanbul.edu.tr

### Özet

Postpartum dönem, doğumu takiben genital organların involusyonu, endometriyumun rejenerasyonu, bakteriyel kontaminasyonun eliminasyonu ve siklik aktivitenin tekrar başlamasını kapsar. Bu dönemin sağlıklı bir şekilde geçirilmesi, fertilitenin devamlılığı için büyük öneme sahiptir. İnvolyon sürecinin büyük bir kısmı dört-altı hafta içerisinde tamamlanır. Bu süreçte rengi yeşilden kırmızı-kahverengine değişen, kötü kokulu olmayan bir vaginal akıntı görülür. Lochia ismi verilen bu akıntı köpeklerde iki-altı hafta; kedilerde ise üç haftadan az bir süre bulunur. Postpartum dönem, yavru zarlarının atılmaması, uterusu ölü yavru kalması, güç doğum, abortus, uterus enfeksiyonları, metabolizma hastalıkları ve beslenme gibi faktörlerden etkilenir. Doğum yapan kedi ve köpeklerde yüksek ateş, iştahsızlık, halsizlik, depresyon, kusma, kötü kokulu vaginal akıntı, vaginal kanama, devam eden ıkmalar, solunum sayısında artış, titreme, laktasyon anomalileri gibi klinik belirtiler postpartum dönem hastalıklarını işaret eder. Ayrıca yavruarda huzursuzluk, sürekli ağlama, neonatal ölümler görülebilir. Bu gibi belirtiler gösteren kedi ve köpekler ivedilikle postpartum kanama, plasental bölgelerin subinvolusyonu, retentio secundinarum, postpartum akut metritis, prolapsus uteri, eklampsia gibi postpartum dönem hastalıkları yönünden muayene edilmeli ve uygun tedavi protokolleri uygulanmalıdır. Bu derlemede kedi ve köpeklerde görülen postpartum hastalıklarının klinik belirtileri, tanı ve tedavisi hakkında bilgi verilmiş, kliniğimize gelen vakalardan örnekler sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Postpartum, Kedi, Köpek, İnvolyon.

### Abstract

The postpartum period involves involution of the genital organs, regeneration of endometrium, elimination of bacterial contamination, and resumption of cyclic activity. The transition of this period in healthy conditions has a great importance for continuity of fertility. The majority of involution process is completed within four-six weeks. An odourless vaginal discharge which changes from green to red-brown is seen during this process. This discharge is termed as lochia, and seen for two-six weeks in bitches and less than three weeks in queen. The postpartum period is influenced by various factors as retention of fetal membranes, fetal death, dystocia, abortion, uterine infections, metabolic diseases and nutrition. Clinical signs as fever, loss of appetite, fatigue, depression, vomiting, malodorous vaginal discharge, vaginal hemorrhage, straining, increased respiratory rate, tremors, and lactation anomalies indicate postpartum diseases. Additionally restlessness, continuous crying, neonatal deaths may be observed in kittens and puppies. Queens and bitches with such symptoms should be promptly examined for postpartum hemorrhage, subinvolution of placental sites, retentio secundinarum, postpartum acute metritis, prolapsus uteri, and eclampsia. Subsequently appropriate treatment protocols should be performed. In this review, information about clinical symptoms, diagnosis and treatment of postpartum diseases in queen and bitch are given and some of the cases which referred to our clinic are presented.

**Keywords:** Postpartum, Queen, Bitch, Involution.

### GİRİŞ

İnvolyon süreci kısaca doğum sonrası uterusun onarılması ve gebelik öncesi boyutuna dönmesi olarak tanımlanır. Bu dönem genital organların involusyonu, endometriyumun rejenerasyonu, bakteriyel kontaminasyonun eliminasyonu ve siklik aktivitenin tekrar başlaması olmak üzere dört önemli aşamayı içerir ve büyük bir kısmı doğumdan dört ila altı hafta sonra tamamlanmış olur. İnvolyon sürecinde lochia denen karakteristik bir vaginal akıntı görülür. Lochia kötü kokulu olmayan, rengi yeşilden kırmızı-kahverengine değişen bir vaginal akıntıdır. Köpeklerde iki-altı hafta; kedilerde ise üç haftadan az bir süre bulunur. Ancak yavru zarlarının atılmaması, uterusu ölü yavru kalması, güç doğum, abortus, uterus enfeksiyonları, metabolizma hastalıkları ve yetersiz, dengesiz beslenme gibi faktörler postpartum süreci olumsuz etkiler. Doğum sonrası annede görülen yüksek ateş, iştahsızlık, halsizlik, depresyon, kusma, kötü kokulu vaginal

akıntı, vaginal kanama, devam eden ıkmalar, solunum sayısında artış, titreme, laktasyon anomalileri gibi klinik belirtiler postpartum dönem hastalıklarını işaret eder. Ayrıca yavrularda huzursuzluk, sürekli ağlama, neonatal ölümler görülebilir. Bu gibi belirtiler gösteren kedi ve köpekler ivedilikle postpartum kanama, plasental bölgelerin subinvolusyonu, retentio secundinarum, postpartum akut metritis, prolapsus uteri, eklampsia gibi postpartum dönem hastalıkları yönünden muayene edilmeli ve uygun tedavi protokolleri uygulanmalıdır (Alaçam, 2008; Noakes, 2001; Pancarcı ve Kaya, 2013; Yıldız ve Akar, 2013).

### **POSTPARTUM KANAMA**

Endochorial tip plaseenta yapısına sahip karnivorlarda, doğum sonrası plasentanın ayrılması sırasında maternal kökenli kanama görülür. Bu kanlı akıntı, uterus hemoglobini olan uteroverdinden ötürü yeşilimtrak kahverengi renktedir. Doğum sonrası herhangi bir komplikasyon şekillenmediyse bu akıntı 12 saat içinde kanlı mukoid bir karaktere dönüşür. Akıntının miktarı çok fazla değildir. Doğum sonrası az miktarda sürekli kanlı vaginal akıntı görülen köpeklerde bu durum kendiliğinden iyileşebilir (Öcal, 2005).

Doğum sonrası uterus mukozasındaki yaralanmalara bağlı kanamalar gelişebilmektedir. Eğer anne ve yavrular sağlıklı ve kanama miktarı az ise annenin sadece gözlem altında tutulması yeterli olabilmektedir. Kanama miktarı fazla ise tedavi amacıyla ergonovin maleat ve oksitosin uygulanmalıdır. Bu uygulamalara rağmen başarı sağlanmıyorsa, kalsiyum yetersizliği veya pıhtılaşma bozuklukları yönünden hasta değerlendirilmelidir. Akut kanamalarda şok belirtileri takip edilmeli, gerekli durumlarda kan transfüzyonu yapılmalıdır (Apaydın, 2005; Yıldız ve Akar, 2013).

Ayrıca plasental bölgenin subinvolusyonu sebebiyle trofoblastik aktivitenin devam etmesine bağlı olarak uterus kanamaları gelişebilir. Özellikle hayvan yattığında belirgin olan, postpartum 12-15 hafta süreyle persistent olarak devam eden kanamalar şeklinde görülebilir. Vaginal sitolojide trofoblast benzeri hücrelerin görüntülenmesi teşhisi güçlendirir. Bu gibi olgularda en radikal tedavi metodu, ovariohisterektomidir. Doğum sonrası oksitosin enjeksiyonunun yapılması profeksi sağlamaktadır (Al-Bassam ve ark., 1981).

### **PLASENTANIN SUBİNVOLUSYONU**

Plasental subinvolusyon; uterus hacminin gebelik öncesi fizyolojik boyutuna erişmesinde gecikme ve endometrial rejenerasyondaki yavaşlama olarak tanımlanır (Apaydın, 2005). Köpeklerde genital kanalın involüsyon süreci yavaştır ve 3 ay kadar sürebilir (Orfanou ve ark., 2009). Kedilerde ise doğum sonrası ilk birkaç gün yoğun gelen vaginal akıntı, azalarak üç hafta sonunda sonlanır (Yıldız ve Akar, 2013). Fiziki muayenede annenin aktif, iştahının yerinde, vücut sıcaklığının normal olduğu ve vulvadan kanlı akıntı geldiği gözlenir. Vulva ve vagina normal görünümündedir. Abdominal palpasyonda tek veya her iki kornu uteri fark edilebilir. Abdominal muayene sırasında uterus boyunca birbirinden ayrı, sert ve genişlemiş alanlar palpe edilebilir. Ayrıca yavruların halsiz ve rektumlarının ödemli olduğu dikkat çeker. Bunun nedeni ise plasental subinvolusyon neticesinde plasentadan absorbe edilerek süte geçen plaseenta sıvıları ve plaseenta döküntülerindeki bozulan proteinlerin yenidoğan yavruları etkilemesidir. Tedavide uterusun boşaltılmasını (aglepriston) ve kontraksiyonların yeniden başlatılmasını (oksitosin) sağlayacak nitelikte ilaçlar seçilmeli, paranteral antibiyotik uygulanmalıdır (Öcal 2005).

### **RETENSİO SEKUNDİNARUM**

Köpek ve kedilerde retensio sekundinarum nadiren görülür. Yavru zarları doğum sırasında genellikle yavruyla birlikte atılır. Bu süre, yavrunun doğumunu takiben birkaç dakikadan bir saate kadar uzayabilir (Alan, 2005). Postpartum dönemde yeşilimtrak siyah akıntı 12 saatten daha uzun bir süre devam ediyorsa retensio secundinarumdan şüphe edilmelidir. Ultrasonografik muayene ile uterusta yavru veya yavru zarlarının kalıp kalmadığı kontrol edildikten sonra uygun tedavi protokolü seçilmelidir (Köse ve Tekeli, 2013). Uterusta ölü yavru kaldığı durumlarda oksitosin veya aglepriston ile medikal sağaltım yapılabileceği gibi ovariohisterektomi gibi cerrahi girişimler de uygulanabilmektedir (Alan, 2005). Yavru zarlarının atılamadığı durumlarda oksitosin ve aglepriston uygulanmalarının yanısıra metilergonovin maleat enjeksiyonları da uterus kontraksiyonlarının artırılmasına, uterus involusyonuna ve postpartum uterus kanamalarının önlenmesine fayda sağlamaktadır (Arabin B., 1986).

### **POSTPARTUM AKUT METRİTİS**

Postpartum akut metritis, erken postpartum dönemde şekillenen ve başta *Escherichia coli* olmak üzere *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Hemophylus* gibi mikroorganizma türlerinin izole edildiği ciddi bir hastalıktır (Alaçam, 2008; Feldman ve Nelson, 2004). Postpartum akut metritis abort, fetal enfeksiyonlar, fetal membranların veya fötusun retensiyonu, güç doğum, doğum ya da doğuma müdahale

esnasında oluşan doku travması sonucu enfeksiyon gelişimi, hijyenik olmayan barınma koşulları gibi sebeplerle meydana gelebilmektedir (Wiebe ve Howard, 2009). Akut metritisin klinik belirtileri yüksek ateş, depresyon, iştahsızlık, letarji, kusma ve kötü kokulu, kırmızı veya kırmızı-kahverengi purulent vaginal akıttır. Ultrasonografik muayenede uterusun içerik ile dolu olduğu görülür. Uygun antibiyotik seçimi için mikrobiyolojik kültür ve antibiyogram testlerinin yapılması önerilir. Tedavi en kısa sürede başlatılmalı, antibiyogram sonuçları elde edilene kadar sistemik, geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmalı, sıvı replasmanı yapılmalıdır. Hastanın genel durumu, uterusu fetal kalıntılar olup olmaması, üreme devamının istenip istenmemesi gibi faktörlere göre medikal ya da cerrahi müdahale ile uterus boşaltılmalıdır. Medikal tedavi amacıyla oksitosin, ergonovin maleat, prostaglandin F<sub>2α</sub> uygulanabilir ancak oksitosin uygulamalarının doğumdan sonraki ilk 24 saat içerisinde yapılması önerilir. Medikal tedaviden yanıt alınmadığı ya da ilk tercihin operatif müdahale olduğu durumlarda ovariohisterektomi ile enfekte doku uzaklaştırılır (Feldman ve Nelson, 2004; Pancarcı ve Kaya, 2013; Yıldız ve Akar, 2013; Wiebe ve Howard, 2009).

### **PROLAPSUS UTERİ**

Prolapsus uteri doğum sırasında veya doğum sonrası ilk 48 saat içinde, uzayan doğum süreci ve abort olguları neticesinde şekillenir (Bigliardi ve ark., 2014). Bununla birlikte, doğumdan 72 saat sonra kedilerde prolapsus uterinin şekillendiği (Sabuncu ve ark., 2017) veya prolapsus uteri varlığında gebeliğin devam ettiği olgular mevcuttur (Günay Uçmak ve ark., 2018). Prolapsus, uterusun bir kısmının ya da her iki kornu uterin vulvadın dışarı çıkması şeklinde görülebilir (Deroy ve ark., 2015). Doğum sırasında oksitosin nedeniyle gelişen güçlü kontraksiyonlar, serviks uterin aşırı genişlemesi, uterus atonisi, pelvik kaslardaki esneklik ve gevşeme, plasental membranların ayrımının tamamlanmaması, mezovaryum ve mezometriyumun rupturu, şiddetli tenesmus prolapsus uteri oluşumunda etkili predispoze faktörlerdir (Roberts ve Straw, 1988). Teşhis; anamnez bilgisi ve prolabe uterus dokusunun inspeksiyonu ile konulur (Bigliardi ve ark., 2014). Prolabe dokudaki ödem, iskemi ve nekroz sonucu oluşan doku hasarının şiddetine bağlı olarak bir tedavi protokolü oluşturulur. Prolabe uterusun manuel yolla itilerek reddedilmesi, abdominal palpasyon ile repozisyonu, dokuya lokal oksitosin ve hiperozmotik serum (%5 dekstroz) infüzyonu, laparotomiye takiben manuel yolla reddetme ve ovariohisterektomi gibi girişimler tedavi seçeneklerini oluşturur (Jutkowitz, 2005; Özyurtlu ve Kaya, 2005). Eğer uterus sağlıklıysa ve prolapsus 1 saat içinde şekillenmişse, anestezi veya analjezi altında prolabe olan uterus manuel yolla reddedilebilir (Biddle ve Macintire, 2000). Öncelikle uterus hafif ılık ve antiseptikli suyla dikkatli bir şekilde temizlendikten sonra suda eriyen kayganlaştırıcılar kullanılarak reddetme işlemi gerçekleştirilir ve steril swab kullanılarak invaginasyon düzeltilir (Öcal 2005). Manuel yolla itilerek reddetme yönteminin başarısız olduğu durumlarda prolabe dokunun cerrahi yolla uzaklaştırılması, prolabe dokunun hasar gördüğü ve doku sağlığının bozulduğu durumlarda ise hastaya ovariohisterektomi uygulanması gerekmektedir (Feldman ve Nelson, 2004; Biddle ve Macintire, 2000).

### **PUERPERAL TETANİ (EKLAMPSİA)**

Eklampsia, hipokalsemidan kaynaklanan akut seyirli bir metabolizma hastalığıdır. Çoğunlukla doğumu izleyen ilk 2 hafta içerisinde, nadiren de gebeliğin son dönemlerinde görülür (Pancarcı ve Kaya, 2013; Root Kustritz, 2006; Wiebe ve Howard, 2009). Kedilerde, köpeklerdekinden daha az görülürken sıklıkla küçük ırk köpekler etkilenir (Yıldız ve Akar, 2013; Wiebe ve Howard, 2009). Eklampsianın sinir ve kas hücreleri üzerinde oldukça uyarıcı etkisi vardır. Hızlı, sık nefes alıp verme, huzursuzluk, kaşıntı gibi lezyonlar ilerleyerek kas seyirmesi ve tremor, generalize nöbetler, ateş, taşikardi, poliüri, polidipsi, kusma ve davranış değişiklikleri görülür (Pancarcı ve Kaya, 2013; Root Kustritz, 2006; Schenck ve Chew, 2008; Yıldız ve Akar, 2013; Wiebe ve Howard, 2009). Serum total kalsiyum seviyesinin 7 mg/dL, aktif iyonize kalsiyum seviyesinin 0,8 mmol/L'nin altına düşmesi tanıyı doğrular (Wiebe ve Howard, 2009). Bazı vakalarda hipoglisemi ve hipomagnezemi de klinik tabloya eşlik eder (Feldman ve Nelson, 2004). Tedavide hedef, kan kalsiyum değerlerinin normal seviyeye çıkarılması olup %10'luk kalsiyum glukonat intravenöz yoldan yavaş infüzyon halinde verilir. Hasta mutlaka yakından monitorize edilmelidir. Hiperventilasyona bağlı respiratorik alkaloz gelişebileceği unutulmamalıdır. Kas tremorlarının devam etmesi durumunda diazepam verilebilir. Şiddetli eklampsia olgularında yavruların süt ikame yemleri ile beslenerek cabergolin uygulamaları ile laktasyonun sonlandırılması gerekebilir (Alaçam, 2008; Pancarcı ve Kaya, 2013; Root Kustritz, 2006; Schenck ve Chew, 2008; Yıldız ve Akar, 2013; Wiebe ve Howard, 2009).



## SONUÇ

Anabilim dalı kliniğimize 2007-2017 yılları arasında 145 köpek ve 136 kedi gebelik ve puerperal dönem hastalıkları sebebiyle başvurmuştur. Doğum sonrası uzun süreli vaginal kanama şikayeti olan 28 köpekte ultrasonografik muayene sonucu plasental bölgelerin subinvolyusyonu tespit edilmiş ve oral metilergonovin maleat uygulaması ile başarılı sonuç elde edilmiştir. Hastalar hemogram değerleri yönünden takip edilmiş, gerekli vakalarda kan yapımını destekleyici ilaçlar uygulanmıştır (Kılıçarslan ve Turna, 2018). Prolapsus uteri kedilerde nadir gözlenen bir durum olmasıyla birlikte gecikmiş prolapsus uteri veya gebelikte eş zamanlı unilateral prolapsus uteri gibi olgular da söz konusu olabilmektedir (Günay Uçmak ve ark. 2018; Sabuncu ve ark. 2017). Kliniğimize gelen vakalardan birinde uterin arterin kopması sonucu hasta eks olmuş, diğer hastalar ise operatif müdahale ile iyileştirilmiştir. Uterus enfeksiyonları sıklıkla rastlanan bir patolojidir. 2007-2017 yılları arasında kliniğimize bu şikayetle 519 köpek ve 188 kedi getirilmiştir. Bu vakaların bir kısmını kistik endometriyal hiperplazi-pyometra kompleks hastaları oluştururken bir kısmını da postpartum dönem uterus enfeksiyonlarından muzdarip hastalar oluşturmuştur. Eklampsia hastalarına kan kalsiyum seviyesi düşüklüğü tespit edildikten sonra kalsiyum glukonat tedavisi yapılmakta, gerekli vakalarda %5 dekstroz ve antipiretik uygulaması ile başarılı sonuç alınmaktadır (Kılıçarslan ve Turna, 2018). Kedi ve köpeklerde postpartum dönem hastalıkları sıklıkla görülmekte, hem annenin hem de yavruların sağlığını tehlikeye atmaktadır. Bu dönemde şekillenen hastalıklar sonucu fertilité olumsuz etkilenebilmekte, hatta yavrularda ve annede ölüm şekillenebilmektedir. Gebe kedi ve köpeklerin gebelik ve doğum aşamaları takip edilmesi, postpartum dönem kontrollerinin mutlaka yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Al-Bassam MA, Thomson RG, O'Donnell L 1981. Involution abnormalities in the postpartum uterus of the bitch. *Veterinary Pathology*, 18: 208-218.
- Alaşam E 2008. Postpartum dönem ve sorunları. Köpek ve kedilerde üreme süreci ve sorunları. Ankara: Medisan, pp. 91-97.
- Alan M 2005. Retensiyo sekundinarum ve puerperal enfeksiyonlar. In: Alaşam E (ed), Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. Ankara: Medisan, pp. 246-247.
- Apaydın AM 2005. Güç doğumlar. In: Alaşam E (ed), Doğum ve İnfertilite. Ankara: Medisan, pp. 195-212.
- Arabin B, Rüttgers H, Kubli F 1986. Effects of routine administration of methylergometrin during puerperium on involution, maternal morbidity and lactation. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 46(4): 215-20.
- Biddle DW, Macintire DK 2000. Obstetrical emergencies. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 15: 88-93.
- Bigliardi E, Di Ianni F, Parmigiani E, Cantoni AM, Bresciani C 2014. Complete uterine prolapse without uterine mucosal eversion in a queen. *Journal of Small Animal Practice*, 55: 235-237
- Deroy C, Bismuth C, Carozzo C 2015. Management of complete uterine prolapse in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, 1: 1-4.
- Feldman EC, Nelson RW 2004. *Canine and feline endocrinology and reproduction*, Philadelphia: Saunders.
- Günay Uçmak Z, Uçmak M, Çetin AC, Tek Ç 2018. Uterine prolapse in a pregnant cat. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 42: 500-502.
- Jutkowitz LA 2005. Reproductive emergencies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35: 397-420.
- Kılıçarslan MR, Turna Ö 2018. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğine Getirilen Vakaların Analizi. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Doğum ve Jinekoloji Özel*, 4(3): 61-67.
- Köse AM, Tekeli T 2013. Köpek ve kedi yavrularında neonatal dönemde karşılaşılan sorunlar. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8(2): 158-165.
- Noakes D 2001. The puerperium and the care of the newborn. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GRW (eds), *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. USA: WB Saunders, pp. 189-202.
- Orfanou DC, Ververidis HN, Pourlis A, Fragkou IA, Kokoli AN, Boscoc CM, Taitzoglou IA, Tzora A, Nerou CM, Athanasiou L, Fthenakis GC 2009. Post-partum involution of the canine uterus - gross anatomical and histological features. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl (2): 152-155.
- Öcal H 2005. Puerperal dönem ve sorunları. In: Alaşam E. (ed), Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. Ankara: Medisan, pp. 219-220.

- Özyurtlu N, Kaya D 2005. Unilateral uterine prolapse in a cat. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 941-943.
- Pancarlı ŞM, Kaya D 2013. Puerperal dönem fizyolojisi ve sorunları. In: Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A (eds), Kedi ve köpeklerde doğum ve jinekoloji. Malatya: Medipres, pp. 211-221.
- Roberts D, Straw RC 1988. Uterine prolapse in a cat. Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian, 10: 1294-1296.
- Root Kustritz MV 2006. Clinical management of pregnancy in cats. Theriogenology, 66: 145-150.
- Sabuncu A, Evkuran Dal G, Enginler SÖ, Karaçam E, Toydemir TSF, Uçmak M 2017. Feline unilateral uterine prolapse: A description of two cases. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 43 (1): 67-70.
- Schenck PA, Chew DJ 2008. Hypocalcemia: a quick reference. Veterinary Clinics Small Animal Practice, 38: 455-458.
- Yıldız H, Akar Y 2013. Puerperal dönem fizyolojisi ve sorunları. In: Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A (eds), Kedi ve köpeklerde doğum ve jinekoloji. Malatya: Medipres, pp. 423-434.
- Wiebe VJ, Howard JP 2009. Pharmacologic advances in canine and feline reproduction. Topics in Companion Animal Medicine, 24 (2): 71-99.

## TiO<sub>2</sub> Nanotüp Dizinleri ile Acid Orange 7 Boyarmaddesinin Fotokatalitik Oksidasyonu

Özlem Esen Kartal\*, Hüseyin Karakurt

İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:ozlem.kartal@inonu.edu.tr

### Özet

Endüstriyel atıksularda bulunan organik kirleticilerin giderimine yönelik olarak son yıllarda heterojen ileri oksidasyon prosesleri geliştirilmiştir. Bu proseslerde organik kirleticiler UV ya da güneş ışığı varlığında TiO<sub>2</sub> gibi yarı iletkenlerin fotokatalizör olarak kullanılmasıyla oluşturulan OH<sup>·</sup> radikalleri ile giderilmektedir. Nano yapıları TiO<sub>2</sub> fotokatalizörleri nanoparçacık, nanotel, nanoçubuk ve nanotüp gibi birçok morfolojik yapıda bulunmaktadır. Bu yapılar içinde TiO<sub>2</sub> nanotüpler (TiNT) yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle fotokatalitik uygulamalarda tercih edilmektedir. TiNT elektrokimyasal anodik oksidasyon, kalıp ve hidrotermal gibi yöntemlerle elde edilmektedir. Bu çalışmada dizin halinde TiNT oluşumuna olanak sağlaması açısından elektrokimyasal anodik oksidasyon yöntemi uygulanmıştır. TiNT ağırlıkça % 0.4 NH<sub>4</sub>F ve % 2 damıtık su içeren 200 mL etilen glikol elektrolit çözeltisi kullanılarak 30 V gerilim altında oda sıcaklığında 3 saat boyunca karıştırma ortamında anodizasyon işlemi gerçekleştirilerek elde edilmiştir. Elde edilen TiNT'in karakterizasyonu SEM ve XRD ile yapılmıştır. Sentezlenen TiNT Acid Orange 7 azo boyarmaddesinin fotokatalitik oksidasyon ile gideriminde kullanılmıştır. Boyarmade başlangıç derişiminin etkisi incelendiğinde, 5, 10 ve 20 ppm derişimlerinde 300 dakika sonunda sırasıyla %91, %40 ve %21 renk giderimi elde edilmiştir. Reaksiyon ortamına Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> eklenmesiyle fotokatalitik etkinliğin arttığı görülmüştür. UV ışını yerine güneş ışığı kullanıldığında 10 ppm derişimindeki boyarmade çözeltisine 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> eklenmesi ile 300 dakika sonunda %95 renk giderimi elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** TiO<sub>2</sub> nanotüp, anodik oksidasyon, Acid Orange 7, renk giderimi

### Photocatalytic Oxidation of Acid Orange 7 via TiO<sub>2</sub> Nanotube Array

#### Abstract

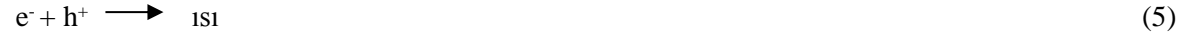
In recent years heterogeneous advanced oxidation processes have been developed for removal of organic contaminants present in industrial wastewaters. In heterogeneous advanced oxidation processes organic contaminants are removed via generation of OH<sup>·</sup> radicals by use of semiconductors such as TiO<sub>2</sub> as a photocatalyst in the presence of UV or solar lights. Nanostructured TiO<sub>2</sub> photocatalysts can be found in different morphological structures such as nanoparticle, nanowire, nanorod and nanotube. In these morphological structures TiO<sub>2</sub> nanotubes (TiNT) are preferred in photocatalytic application due to their high surface/volume ratio. TiNT can be synthesized via anodic oxidation, template and hydrothermal methods. In this study TiNT were synthesized via anodic oxidation method because of allowance for formation of TiNT arrays. They were obtained by conducting anodization process in an electrolyte solution composed of % 0.4 NH<sub>4</sub>F, % 2 water and ethylene glycol under a voltage of 30 V for 3 hours. TiNT arrays were characterized by SEM and XRD analyses. They were used for the photocatalytic oxidation of Acid Orange 7 azo dye. When the effect of initial dye concentration was examined, it was found that 91%, 40% and 21% decolorization values were obtained at 5, 10 and 20 ppm dye concentration values after 300 min reaction time, respectively. When solar light was used instead of UV light, 95% decolorization level was reached within 300 min reaction time with 10 ppm dye concentration and 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.

**Keywords:** TiO<sub>2</sub> nanotube, anodic oxidation, Acid Orange 7, decolorization

#### GİRİŞ

Yarı iletkenlerin fotokatalizör olarak kullanıldığı heterojen ileri oksidasyon proseslerinde organik bileşikler UV ışını varlığında oluşturulan OH<sup>·</sup> radikalleri ile giderilmektedir. Heterojen ileri oksidasyon proseslerinde TiO<sub>2</sub>, ZnO, CdS ve WO<sub>3</sub> gibi yarı iletkenler kullanılmakla birlikte, geniş bir pH aralığında kararlı olması, ucuz olması ve toksik olmaması nedeniyle TiO<sub>2</sub> yaygın olarak kullanılmaktadır. TiO<sub>2</sub> eşik enerjisine eşik ya da daha büyük bir enerji ile uyarıldığında elektronlar değerlik bandından iletkenlik bandına geçer ve böylece elektron

(e<sup>-</sup>) ve boşluk (h<sup>+</sup>) çiftleri oluşur (Eşitlik 1). Oluşan h<sup>+</sup> yüzeyde adsorplanmış olan H<sub>2</sub>O ve OH<sup>-</sup> ile reaksiyona girerek OH<sup>•</sup> radikalini oluşturur (Eşitlik 2 ve 3). e<sup>-</sup> ise yüzeyde adsorplanmış olan O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek süperoksit anyonunu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturur (Eşitlik 4). Oluşan e<sup>-</sup> - h<sup>+</sup> çiftlerinin bazıları yeniden birleşebilir (Eşitlik 5) (Legrini, ve ark., 1993; Chomg ve ark., 2010).



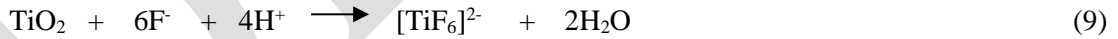
OH<sup>•</sup> radikali yüksek oksidasyon potansiyeline sahip (2.8 V) bir radikal olup organik bileşikleri hidrojen ayrılması ya da elektron transferi yöntemi ile parçalamaktadır. TiO<sub>2</sub>/UV prosesi ile özellikle biyolojik olarak giderilemeyen bileşiklerin ya tamamen mineralizasyonu sağlanarak CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O gibi toksik olmayan ürünlere ya da biyolojik olarak giderilebilen ara ürünlere dönüştürülmesi mümkündür (Soares ve ark., 2017). İOP'lerinde oluşan e<sup>-</sup> - h<sup>+</sup> çiftlerinin yeniden birleşmesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>, ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>, BrO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve IO<sub>4</sub><sup>-</sup> gibi O<sub>2</sub>'den daha etkin elektron alıcı oksidantların reaksiyon ortamına eklenmesi fotokatalitik oksidasyon hızını arttırmaktadır (Bekkouche ark., 2017).

Endüstriyel faaliyetler içinde tekstil endüstrisi renkli ve çok miktarda atıksu çıkartan endüstrilerden birisidir. Bu atıksularda BOD/COD oranının yaklaşık 0.25 olması biyolojik olarak giderimin zorluğunu göstermektedir. Yapılarındaki kromofor grup olan azo (-N=N-) grubu ile karakterize edilen azo boyarmaddeleri içeren tekstil atık suları aerobik koşullarda giderilememekte ve anaerobik koşullarda yapılan giderimde ise boyarmaddeden daha toksik aromatik aminler oluşmaktadır. Bu nedenle azo yapıdaki boyarmaddeleri içeren atıksuların arıtılmasında yetersiz kalan biyolojik arıtım yerine TiO<sub>2</sub>/UV prosesinin uygulanması su kirliliğini önlemek açısından büyük önem taşımaktadır (Zangeneh ve ark., 2015; Oller ve ark., 2011).

TiO<sub>2</sub>/UV prosesinde nanoparçacık, nanotel, nanoçubuk ve nanotüp gibi birçok morfolojik yapıda TiO<sub>2</sub> fotokatalizörleri kullanılmaktadır. Bu yapılar içinde TiO<sub>2</sub> nanotüpler (TiNT) yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları nedeniyle fotokatalitik uygulamalarda tercih edilmektedir (Bavykin ve Walsh 2010). TiNT elektrokimyasal anodik oksidasyon, kalıp ve hidrotermal gibi yöntemlerle elde edilmektedir. Bu çalışmada dizin halinde TiNT oluşumuna olanak sağlaması açısından elektrokimyasal anodik oksidasyon yöntemi uygulanmıştır. Anodik oksidasyon boyunca hücrede aşağıda yazılan elektrokimyasal tepkimeler (Eşitlik 6-8) oluşur (Grimes ve Mor, 2009):



Florür iyonları ya oksit tabakasıyla etkileşir ya da Ti<sup>4+</sup> iyonları ile tepkimeye girer (Eşitlik 9-11).



## MATERYAL VE METOT

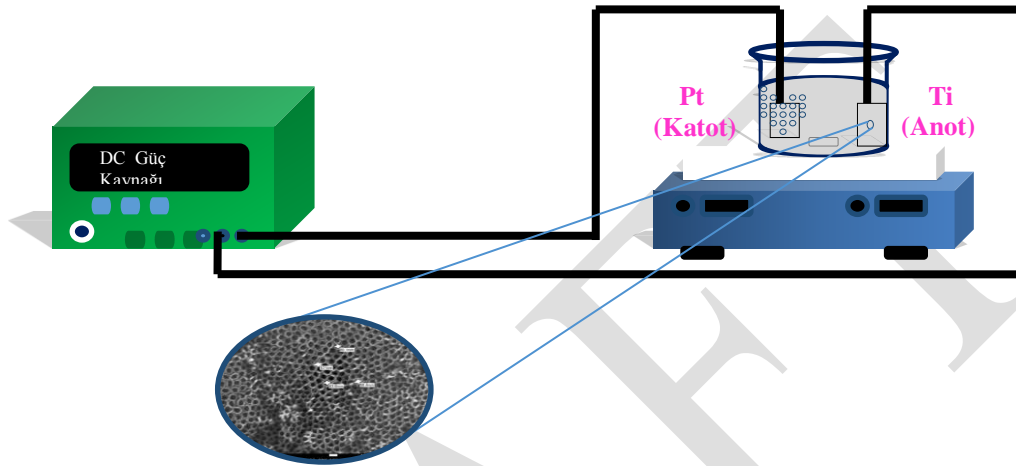
### Materyal

TiO<sub>2</sub> nanotüp (TiNT) sentezinde Ti plaka (0.25 mm kalınlığında, %99.7, Sigma Aldrich), Pt plaka, NH<sub>4</sub>F (Merck), etilen glikol (Carlo Erba) ve etil alkol (Merck) kullanılmıştır. Fotokatalitik oksidasyon deneyleri azo boyarmadde olarak Acid Orange 7 (AO7, DyStar) ve oksidant olarak Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Merck) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fotokatalitik oksidasyon deneylerinden sonra TiNT filmlerin yıkanmasında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, %35) kullanılmıştır.

### TiO<sub>2</sub> Nanotüplerin (TiNT) Sentezi

TiNT film elektrokimyasal anodik oksidasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi 2 elektrotlu elektrokimyasal hücrede gerçekleştirilmiştir. Anot olarak 2x2 cm<sup>2</sup> boyutunda kesilmiş Ti plaka ve katot olarak da aynı boyutta Pt plaka kullanılmıştır. Elektrotlar arasındaki uzaklık 1.2 cm olarak tutulmuştur (Şekil 1). Ti plaka zımpara kağıdı ile fiziksel olarak parlatıldıktan sonra Pt plaka ve Ti plakaya ultrasonik banyoda (KUDOS SK06GT) önce etil alkol ile 20 dakika ve daha sonra damıtık su ile 10 dakika

yağ giderme işlemi uygulanmıştır. Bu iki elektrot hava ortamında 50 °C’de 30 dakika kurutulmuştur. Elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi ağırlıkça % 0.4 NH<sub>4</sub>F ve % 2 damıtık su içeren 200 mL etilen glikol elektrolit çözeltisi kullanılarak 30 V gerilim altında, oda sıcaklığında, 3 saat boyunca yapılmıştır. İşlem sırasında elektrolit çözeltisi manyetik karıştırıcı (WiseStir MSH-20D) ile karıştırılmış ve sisteme gerilim DC güç kaynağı (GoldStar GP-430 3D) ile uygulanmıştır. Elektrokimyasal anodizasyon işleminden sonra TiNT üzerinde oluşan ve ‘nanograss’ olarak adlandırılan yapıları uzaklaştırmak için TiNT film ultrasonik banyoda etil alkol ile 30 s süreyle yıkanmış ardından da damıtık su ile yıkanıp hava ortamında 100 oC sıcaklıkta 1 saat kurutulmuştur. Elde edilen TiNT film 400oC’de 3 saat kalsine edilmiştir. Sentezlenen TiNT filmin karakterizasyonu XRD (X Işını Difraktometresi, 1.54050 Å, CuKα, Rigaku RadB-DMax II) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu, LEO EVO40) ile yapılmıştır.

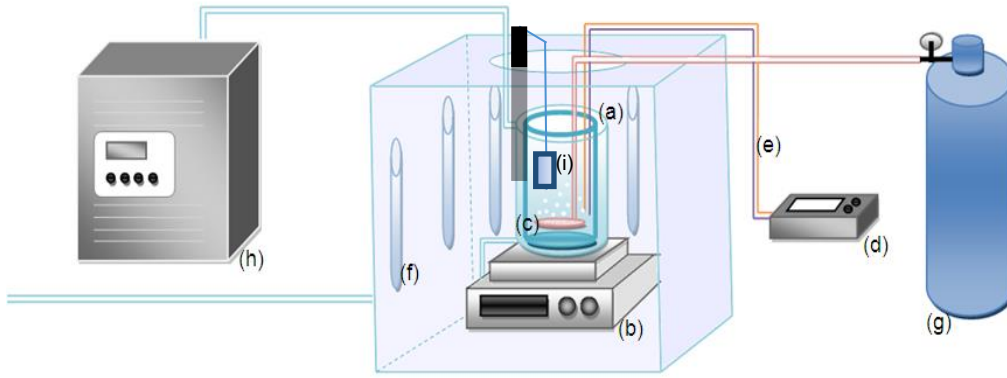


Şekil 1. Elektrokimyasal anodik oksidasyon yöntemi ile TiNT sentezi

### Fotokatalitik Oksidasyon Deneyleri

Fotokatalitik oksidasyon deneyleri Şekil 2’de gösterilen deney düzeneğinde yapılmıştır. Deney düzeneği kuvarz camdan yapılmış ceketli bir fotoreaktör, 14 adet 8 W UV A lamba (Topbulb), pH metre (Metler Toledo Seven Compact), manyetik karıştırıcı (IKA RH-KTC), rotametre, gaz dağıtıcı ve oksijen tüpünden oluşmaktadır. Belirlenen derişimde hazırlanan AO7 çözeltisinin pH’ı 3’e ayarlandıktan sonra hazırlanan TiNT dizini boyarmadde çözeltisine daldırılmış ve UV lamba açılmadan 30 dakika karıştırılarak boyarmaddenin renk giderimine adsorpsiyonun etkisi incelenmiştir. Daha sonra lambalar açılarak fotokatalitik oksidasyon deneyleri başlatılmıştır. Deneysel çalışmalarda renk giderimine başlangıç AO7 derişimi (5-20 mg/L),çözeltiye eklenen Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>8</sub> miktarı (1-5 mM) ve kullanılan ışık kaynağının (UV A ve güneş ışığı) etkileri araştırılmıştır. Güneş ışığı varlığında yapılan fotokatalitik oksidasyon deneyi 7 Mayıs 2019 tarihlerinde saat 11:00-16.00 arasında Malatya (38°19’E, 38°21’ N)’da gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aynı şartlarda (5 mg/L AO7, UV A) art arda 5 deney yapılp sonuçları karşılaştırılarak TiNT fotokatalizörünün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Reaksiyon süresince belirli zaman aralıklarında sistemden örnek alınarak absorbans değerleri UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV-1800) ile ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinden % renk giderimi (Eşitlik 12) belirlenmiştir.

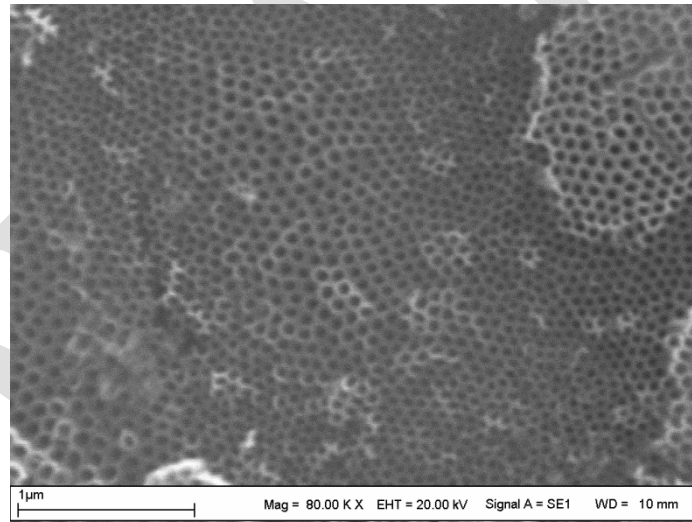
$$\% \text{ Renk Giderimi} = \frac{A_0(491 \text{ nm}) - A(491 \text{ nm})}{A_0(491 \text{ nm})} \times 100 \quad (12)$$



**Şekil 2.** Deney düzeneği. (a) kuvarz fotoreaktör, (b) manyetik karıştırıcı, (c) gaz dağıtıcı, (d) pH Metre, (e) sıcaklık probu, (f) UV-A lamba, (g) oksijen tüpü, (h) su banyosu

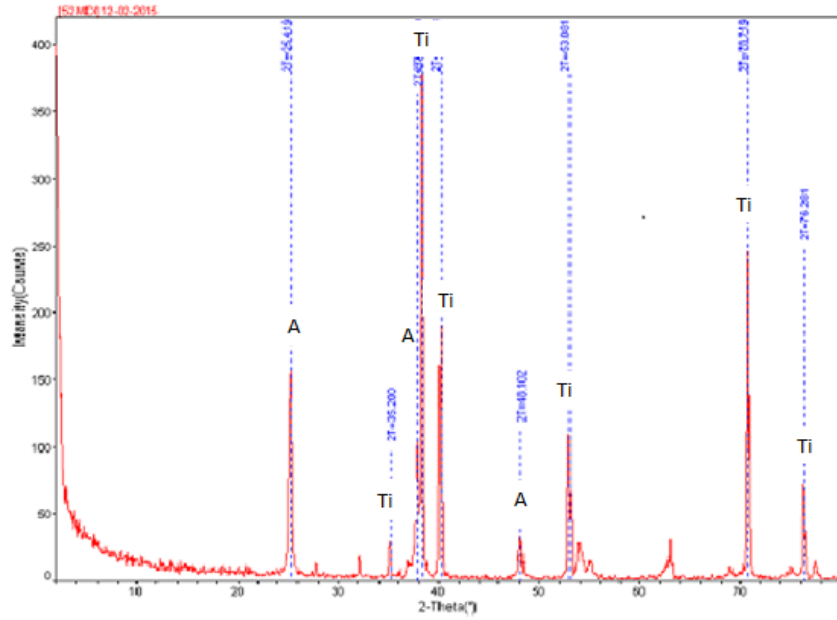
### BULGULAR VE TARTIŞMA

Ağırlıkça % 0.4  $\text{NH}_4\text{F}$  ve % 2 damıtık su içeren 200 mL etilen glikol elektrolit çözeltisi kullanılarak 30 V gerilim altında, oda sıcaklığında, 3 saat boyunca gerçekleştirilen anodik oksidasyon işlemi sonunda Ti folyo yüzeylerinde oluşan  $\text{TiO}_2$  tabakalarının Şekil 3'deki SEM görüntüsünden yüzeyde homojen sayılabilecek durumda nanotüp dizinlerinin oluştuğu görülmüştür.

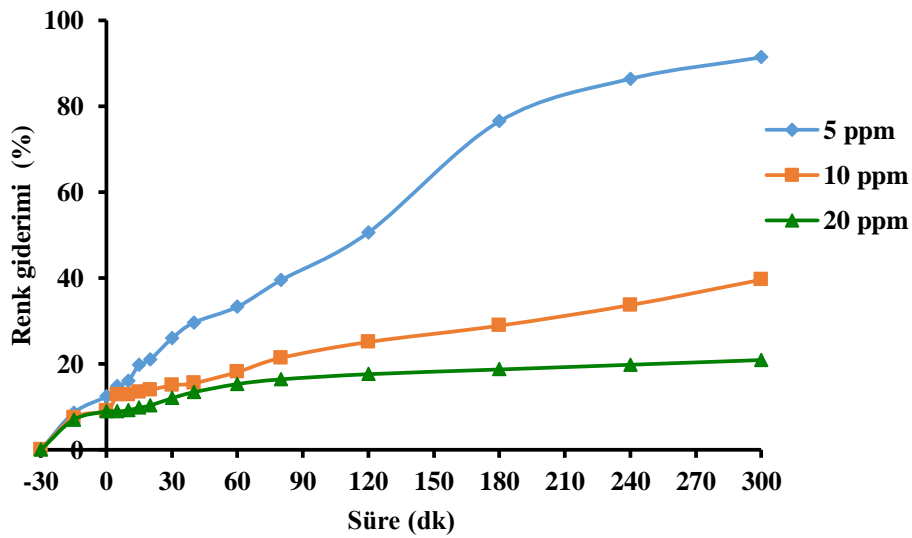


**Şekil 3.** Ti tabaka yüzeyinde oluşan TiNT dizinlerinin SEM görüntüsü

Şekil 4'den görüldüğü gibi, TiNT dizinlerine 400 °C'de 3 saat boyunca kalsinasyon işlemi uygulanması sonunda  $2\theta = 25.419^\circ$  değerinde anataz fazı oluşmuştur. Ayrıca Ti elementine ait pikler de görülmektedir.

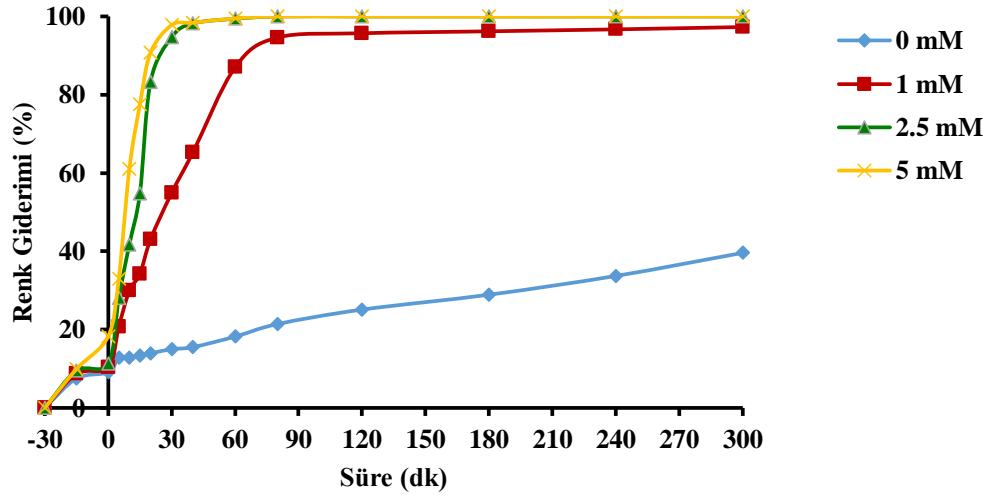


Şekil 4. Anodik oksidasyon işlemi sonucu elde edilen TiNT'lerin 400°C'de 3 saat kalsinasyon yapıldıktan sonra alınan XRD kırınım spektrumu (A: Anataz, R: Rutil, Ti:Ti elementi)



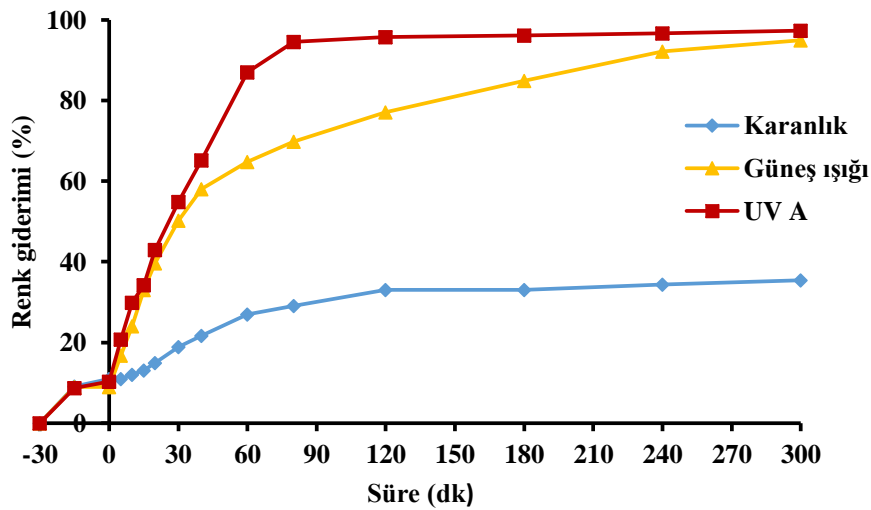
Şekil 5. % renk giderimine başlangıç AO7 derişiminin etkisi

Şekil 5'de AO7 boyarmaddesinin başlangıç derişiminin % renk giderimine etkisi görülmektedir. 5, 10 ve 20 ppm başlangıç derişimlerdeki AO7 çözeltileri için 300 dakika sonunda sırasıyla %91.4, %39.6 ve %20.9 renk giderimi değerleri elde edilmiştir. Boyarmadde başlangıç derişimi arttıkça katalizör yüzeyinde daha fazla boyarmadde adsorplandığından OH<sup>-</sup> iyonlarının adsorplanacağı kısımlar kısıtlanmakta ve böylece OH<sup>-</sup> radikalinin oluşumu azalmaktadır (Rauf ve ark., 2011). Bunun sonucunda da boyarmadde derişimi arttıkça giderim azalmaktadır. Ayrıca UV lamba açılmadan 30 dakika boyunca TiNT dizinleri varlığında boyarmadde çözeltileri karıştırılarak adsorpsiyonla giderim incelendiğinde fotokatalitik oksidasyonla giderim yanında ihmal edilecek boyutta adsorpsiyonla giderim gözlenmiştir.



Şekil 6. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> derişiminin % renk giderimine etkisi

AO7 boyarmaddesinin renk giderimine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> derişiminin etkisini incelemek amacıyla 10 ppm derişimindeki AO7 boyarmadde çözeltisine 1, 2.5 ve 5 mM derişimlerinde Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> eklenmiştir. Şekil 6'dan görüldüğü gibi Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanılmadan yapılan deneyde 300 dk sonunda %39.6 renk giderimi elde edilirken, 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanıldığında %97.3 renk giderimi elde edilmiştir. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> derişimi arttıkça renk gideriminin de arttığı gözlenmiştir. TiO<sub>2</sub>'in eşik enerjisine eşit ya da daha büyük bir enerji ile uyarılmasıyla oluşan e<sup>-</sup> - h<sup>+</sup> çiftlerinden bazıları birleşerek fotokatalitik aktiviteyi düşürmektedir. Ortama eklenen Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> elektronları tutarak % renk giderimini artırmaktadır (Bekkouche ark., 2017).

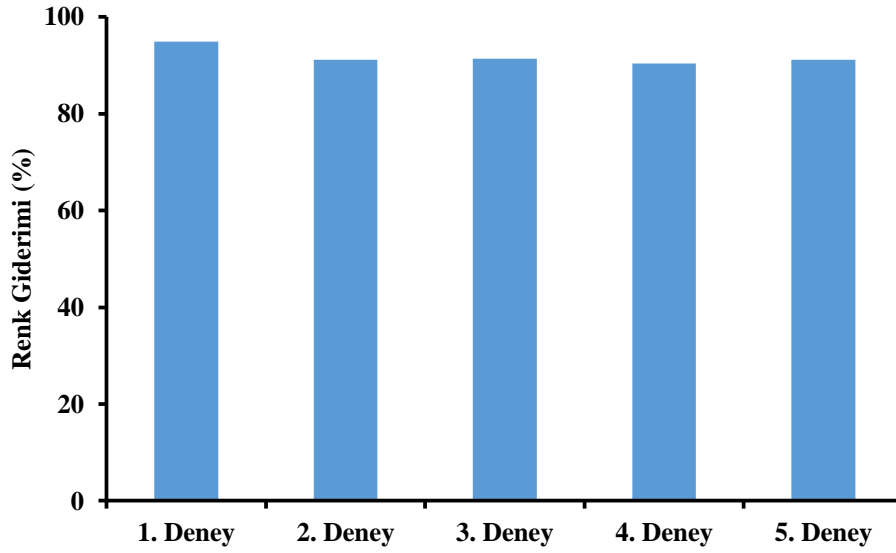


Şekil 7. Farklı ışık kaynakları kullanımının % renk giderimine etkisi ([Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]= 1 mM)

UV A lamba açılmadan 10 ppm derişiminde AO7 boyarmaddesi ve 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanılarak karanlıkta yapılan deneyde 300 dakika sonunda % 35.4 renk giderimi elde edilirken UV A lamba varlığında aynı koşullarda yapılan deneyde % 97.3 renk giderimi elde edilmiştir. UV A lamba yerine güneş ışığı varlığında deney yapıldığında ise 300 dakika sonunda %95 renk giderimi elde edildiği gözlenmiştir. Enerji Bakanlığı tarafından hazırlanan Türkiye'nin Güneş Enerjisi Potansiyeli Atlasına (GEPA) göre, yıllık toplam güneşlenme süresi 2741 saat (günlük ortalama 7.5 saat), yıllık toplam gelen güneş enerjisi 1.527 kWh/m<sup>2</sup>yıl (günlük



ortalama 4.18 kWh/m<sup>2</sup>gün) olduğu belirlenmiştir. TiO<sub>2</sub>/UV prosesi ile tekstil atıksularının arıtılmasında ülkemizde güneş ışığı kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.



Şekil 8. TiNT dizinlerinin tekrar kullanılabilirliği

5 ppm başlangıç derişimindeki AO7 boyarmadde çözeltisi ile UV A ışık kaynağı varlığında aynı TiNT dizinleri kullanılarak yapılan 5 deneyde 300 dk sonunda sırasıyla % 94.9, %91.1, %91.4, %90.4 ve %91.1 değerlerinde renk giderimi elde edilmiştir. Bu sonuçlar TiNT dizinlerinin tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir.

## SONUÇLAR

Boyarmadde derişiminin artması ile renk gideriminin azaldığı görülmüştür. 10 ppm boyarmadde derişiminde Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanılmadan yapılan deneyde 300 dk sonunda %39.6 renk giderimi elde edilirken, 1 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> kullanıldığında %97.3 renk giderimi elde edilmiştir. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> derişimi arttıkça renk gideriminin de arttığı gözlenmiştir. UV A lamba yerine güneş ışığı varlığında deney yapıldığında ise 10 ppm boyarmadde derişiminde 300 dakika sonunda %95 renk giderimine ulaşılmıştır. Elde edilen TiNT dizinlerinin 5 denemr sonunda tekrar kullanılabilirliği gözlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013/65 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Bavykin DV, Walsh FC 2010. Titanate and titania nanotubes synthesis, properties and applications, Royal Society of Chemistry Publishing, UK.
- Bekkouche S, Merouani S, Hamdaoui O, Bouhelassa M 2017. Efficient photocatalytic degradation of Safranin O by integrating solar-UV/TiO<sub>2</sub>/persulfate treatment: Implication of sulfate radical in the oxidation process and effect of various water matrix components, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 345: 80-91.
- Chong MN, Jin B, Chow CWK, Saint C 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. Water Research, 44: 2997-3027.
- Grimes CA, Mor GK 2009. TiO<sub>2</sub> nanotube arrays synthesis, properties and applications, Springer, NY.
- Legrini D, Oliveros E, Braun AM 1993. Photochemical Processes for Water Treatment. Chemical Reviews, 93: 671-698.
- Oller I, Malato S, Sanchez-Perez JA 2011. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination-A review. Science of the Total Environment, 409: 4141-4166.

- Rauf MA, Meetani MA, Hisaindee S 2011. An Overview on the photocatalytic degradation of azo dyes in the presence of TiO<sub>2</sub> doped with selective transition metals. *Desalination*, 279: 13-27.
- Soares PA, Souza R, Soler J, Silva TFCV, Souza SMA, Boaventura RAR, Vilar VJP 2017. Remediation of a synthetic textile wastewater from polyester-cotton dyeing combining biological and photochemical oxidation processes. *Separation Purification Technology*, 172: 450-462.
- Zangeneh H, Zinatizadeh AAL, Habibi M, Akia M, Hasnain Isa M 2015. Photocatalytic oxidation of organic dyes and pollutants in wastewater using different modified titanium dioxides: A comparative review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26: 1-36.

DRAFT

## Eskişehir ilinde yayılış gösteren *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik araştırmalar

Derviş Öztürk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: dervisozturkk@gmail.com

### Özet

2017-2019 yılları arasında Eskişehir’de farklı lokalitelerinden toplanan *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) türleri üzerine taksonomik çalışmaları kapsamaktadır. Eskişehir ilinin floristik açıdan ülke içerisindeki konumu irdelendiğinde İran- Turan fitocoğrafik bölgesinde yer almasına rağmen sahip olduğu değişik habitatlar birçok farklı fitocoğrafik elementlerini bünyesinde bulundurmasını sağlamıştır. Convolvulaceae (Sarmaşıkgiller) ailesinden ülkemizde 4 cins ve 40 türü doğal yayılış gösterir. Süs bitkisi olarak yetiştirilir, gıda olarak kullanılan türleri vardır. Türlerin teşhisinde başta, Flora of Turkey (Davis,1965-1988) adlı eser olmak üzere birçok kaynaktan faydalanılmıştır. *Convolvulus* L. taksonları için vejetasyon dönemi Nisan-Eylül arası olup, bir taksona ait çiçekli ve meyveli örnekler toplanmıştır. APG3 sistemine göre Eskişehir ilinde bulunan *Convolvulus* L. genusu yer alan 2’si endemik olan 7’si endemik olmayan 9 farklı taksonun genel görüntüsünün yanı sıra; çiçek yapısı (anter, filament, sepal ve petal, kaliks vb.), yaprak, meyve, tohum yapıları gibi morfolojik karakterlerin ölçümleri yapılarak CANON EOS marka fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiştir. Bitkilerin çiçeklenme, habitat ve yaşam formları, genel ve bölgesel yayılışları, IUCN kategorileri ve toplandığı lokaliteler hakkında da bilgiler verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Convolvulus* L., Morfoloji, Habitat, Eskişehir

### İngilizce Başlık: Times new roman, 11 punto, bold ve sadece başlığın ilk harfi büyük

### Abstract

It covers taxonomic studies on *Convolvulus* L. (Convolvulaceae) species collected from different localities in Eskişehir between 2017-2019. When the floristic position of Eskişehir is examined in the country, although it is located in the Iranian-Turanian phytogeographical region, its different habitats have enabled it to contain many different phytogeographical elements. Convolvulaceae (Sarmaşıkgiller) family in our country of 4 genus and 40 species shows natural distribution. Grown as ornamental plants, there are species used as food. Species identification, Flora of Turkey (Davis, 1965-1988) has been used in many sources, including the work. The vegetation period for *Convolvulus* L. taxa was between April and September and flowering and fruiting specimens of a taxon were collected. According to the APG3 system, in addition to the general view of 9 different taxa, 2 of which are endemic and 7 of which are not endemic; flower structure (anther, filament, sepal and petal, calyx, etc.), leaf, fruit, seed structures were measured and morphological characters were measured and photographed with CANON EOS camera. Information on flowering, habitat and life forms of plants, general and regional distributions, IUCN categories and localities are also given.

**Keywords:** *Convolvulus* L., Morphology, Habitat, Eskişehir

### GİRİŞ

Eskişehir ili İç Anadolu Bölgesinin Kuzeybatısında, 29° 58’ ve 32° 04’ Doğu boylamları ile 39° 06’ ve 40° 09’ Kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Yüzölçümü 13.901 km<sup>2</sup> dir. Türkiye İçinde kapladığı alan oranı % 1,7’dir. Doğuda Ankara, Güneyde Konya ve Afyon, Batıda Kütahya ve Bilecik, Kuzeyde Bilecik, Bolu ve Ankara illeri ile çevrilidir. İl merkezinin denizden yüksekliği 801 m’dir. Türkiye’nin floristik çeşitliliğinin önemli nedenlerinden birkaçı edafik, jeolojik, jeomorfolojik çeşitlilik ve farklı topoğrafik yapılarıdır. Türkiye florası 154 familyaya ait 1.220 cins ve 11.707 tür ve tür altı takson ile temsil edilmektedir. Türkiye sahip olduğu 11707 tür ve türaltı takson ile dünyada en zengin floraya sahip ülkelerden biridir. İç Anadolu’da stepin floristik bilançosu Türkiye Florasından yapılan araştırmaya göre tür sayısı 2000 den fazladır. İç Anadolu’nun floristik zenginliğinin yanında endemik türlerinin sayısının fazla olması önemlidir (Akman, 2014). İç Anadolu steplerinde özellikle Labiatae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Crucifera, Boraginaceae, Cistaceaece Leguminosae familyalarına ait türler çoğunluktadır (Akman, 2014). Eskişehir ilinin floristik açıdan ülke içerisindeki konumu irdelendiğinde İran- Turan fitocoğrafik bölgesinde yer almasına rağmen sahip olduğu değişik habitatlar birçok farklı fitocoğrafik elementlerini bünyesinde bulundurmasını sağlamıştır.

*Convolvulus* L. cinsinin modern anlamda tanımlanması ise ilk kez 18 yy. sonlarında rastlanmaktadır. Bu dönemde cins üyesi taksonlar filiform stigmaları, küçük braktelerin koltuklarından çıkan aksiller çiçekleri ve bilokular ovaryumları ile diğer Convolvulaceae cinslerinden ayrılmışlardır. Fakat *Convolvulus* L. cinsi üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların artması ve taksonominin ilerlemesi ile birlikte önceden *Convolvulus* L. cinsi içinde kabul edilen birçok tür farklı cinslere aktarılmıştır (Austin, D. F., 1973-2000).

## MATERYAL VE METOT

Araştırma alanından toplanan *Convolvulus* L. çiçeklenme ayları olan Mayıs ve Temmuz aylarında 2018-2019 'da Eskişehir'de toplandı. Örnekler toplanırken her bir bitki örneğinin kök, gövde, yaprak, ve çiçeğe sahip olmasına dikkat edildi. Toplanan örneklerin ölçümleri yapıldıktan sonra bir kısmı herbaryum kurallarına göre kurutulmuş herbaryum materyali haline getirildi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi herbaryumunda (OUEF) saklanmaktadır. *Convolvulus* L. tanımlanması için Türkiye Florası kullanılmıştır. Morfolojik incelemeler, arazi çalışması sırasında yapılan gözlemler, toplanan canlı örnekler, herbaryum örnekleri üzerinde yapıldı. Taze bitki örneklerinden bazıları morfolojik ölçümler için kullanılmış ve detaylı açıklamaları hazırlanmıştır. Türün koruma statüleri IUCN tehdit kategorilerine göre değerlendirildi (Ekim ve ark. 2000, IUCN 2001). Canon D5300 fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekildi.

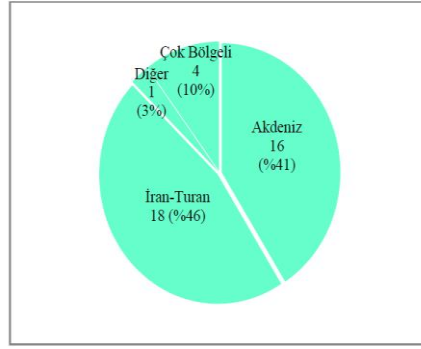
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren *Convolvulus* L. cinsi toplam 39 takson altında değerlendirilmiş ve bu taksonlardan 10 tanesi ülkemize özgü endemik olarak belirtilmiştir. Araştırma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları sırasında bu cinse ait toplanan yaklaşık 50 herbaryum materyali üzerinde morfolojik incelemeler yapılmıştır. Convolvulaceae (Sarmaşıkçiller) ailesinden ülkemizde 4 cins ve 39 türü doğal yayılış gösterir (Menemen ve ark., 2002, Feinbrun-Dothan, N. 1978, Boissier, E., 1879). Süs bitkisi olarak yetiştirilir, gıda olarak kullanılan türleri vardır (Baytop, T. 1994). Bir kısmı yatık veya sarılıcı, bir veya çok yıllık otsular veya çalılardır. Çiçekler yaprak koltuklarında tek veya kimoza veya uçta bulunur (Bentham ve Hooker, 1873). Brakteoller kaliksten küçük ve korolla genellikle tüylü, hafif lopludur. Eskişehir'deki *Convolvulus* L. Türleri: *Convolvulus cantabrica*, *Convolvulus lineatus*, *Convolvulus phrygius*, *Convolvulus pulvinatus*, *Convolvulus compactus*, *Convolvulus arvensis*, *Convolvulus galaticus*, *Convolvulus betonicifolius*, *Convolvulus holosericeus*'dur.

**Tablo 1:** *Convolvulus* L. taksonlarının Eskişehir'de toplanan lokaliteler.

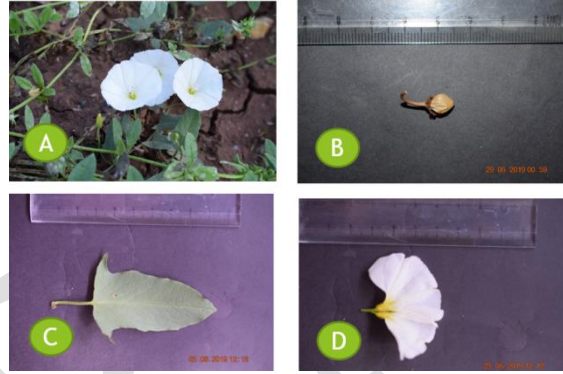
	Takson	Lokalite
1	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Günyüzü; Gecek-Atlas köyü arası, N 39°21'33.1"- E 31°43'50.2", 1230 m.
2	<i>Convolvulus lineatus</i> L.	Mihalicçık; Biçer-Üçbaşlı köyü arası, N 39°44'16.7"- E 31°42'43.1", 862 m.
3	<i>Convolvulus galaticus</i> Rostan ex Choisy	Sivrihisar; Ballıhisar köyü çevresi, N 39°20'24.6"- E 31°34'52.6", 970 m.
4	<i>Convolvulus cantabrica</i> L.	Alpu; Bozan Ağaçlandırma sahası, N 39°47'45.94"- E 031°06'41.12", 842 m.
5	<i>Convolvulus betonicifolius</i> Miller	Eskişehir; Yörük Akçayır çevresi, N 39°43'37.08"- E 030°20'49.19", 882 m.
6	<i>Convolvulus holosericeus</i> Bieb.	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'37.11"- E 030°20'08", 870 m.
7	<i>Convolvulus compactus</i> BOISS.	Alpu; Bozan Ağaçlandırma sahası, N 39°47'45.94"- E 031°06'41.12", 840 m.
8	<i>Convolvulus pulvinatus</i> SAÄ'AD	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'36.01"- E 030°21'08", 860 m.
9	<i>Convolvulus phrygius</i> BORNM.	Eskişehir, Orman Fidanlık yolu, N 39°43'36.01"- E 030°21'08", 860 m.

Literatür taramalarına göre Türkiye'de yayılış gösteren *Convolvulus* L. cinsine mensup 39 takson Fitocoğrafik Bölgeleri açısından değerlendirilmiş ve bunlardan 18 tanesi (% 46) İran-Turan, 16 tanesi (%41) Akdeniz, 4 (%10) tanesi ise çok bölgeli olarak belirtilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Convolvulus* L. cinsine mensup 39 takson Fitocoğrafik Bölgeleri

***Convolvulus arvensis* L.:** Sarılıcı ya da tırmanıcı dallı çokyıllık otlardır. Toprak üstünde dallanmayan gövdeler 3m ya da daha uzun olabilmektedir. Yapraklar tabanda kulakçıklı ya da oksu uzantılı, genellikle 3-5 cm, tüysüz ya da seyrek kısa tüylüdür. Çiçekler genellikle yaprak koltuklarında tek bulunur. Korolla beyaz ya da pembe, nadiren mavi renktedir. Çiçeklenme : Mayıs-Eylül, Habitat ve yaşam formu : Kumlu stepler, tarla kenarları, yol kenarları, 10-3050 m. Hemikriptofit, Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Kozmopolit. Ülkemizde oldukça geniş yayılım göstermektedir.Eskişehir bölgesinde 800 metre rakımlı birçok alanda rastlanılmıştır.Durumu : Geniş yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 2).



Şekil 2. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

***Convolvulus lineatus* L.:** Genellikle sürünücü köklü, odunsu kaideli, yatık ya da dik durumlu bitkilerdir. Gövde boyları 3-30 cm arası, sık parlak gri tüylü çokyıllık bitkilerdir. Çiçekler yaprak koltuklarında ve uçlarda, tek ya da 2-7 çiçekli salkımlarda bulunur. Korolla pembe, bazen beyazdır. Çiçeklenme : Nisan-Temmuz. Habitat ve yaşam formu : Kurak stepler, meşe altları, kayalık yamaçlar, nehir kenarları, 800-2135m. Hemikriptofit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, K. Afrika, G. Avrupa, Kıbrıs, Kafkasya, Suriye. Türkiye’de sık yayılım göstermektedir. Eskişehir bölgesinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Meşelik Yerleşkesi içerisindeki 810 metre rakımlı bölgelerde tespit edilmiştir.Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 3).



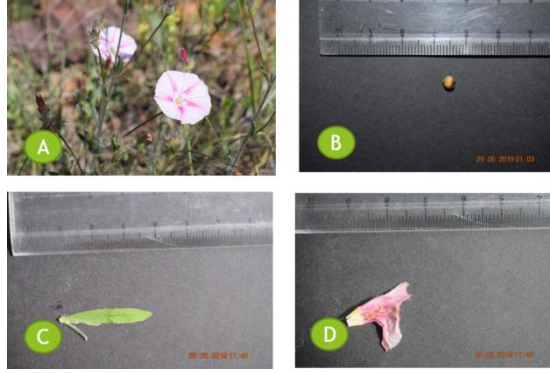
Şekil 3. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

**Convolvulus galaticus** Rostan ex Choisy: Toprakaltı sürünücü gövdeli ve yoğun parlak havlı tüylü, yatık otsu çok yıllıklardır. Yapraklar genişçe yumurtamsı, tabanda kalpsi olup dalgalı ve keskin dişli ile testeremsi kenarlıdır. Çiçekler yaprak koltuklarında, tek ya da 2-4 çiçekli salkımlarda halinde bulunur. Korolla pembe ya da açık mor renktedir. Çiçeklenme : Mayıs-Ağustos. Habitat ve yaşam formu : Çam ormanları, açık stepler, yaşlık yamaçlar, kültür alanları ve tarla kenarları, 880-2000 m. Hemikriptofit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Endemik, İran-Turan elementi. Ülkemizde oldukça geniş yayılım gösteren bu türe Eskişehir bölgesinde Eskişehir - Seyitgazi karayolunun 800 metre rakımlı steplerinde rastlanılmıştır. Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 4).



Şekil 4. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

**Convolvulus cantabrica** L.: Odunsu kaideli çokyıllık otlar olup gövdeler yatık, dik ya da yükselici, uzun yumuşak tüylüdür. Boyları 10-45 cm arası olabilmektedir.. Alt yapraklar dikdörtgensiz-spatülsü, saplar 2 cm ya da daha uzundur. Çiçekler terminal ve koltuk altlarında 1-4 çiçeklidir.. Korolla pembe olup nadiren beyaz olabilmektedir. Çiçeklenme : Nisan-Ağustos. Habitat ve yaşam formu : Makilikler, killi topraklar, yol kenarları, kayalık yamaçlar, 10-1700 m. Hemikriptofit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Akdeniz alanı, Balkanlar, Kafkasya İran AB. Türkiye'de Akdeniz ve Karadenize kıyısı olan bölgelerde tanımlanmasına rağmen, Eskişehir ve Ankara illerinde de tespit edilmiştir. Eskişehir bölgesinde Gökçekaya yolunda bulunan 410 metre rakımdaki yamaçlarda tespit edilmiştir. Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 5).



Şekil 5. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

**Convolvulus betonicifolius** Miller: Tırmanıcı yada sarılıcı, kısatüylü otsu çokyıllıklardır. Gövde yaprakları saplı ya da tabanda oksuzantılı olup loblar bazen dişli, yumurtamsı ile darca yumurtamsı olmaktadır. Çiçekler yaprak koltuklarında, her sap 1 veya 3 çiçeklidir. Korolla pembe yada beyaz renktedir. Çiçeklenme : Mayıs-Temmuz. Habitat ve yaşam formu : Boş yada ekili tarlalar, yol kenarları, 30-1700 m. Hemikriptofit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Balkanlar, Kıbrıs, Kırım, Kafkasya, Suriye, K. Irak, B. İran. Türkiyede sıklıkla görülen bu tür Eskişehir bölgesinde Türkmen Dağları ve Yenisofça YukarıKalabak bölgesinin 1130 metre rakımlı alanlarında rastlanılmıştır. Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 6).



Şekil 6. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

**Convolvulus holosericeus** Bieb.: Odunsu tabanlı, yükselici ya da yatık formu, yatık parlak gri tüylü çokyıllıklardır. Alt yapraklar darca ters yumurtamsı ile şeritsi-ters mızraksı şeklindedir. Çiçekler bazen tek ve terminalde ya da yaprak eksenleri ya da terminal salkımlarda bulunur. Korolla beyaz ile soluk sarı renktedir. Çiçeklenme : Nisan-Temmuz. Habitat ve yaşam formu : Kurak stepler, kayalık, kumlu, aşınmış ve kalkerli tepeler, kireçtaşı tarlalar, 250-1700 m. Hemikriptofit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Balkanlar, Kırım, Kafkasya. Eskişehirde Muttalıp bölgesinin 820 rakımlı alanlarında rastlanılmıştır. Durumu : Geniş yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 7).



Şekil 7. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

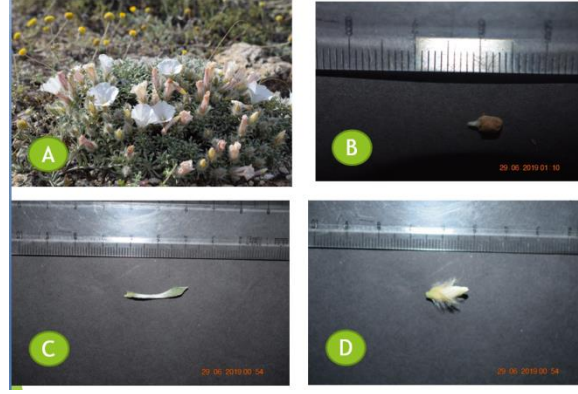
***Convolvulus pulvinatus*** SAÄ'AD: Bodur çalimsılar yapı olup yoğun, karayosunu benzeri yastıksı formlu, köklerden odunsu dallı bitkilerdir.. Gövdeler 8 cm'ye kadar boylanabilir. Yapraklar darca şeritsi ya da şeritsi-spatülsü şekilde olup, kıvrımlı, yatık ve parlak gri tüylüdür. Çiçekler terminalde bulunup, genellikle tektir. Korolla beyaz renkte, nadiren gül ya da sarı renkte olabilmektedir. Çiçeklenme : Mayıs-Ağustos. Habitat ve yaşam formu : Açık karaçam ormanı, stepler, çalılıklar, kalkerli ve serpantin yamaçlar, tarla kenarları, 200-2135. Kamefit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Balkanlar. Türkiyede sadece eskişehir bölgesinde gözlenen bu tür Eskişehir-Arayit Dağının 1780 metre rakımlı bölgelerinde tespit edilmiştir. Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 8).



Şekil 8. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Yaprak, C. Çiçek

***Convolvulus compactus*** BOISS.: Bodur çalimsı bitkilerdir. Karayosunu benzeri yastıksı formlu ve köklerden odunsu dallıdır. Gövdeler 8 cm'ye kadar boylanabilirler. Yapraklar darca şeritsi ya da şeritsi-spatülsü formda olup, kıvrımlı, yatık ve parlak gri tüylüdür. Çiçekler terminalde ve genellikle tektir. Korolla beyaz renkte, nadiren gül ya da sarı renkte olabilir. Çiçeklenme : Mayıs-Ağustos. Habitat ve yaşam formu : Açık karaçam ormanı, stepler, çalılıklar, kalkerli ve serpantin yamaçlar, tarla kenarları, 200-2135. Kamefit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Balkanlar. Türkiyede geniş yayılım göstermektedir. Eskişehir bölgesinde Günyüzü-Kayakent bölgesindeki 1290 metre rakımlı steplerde rastlanılmıştır. Durumu : Geniş Yayılışlı, Düşük Riskli (LC) (Şekil 9).





Şekil 9. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

*Convolvulus phrygius* BORNM.: Bodur yarı yatık yada yastıksız formu küçük çalimsılardır. Yapraklar sık parlak gri tüylü, sapsız, spatülsü ile ters mızraksı olup, 3-18 mm boyolanmaya sahiptir. Çiçekler terminal yada yaprak koltuklarında, tek yada dallı salkımlarda 2-7 adet bulunmaktadır. Korolla beyaz renkte olup, dışta pembe bantlıdır. Çiçeklenme : Mayıs-Haziran. Habitat ve yaşam formu : Stepler ve açık Pinus nigra ormanları, 850-1200 m. Kamefit. Genel ve bölgesel yayılış: Türkiye, Endemik. İran-Turan elementi. Türkiyede sadece Eskişehir ve Denizli bölgelerinde tespit edilmiştir. Eskişehir bölgesinde seyitgazi yolu üzerindeki 900 metre rakımlı yamaçlarda tespit edilmiştir. Durumu : Dar yayılışlı, Duyarlı (VU) (Şekil 10).



Şekil 10. A. Bitkinin genel görünüşü, B. Meyve, C. Yaprak, D. Çiçek

## SONUÇ

APG3 sistemine göre Eskişehir Bölgesinde bulunan *Convolvulus* L. genusa ait 9 takson taksonomik olarak incelenmiştir. Böylece bu familya APG3 sistemine göre yeniden gözden geçirilmiştir. Çalışmamızda daha önce Eskişehir çevresinde yapılan çalışmalarda elde edilen bilgiler ışığında her bir türün yaprak şekli , çiçek anatomisi ve tohum morfolojileri, çiçeklenme zamanı, habitat ve yaşam formu, Ggnel ve bölgesel yayılış alanları ve IUCN kategorisi hakkında bilgiler verilmiştir. Bu çalışma yapılacak olan flora çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Vural, M. 2014. İç Anadolu Step Vegetasyonu, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Austin, D. F. 1973. American Erycibae (Convolvulaceae): Maripa, Dicranostyles, and Lysiostyles I: Systematics. – Ann. Miss. Bot. Gard., 60: 306–412.
- Austin, D. F. 1998: Parallel and convergent evolution in the Convolvulaceae. In: P. Mathews & M. Sivadasan (Editors), Biodiversity and taxonomy of tropical flowering plants: 201–234. Calicut: Mentor Books.
- Austin, D. F. 2000. Bindweed (*Convolvulus arvensis*, Convolvulaceae) in North America- From Medicine to Menace. Journal of the Torrey Botanical Society, 127(2): 172–177.

- Baytop, T. 1994. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları, Yayın No: 578, Ankara, 508 ss.
- Bentham, G. and J. D. Hooker. 1873. Convolvulaceae. Genera plantarum 2:865–881. London: Reeve and Co.
- Boissier, E. 1879. Flora Orientalis. Vol. 4, Geneve Botany Press, pp. 84–111, Geneve.
- Davis, P.H. 1965–1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 1–9, Edinburg University Press, Edinburg.
- Davis, P. H., Mill R. R. & Tan, K. 1988: Convolvulus L. In: Davis, P.H., Mill R. R. & Tan, K. (Editors), Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl. I), 10: 182. Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytac, Z. ve Adigüzel, N. 2001. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları, 246 ss, Ankara.
- Feinbrun-Dothan, N. 1978. Flora Palaestina. Vol. 3, The Israel Academy of Sciences and Humanities Press, Jerusalem, pp. 33–43.
- IUCN 2001. IUCN Red List Categories: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Menemen, Y. and Jury, S. L. 2002. Pollen Studies on Some Species of the Genus Convolvulus L. (Convolvulaceae) from Morocco. Turk J. Bot., 26: 141-148.

## The Influence of Soil- and Foliar-Manganese Fertilization Along with Farm Manure and Humic Acid on Yield and Quality of the Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Halil Samet<sup>1\*</sup>, S. Rifat Yalçın<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli University, Vocational School of Food and Agriculture, Department of Crop and Animal Production, Kocaeli, Turkey

<sup>2</sup>Ankara University, Agricultural Faculty, Department of Soil Science and Plant Nutrition, Ankara, Turkey

\*Corresponding author: [hllsamet@gmail.com](mailto:hllsamet@gmail.com)

### Abstract

The aim of this research is to evaluate the effects of the soil- and foliar-manganese (Mn) fertilization with farm manure (FM) and humic acid (HA) on the yield and quality of the sweet pepper (*Capsicum annuum* L. var. Demre). This experiment was conducted in field conditions in the 2003 growing season. The FM (3000 kg da<sup>-1</sup>), HA (80 kg da<sup>-1</sup>) and Mn (0, 2, 4, and 6 kg da<sup>-1</sup>) as MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O were applied to the soil before transplanting the pepper seedlings. Foliar-Mn fertilization (0, 1%, 2%, and 3%) as MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O was sprayed to leaf for three times after diluting 1×10<sup>-1</sup> during the whole vegetation period. Results indicated that there was a significant interaction between Mn and organic materials (OMs) on vitamin C and leaf-Mn concentration and these parameters tended to increase with both OMs and Mn applications. Also, the fruit yield of the sweet pepper showed a tendency to increase with foliar-Mn fertilization. Regardless of increasing Mn levels, fruit yield tended to increase with applied the FM and HA. On the other hand, plant height and Mn concentrations in leaf and fruit showed a tendency to increase with the foliar-Mn fertilization, whereas plant height, stem thickness, and distance between two nodes tended to increase with soil Mn application, regardless of OMs applications. It was concluded that OMs and Mn interaction partially affected the quality, fruit yield, and growth the sweet pepper. And also, foliar- Mn fertilization could be an additive Mn source for yield and growth of the plants when deficiency symptoms appear.

**Key Words:** Fruit yield, fertigation, humic substance, manganese, sweet pepper growth

### INTRODUCTION

Manganese is an essential micronutrient for plant and its average concentration is about 50 mg kg<sup>-1</sup> in plant tissues. It is involved in the activation of many enzymes in plant systems, mostly in oxidation-reduction, decarboxylation, and hydrolytic reactions (Marschner, 2012; Burnell, 1998). For instance, photosynthetic water oxidation and O<sub>2</sub> formation are catalyzed by a MnCa-containing complex enzyme bound to the proteins of photosystem II (PSII) (Schmidt et al., 2016). Also, Mn-containing superoxide dismutase (MnSOD) and Mn-containing acid phosphatase (MnACP) are both catalyzed by Mn (Burnell, 1998). In addition, Mn plays a vital role in the tricarboxylic acid cycle (TCA) in oxidative and non-oxidative decarboxylation reactions (Marschner, 2012).

The critical deficiency concentrations of Mn in plants are varying between 10 and 20 mg kg<sup>-1</sup> (DW) in fully expanded leaves (regardless of plant species or cultivars and prevailing environmental conditions). Manganese deficiency is frequently seen in the soils containing low Mn in own parent material and in highly leached tropical soils. It is also common in soils of high pH containing free carbonates, especially under the influence of high organic matter (Farley and Draycott, 1973). The major symptoms of Mn deficiency are seen as follows: (i) greenish grey spot on older leaves (grey speck) in cereals, (ii) intercostal chlorosis in younger leaves in dicotyledons, and (iii) 'marsh spot' on cotyledons in legumes (Campbell and Nable, 1988). Also, in Mn-deficient cereals, decrease in grain number and yield have been associated with low pollen fertility (Sharma et al., 1991) and shortage of carbohydrate supply to grain fillings (Longnecker et al., 1991).

Manganese exists in soils as exchangeable-Mn, Mn-oxides, organic-Mn, and a component of ferromagnesian silicate minerals. The reaction of Mn in soils is fairly complex and its amount and availability are influenced by several soil factors such as pH, organic matter content, moisture, and aeration. Due to these restrictions in soils, deficiency of this nutrient element could be corrected or prevented with the foliar-Mn fertilization of ionic or chelated solution forms (Papadakis et al., 2007). However, Mn remobilization to other plant parts after foliar application could be low due to its poor phloem mobility (Papadakis et al., 2007).

Since ancient times, all agriculturists and researchers have recognized significant benefits of FM to crop productivity. The HA, the fractions of humic substances, is highly soluble at higher pH values and causes an

increase in growth and yields of various crops including vegetables (Hayes and Wilson, 1997; Padem et al., 1997; Zandonadi et al., 2007). Many reports reflected its positive effects on nutrient uptake and stimulatory effects on plant roots (Akinremi et al., 2000; Cimrin and Yilmaz, 2005; Zandonadi et al., 2007). Also, the HA could serve as a growth regulator to control hormone levels, enhance plant growth and increase stress tolerance, improve soil physical properties and complex metal ions (Nardi et al., 2002).

Although there are many studies on the relations of organic matter and microelement in greenhouse conditions, such studies have been very limited in field conditions. In this study, we aimed to determine the effects of the soil- and foliar-Mn fertilization along with FM and HA on the yield and quality of the sweet pepper grown in field conditions.

## MATERIALS and METHOD

### Experimental site and design

The field experiment was carried out in the Research and Application Center in Agricultural Faculty, Ankara University. The area is located at 40° 01' N, 32° 14' E and 680 m higher than sea level. The average of precipitation is 439.7 mm and the average of the minimum and the maximum monthly temperature is 0.5 °C and 22.2 °C, respectively.

The experiment was carried out in the vegetation period of 2003 (April to November). Four Mn levels (Mn<sub>0</sub>: 0, Mn<sub>2</sub>: 2, Mn<sub>4</sub>: 4, Mn<sub>6</sub>: 6 kg da<sup>-1</sup>) as MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O were used for soil-Mn fertilization and applied to related plots Mn<sub>0</sub> and mixed with soil just before transplanting the sweet pepper seedlings. Also, four levels foliar-Mn fertilization (Mn<sub>0</sub>: 0%, Mn<sub>1</sub>: 1%, Mn<sub>2</sub>: 2%, Mn<sub>3</sub>: 3%) as MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O solution was sprayed to leaf for three times after diluting 1/100 in June-July-August.

The FM was collected from Faculty's store cattle farm and sieved (5 mm) and applied to the related plots as 3000 kg da<sup>-1</sup>. The HA (Polymeric Polyhydric Acid, %85 w/w) was provided with fertilizer market and used directly related plots as 80 kg da<sup>-1</sup>, recommended dose by the manufacturer for pepper. Both OMs materials were mixed with soil in related plots before transplanting the sweet pepper (*Capsicum annum* L. var. Demre) seedlings.

The sweet pepper seeds were supplied from seed market and sown into the rooting media consisted of experimental soil, turf, and sand (2:1:1). About three week-old seedlings were transplanted to the plot (3×3.2 = 9.6 m<sup>2</sup>) as 15 plants (3 lines × 5 plants) in each plot.

### Chemical analyses

Some properties of the experimental soil were as follows: silty clay texture (sand: clay; 14.9: 62.4 by dry weight); pH 7.62 (1:2.5, soil: water); electrical conductivity (EC), 0.73 dS m<sup>-1</sup> (saturation extract); calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), 95 g kg<sup>-1</sup>; organic matter, 13.2 g kg<sup>-1</sup> and total nitrogen (N), 1.7 g kg<sup>-1</sup>. Ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc)-extractable Ca+Mg and K were 860.28 and 503 mg kg<sup>-1</sup>, respectively (Pratt, 1965). Also, sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>)-available phosphorus (P) concentration was 17.69 mg kg<sup>-1</sup> (Olsen et al., 1951) and diethylenediamine penta-acetic acid (DTPA)-extractable Mn, iron (Fe), zinc (Zn) and copper (Cu) were 1.38, 1.10, 0.35, and 0.64 mg kg<sup>-1</sup>, respectively (Lindsay and Norwell 1978).

For crude ash, organic matter, and nutrient contents in FM, 500 mg sample was incinerated using the dry-ash method in a muffle furnace at 500 °C for 6 h. Also, total N was determined by Kjeldahl method (Bremner, 1982). The concentration of P, K, and Ca were determined by the method of Kacar, (1972) and the concentrations of soluble Fe, Cu, Zn, Mn in NH<sub>4</sub>OAc and DTPA were determined by the method of Anonymous (1973) using atomic absorption spectrophotometer (AAS). The chemical analysis of the HA was carried out by the manufacturer. All chemical analyses of OMs were exhibited in Table 1.

**Table 1.** Some chemical properties of organic materials

Organic Materials	Total N	Crude Ash	Organic Compound	Total P	Total K	Ca	Fe	Cu	Zn	Mn
	%									
Farm Manure	1.84	77.43	22.57	0.15	1.15	0.34	36	0.53	3.21	9.70
Humic Acid	1.02	18.80	81.20	0.01	0.02	0.30	17	0.26	0.51	6.80

When 2/3 of the vegetation period was completed (in August) all leaf and fruit samples were collected and measurements were performed. The leaf samples were collected from the middle of plants (mature leaves)

(Jones et al., 1991) and washed with sink water twice and rinsed with distilled water. Therefore, they were dried at 70 °C for 48 h in an adjustable oven. For the measurement of nutrient ion concentrations, 500 mg of each of the sample was dry-ashed in a muffle furnace at 500 °C for 6 h and then the cooled ash was dissolved in 5 mL, 0.1 M hydrochloric acid (HCl) solution. The nutrient ions were analyzed using Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 2100 DV; Waltham, MA).

Fruit samples were collected from fruits that reached maturity. Five fruit were harvested from each plot for vitamin C analysis and quickly transported to the laboratory in the icebox. They were broken into small piece by hand and 5 g fruit sample was immediately treated by liquid nitrogen and then kept in deep-freeze (min. -22 °C). Also, five fruit samples were harvested and kept for nutrient analysis after washed, dried and ground.

For the content of vitamin C in samples, 500 mg was homogenized by using Heidolph DIAX 900 homogenizer (Kelheim, Germany) in 50 mL of 6 % H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> solution. The mixture was poured to glass balloon and diluted to 100 mL with 6% H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> and then filtered through a blue band filter paper (Whatman No: 42), immediately. 2.5 mL filtered extract was put into centrifugal tubes and added to 2.5 mL acetate buffer and 1 mL 2-6 dichlorophenol indophenol and 5 mL pure xylene, respectively. The extract was shaken by hand at 8-10 second and centrifuged at 5800 g for 3 minutes. The absorbance of the top phase of centrifuged extract measured at 500 nm wavelengths using a UV-visible spectrophotometer (Anonymous, 1951).

Plant height and stem thickness were measured in August by using the hand-held meter and caliper during sample collection.

### Statistical analysis

The experimental design was a completely randomized factorial design with four replicates. Obtained data were analyzed by ANOVA and the differences were compared by Duncan's Multiple Range Test ( $\alpha = 0.05$ ). The levels of significance are represented by \* at  $P < 0.05$ , \*\* at  $P < 0.01$ , \*\*\* at  $P < 0.001$ , and ns: not significant. The statistical tests were performed using MINITAB Statistical Software (Minitab Corp., State College, PA).

## RESULTS and DISCUSSION

### Vitamin C Contents

Although a significant interaction between Mn and OMs on vitamin C content of the sweet pepper fruits was found, the difference between the means was not significant (Table 2) in soil-Mn fertilization. Vitamin C content tended to decrease, but it showed a tendency to increase with the FM (2.8%) and HA (2.4%) applications compared to control. In addition, the effects of both Mn levels and OMs on vitamin C content of sweet pepper were not found significantly. Venkataramani (1950) reported that a small increase in vitamin C content of *Trigonella foenum-graecum* L. was obtained by Mn addition (16 mg kg<sup>-1</sup>), but higher doses did not show a beneficial effect on this parameter. Aminifard et al. (2012) were reported that 100 mg kg<sup>-1</sup> HA application caused the highest capsaicin and lycopene contents (antioxidant compounds) compared to control. Ibrahim et al. (2018) reported that foliar application of humic acid and salicylic acid caused a significant increase in vegetative growth, total fruit yield, and fruit quality (Vitamin C, total soluble solids content, titratable acidity, total sugar content, etc.) in red sweet pepper.

**Table 2.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on vitamin C contents (mg 100 g<sup>-1</sup> fresh weight) of the sweet pepper fruits

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	Average
Control	46.80 <sup>±0.01</sup> a	47.35 <sup>±0.55</sup> a	47.06 <sup>±0.46</sup> a	46.24 <sup>±0.09</sup> a	46.86 <sup>±0.19</sup>
FM	48.11 <sup>±0.44</sup> a	47.26 <sup>±0.41</sup> a	46.99 <sup>±0.22</sup> a	47.19 <sup>±0.54</sup> a	47.39 <sup>±0.22</sup>
HA	47.91 <sup>±0.29</sup> a	44.87 <sup>±0.59</sup> a	45.88 <sup>±0.70</sup> a	47.29 <sup>±0.39</sup> a	46.49 <sup>±0.39</sup>
<b>Average</b>	47.60 <sup>±0.24</sup>	46.49 <sup>±0.44</sup>	46.64 <sup>±0.31</sup>	46.91 <sup>±0.25</sup>	
<i>F</i> -test	<i>OM</i> *Mn: 4.23***		<i>OM</i> : 4.26*		<i>Mn</i> : 3.79*
Organic Materials	Foliar applications (%)				
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	Average
Control	47.12 <sup>±0.54</sup>	47.32 <sup>±0.56</sup>	47.78 <sup>±0.33</sup>	48.04 <sup>±0.21</sup>	47.57 <sup>±0.22</sup>
FM	47.52 <sup>±0.60</sup>	46.80 <sup>±0.38</sup>	47.78 <sup>±0.42</sup>	48.11 <sup>±0.28</sup>	47.55 <sup>±0.23</sup>
HA	48.11 <sup>±0.32</sup>	46.48 <sup>±0.74</sup>	46.54 <sup>±0.79</sup>	46.54 <sup>±0.33</sup>	46.92 <sup>±0.32</sup>
<b>Average</b>	47.58 <sup>±0.29</sup>	46.87 <sup>±0.32</sup>	47.36 <sup>±0.34</sup>	47.56 <sup>±0.26</sup>	
<i>F</i> -test	<i>OM</i> *Mn: 1.64 <sup>ns</sup>		<i>OM</i> : 2.30 <sup>ns</sup>		<i>Mn</i> : 1.38 <sup>ns</sup>

The values in columns followed by different letters where available according to *F*-test significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly according to Duncan's Multiple Range Tests ( $P < 0.05$ )

### Leaf- and Fruit-Mn Concentrations

Table 3 shows the interaction between soil-Mn applications and organic substances and the difference between the means. In the soil-Mn application, the lowest Mn application (2 kg da<sup>-1</sup>) caused an increase in leaf-Mn concentration by 3.4%, unlike the other Mn levels. The FM and HA caused a non-significant decrease in the leaf-Mn concentrations. On the other hand, leaf-Mn concentration affected by foliar-Mn fertilization and showed a tendency to increase with increasing Mn levels (1, 2, and 3%) by 61%, 81%, and %158, respectively. This result may be related to easier intake of micronutrient ions from leaves. Manganese intake from roots (like other micronutrients) is affected by many soil and plant factors. The most effective of these factors is the presence of a sufficient amount of available-Mn in soil solution (Reisenauer, 1988). When Mn entering to the soil, it is rapidly converted to one or more of complex, insoluble Mn-oxide compounds described by McKenzie (1980) or is absorbed or precipitated as Mn(II) with another soil constituent. A small and highly variable fraction remains as divalent Mn ions in the soil solution (Reisenauer, 1988).

**Table 3.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on Mn concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) of the sweet pepper leaves

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	Average
Control	98.35 <sup>±3.74</sup> a	101.68 <sup>±9.59</sup> a	91.79 <sup>±8.39</sup> a	95.97 <sup>±4.26</sup> a	96.95 <sup>±3.25</sup>
FM	90.25 <sup>±8.68</sup> a	69.83 <sup>±6.97</sup> a	89.67 <sup>±7.49</sup> a	108.37 <sup>±6.27</sup> a	89.53 <sup>±4.83</sup>
HA	90.25 <sup>±8.68</sup> a	101.36 <sup>±11.70</sup> a	76.29 <sup>±4.78</sup> a	107.56 <sup>±6.42</sup> a	93.86 <sup>±4.82</sup>
<b>Average</b>	92.95 <sup>±4.04</sup>	90.95 <sup>±6.75</sup>	85.92 <sup>±4.22</sup>	103.96 <sup>±3.45</sup>	
<i>F</i> -test	<i>OM</i> *Mn: 2.43*		<i>OM</i> : 0.97 <sup>ns</sup>		<i>Mn</i> : 3.02*
Organic Materials	Foliar applications (%)				
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	Average
Control	70.27 <sup>±4.36</sup>	126.35 <sup>±14.30</sup>	130.58 <sup>±14.80</sup>	193.31 <sup>±8.41</sup>	130.13 <sup>±12.30</sup>
FM	65.90 <sup>±9.07</sup>	116.64 <sup>±7.36</sup>	124.41 <sup>±11.60</sup>	185.21 <sup>±9.92</sup>	123.04 <sup>±11.70</sup>
HA	76.80 <sup>±6.35</sup>	100.10 <sup>±14.00</sup>	129.73 <sup>±6.07</sup>	169.86 <sup>±4.67</sup>	119.12 <sup>±9.77</sup>
<b>Average</b>	70.99 <sup>±3.84</sup> A	114.36 <sup>±7.21</sup> A	128.24 <sup>±6.01</sup> A	182.79 <sup>±5.10</sup> A	
<i>F</i> -test	<i>OM</i> *Mn: 0.80 <sup>ns</sup>		<i>OM</i> : 1.27 <sup>ns</sup>		<i>Mn</i> : 65.01***

The values in columns followed by different letters where available according to *F*-test significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letters in the same column or same line do not differ significantly according to Duncan's multiple range tests ( $P < 0.05$ ).

Neither the interaction between Mn levels and OM<sub>s</sub> nor Mn and OM<sub>s</sub> applications on the fruit-Mn concentrations was found significantly in the soil-Mn fertilization (Table 4). But the effect of Mn levels was significant in the leaf-Mn application and 1, 2, and 3% levels partially increased the fruit-Mn concentration by %47, 60%, 65%, respectively. Generally, the foliar applications are a very fast method for providing required elements with plants because nutrients could be absorbed quickly in comparison with root absorption. Papadakis et al. (2007) recommended that a suitable method for the correction and/or prevention of Mn deficiency in plants was to the foliar application of ionic or chelated solution forms. Mousavi et al. (2007) stated that foliar-Mn fertilization caused an increase in tuber Mn concentration in potatoes. Also, the results are supported by the report (Dursun et al., 2002) that the HA application caused a considerable increase in Mn concentration in tomato and eggplant.

**Table 4.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on Mn concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) of the sweet pepper fruits

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				Average
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	
Control	8.57 <sup>±1.03</sup>	9.04 <sup>±0.86</sup>	9.38 <sup>±0.86</sup>	6.58 <sup>±0.77</sup>	8.39 <sup>±0.49</sup>
FM	7.22 <sup>±0.18</sup>	8.16 <sup>±0.74</sup>	8.15 <sup>±1.15</sup>	7.99 <sup>±0.62</sup>	7.88 <sup>±0.35</sup>
HA	8.60 <sup>±1.81</sup>	8.06 <sup>±0.48</sup>	8.88 <sup>±0.81</sup>	8.57 <sup>±0.72</sup>	8.52 <sup>±0.49</sup>
<b>Average</b>	8.13 <sup>±0.66</sup>	8.42 <sup>±0.39</sup>	8.80 <sup>±0.52</sup>	7.71 <sup>±0.45</sup>	
<i>F</i> -test	OM×Mn:0.74 <sup>ns</sup>		OM:0.55 <sup>ns</sup>		Mn:0.76 <sup>ns</sup>
	Foliar applications (%)				Average
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	
Control	8.41 <sup>±0.33</sup>	10.03 <sup>±0.53</sup>	10.73 <sup>±0.34</sup>	13.93 <sup>±2.48</sup>	10.78 <sup>±0.78</sup>
FM	8.99 <sup>±1.09</sup>	13.66 <sup>±1.24</sup>	14.72 <sup>±1.42</sup>	14.48 <sup>±1.35</sup>	12.96 <sup>±0.83</sup>
HA	7.54 <sup>±0.72</sup>	12.99 <sup>±0.62</sup>	14.35 <sup>±2.44</sup>	12.64 <sup>±1.80</sup>	11.88 <sup>±0.97</sup>
<b>Average</b>	8.31 <sup>±0.44</sup> A	12.23 <sup>±0.65</sup> A	13.27 <sup>±1.01</sup> A	13.68 <sup>±1.04</sup> A	
<i>F</i> -test	OM×Mn:0.90 <sup>ns</sup>		OM:2.46 <sup>ns</sup>		Mn:9.27 <sup>***</sup>

The values in columns followed by different letters where available according to *F*-test significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letters in the same column or same line do not differ significantly according to Duncan's multiple range tests ( $P < 0.05$ ).

### Total Fruit Yield

While the interaction between Mn levels and OM<sub>s</sub> was insignificant on total yield, the effect of these applications was found to be significant in soil-Mn fertilization (Table 5). Regardless of the effects of OM<sub>s</sub>, the highest Mn level caused an increase in total fruit yield by 15%. Conversely, regardless of Mn levels, FM and HA caused an increase in this parameter by 19% and 5%, respectively. These findings are consistent with the results of earlier studies on the sweet pepper. Karakurt et al. (2009) stated that foliar- and soil-HA applications caused a significant mean fruit weight in early and total yield. Also, Sileshi et al. (2011) reported a higher fruit yield in paprika plots applied OM<sub>s</sub> alone or the integrated nutrient. These increases sourced by organic materials could be enhancing nutrient use efficiency and maintaining the physical, chemical, and biological properties of soils (Chianu and Tsujii, 2005).

In the foliar-Mn fertilization, a significant interaction between Mn levels and OM<sub>s</sub> on total fruit yield. Total fruit yield tended to increase with all Mn levels compared to control. While total yield in foliar-Mn fertilization exhibited a decreasing tendency with the FM application, it exhibited an increasing tendency with the HA application (Table 5). On the other hand, in the foliar-Mn fertilization, individually the FM and HA caused an increase in total fruit yield by 35.5% and 15.4%, respectively. Dursun et al. (2002) observed that the highest growth rate (leaf, stem, and root) were obtained by the 50, 100, 150 ml L<sup>-1</sup> HA applications. Karagöz and Hanay (2017) reported that bat-guano was more effective than farm manure and caused an increase in some yield parameters such as thousand-grain weight (6%), number of spikes in m<sup>2</sup> (66%), stem yield (87%), grain yield (35%), plant height (8.4%), hectoliter weight (5%). Also, García et al. (2016) reported that humic substance could be a key ingredient for high-quality foliar fertilizer due to its entering capacity into the roots, transportation to upper organs, and helped to carry the trace mineral ions into plant tissues.

**Table 5.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on total fruit yield (kg da<sup>-1</sup>) of the sweet pepper

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				<i>Average</i>
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	
Control	1345 <sup>±110</sup>	1593 <sup>±119</sup>	1500 <sup>±34</sup>	1775 <sup>±131</sup>	1553 <sup>±62</sup> A
FM	1916 <sup>±70</sup>	1555 <sup>±129</sup>	1794 <sup>±194</sup>	2097 <sup>±115</sup>	1841 <sup>±79</sup> A
HA	1591 <sup>±121</sup>	1647 <sup>±129</sup>	1604 <sup>±104</sup>	1691 <sup>±136</sup>	1633 <sup>±56</sup> A
<i>Average</i>	1617 <sup>±89</sup> A	1599 <sup>±67</sup> A	1633 <sup>±77</sup> A	1854 <sup>±85</sup> A	
<i>F-test</i>	OM*Mn:1.45 <sup>ns</sup>		OM: 5.95 <sup>**</sup>		Mn:2.91 <sup>*</sup>
	Foliar applications (%)				<i>Average</i>
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	
Control	1426 <sup>±63</sup> a	1498 <sup>±88</sup> a	1529 <sup>±25</sup> a	1563 <sup>±71</sup> a	1504 <sup>±32</sup>
FM	1932 <sup>±138</sup> a	1561 <sup>±132</sup> a	1506 <sup>±24</sup> a	1450 <sup>±70</sup> a	1612 <sup>±69</sup>
HA	1645 <sup>±59</sup> a	1540 <sup>±81</sup> a	1606 <sup>±29</sup> a	1598 <sup>±93</sup> a	1597 <sup>±33</sup>
<i>Average</i>	1668 <sup>±79</sup>	1533 <sup>±54</sup>	1547 <sup>±18.8</sup>	1537 <sup>±45</sup>	
<i>F-test</i>	OM*Mn:3.07 <sup>*</sup>		OM:2.09 <sup>ns</sup>		Mn:1.91 <sup>ns</sup>

The values in columns followed by different letters where available according to *F-test* significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly according to Duncan's Multiple Range Tests ( $P<0.05$ )

### Plant Height

In both the soil- and foliar-Mn fertilization, only Mn levels affected significantly the plant height of the sweet pepper plant (Table 6). Increasing Mn levels caused a tendency to increase in plant height. Regardless of the effects of OMs, the maximum increase in plant height was found in the highest Mn levels (6 kg da<sup>-1</sup> in soil application and 3% in foliar application) by 14% and 10%, respectively. These positive effects of Mn on vegetative growth could be explained by (i) its duty on the biosynthesis of lignin polymerization in the cell wall (Hebberner et al., 2009), (ii) photosynthetic apparatus owing to increased photosynthetic electron transport and (iii) oxidative stress (Schmidt et al., 2016).

**Table 6.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on plant height (cm) of the sweet pepper

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				<i>Average</i>
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	
Control	44.2 <sup>±2.0</sup>	48.1 <sup>±4.35</sup>	51.8 <sup>±1.20</sup>	54.6 <sup>±3.78</sup>	50.0 <sup>±1.72</sup>
FM	50.7 <sup>±1.47</sup>	56.3 <sup>±2.64</sup>	53.5 <sup>±2.25</sup>	54.2 <sup>±2.36</sup>	53.7 <sup>±1.12</sup>
HA	47.2 <sup>±5.14</sup>	54.0 <sup>±2.88</sup>	51.8 <sup>±1.92</sup>	53.0 <sup>±3.70</sup>	51.5 <sup>±1.75</sup>
<i>Average</i>	47.4 <sup>±1.90</sup> A	52.8 <sup>±2.05</sup> A	52.4 <sup>±0.99</sup> A	53.9 <sup>±1.76</sup> A	
<i>F-test</i>	OM*Mn:0.5 <sup>ns</sup>		OM:1.8 <sup>ns</sup>		Mn:2.7 <sup>*</sup>
	Foliar applications (%)				<i>Average</i>
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	
Control	44.5 <sup>±1.67</sup>	52.5 <sup>±2.42</sup>	52.7 <sup>±2.00</sup>	51.7 <sup>±1.65</sup>	50.4 <sup>±1.24</sup>
FM	50.9 <sup>±1.59</sup>	52.3 <sup>±1.44</sup>	53.7 <sup>±2.36</sup>	53.0 <sup>±0.55</sup>	52.5 <sup>±0.77</sup>
HA	48.7 <sup>±2.48</sup>	52.6 <sup>±1.04</sup>	50.4 <sup>±0.33</sup>	53.6 <sup>±2.20</sup>	51.3 <sup>±0.92</sup>
<i>Average</i>	48.0 <sup>±1.29</sup> A	52.5 <sup>±0.91</sup> A	52.3 <sup>±1.03</sup> A	52.8 <sup>±0.88</sup> A	
<i>F-test</i>	OM*Mn:1.0 <sup>ns</sup>		OM:1.4 <sup>ns</sup>		Mn:4.8 <sup>**</sup>

The values in columns followed by different letters where available according to *F-test* significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letters in the same column or same line do not differ significantly according to Duncan's multiple range tests ( $P<0.05$ ).

### Stem Thickness

Table 7 indicated that there were not any interactive effects of OMs and Mn levels on stem thickness of the sweet pepper. Neither the interaction between Mn and OMs nor the leaf-Mn fertigation has been significant on stem thickness of the test plant. Although the effects of increasing Mn levels on stem thickness were significant, the differences between averages were not significant in soil-Mn fertilizations. The positive effects



of Mn on stem thickness could be related to its role in photosynthesis. Schmidt et al. (2016) reported that due to its vital role in Photosystem II, an adequate Mn level should be maintained for functional photosynthesis. The possible role of Mn in root growth could be in auxin metabolism and thus the interaction between auxin and other plant hormones and in a number of reactions leading the synthesis of phenols and lignin (Campbell and Nable, 1988).

**Table 7.** The effects of soil-and foliar-Mn fertilization along with farm manure and humic acid on stem thickness (cm) of the sweet pepper plant

Organic Materials	Soil applications (kg da <sup>-1</sup> )				Average
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>4</sub>	Mn <sub>6</sub>	
Control	1.12 <sup>±0.04</sup>	1.31 <sup>±0.05</sup>	1.25 <sup>±0.06</sup>	1.27 <sup>±0.03</sup>	1.24 <sup>±0.03</sup>
FM	1.24 <sup>±0.01</sup>	1.32 <sup>±0.03</sup>	1.21 <sup>±0.06</sup>	1.31 <sup>±0.05</sup>	1.27 <sup>±0.02</sup>
HA	1.23 <sup>±0.02</sup>	1.25 <sup>±0.03</sup>	1.24 <sup>±0.04</sup>	1.27 <sup>±0.03</sup>	1.25 <sup>±0.01</sup>
<b>Average</b>	1.20 <sup>±0.02</sup> A	1.29 <sup>±0.02</sup> A	1.23 <sup>±0.03</sup> A	1.28 <sup>±0.02</sup> A	
<i>F</i> -test	OM×Mn:1.28 <sup>ns</sup>		OM:0.71 <sup>ns</sup>		Mn:3.80*
	Foliar applications (%)				Average
	Mn <sub>0</sub>	Mn <sub>1</sub>	Mn <sub>2</sub>	Mn <sub>3</sub>	
Control	1.18 <sup>±0.02</sup>	1.27 <sup>±0.02</sup>	1.26 <sup>±0.04</sup>	1.29 <sup>±0.03</sup>	1.25 <sup>±0.02</sup>
FM	1.29 <sup>±0.08</sup>	1.25 <sup>±0.03</sup>	1.26 <sup>±0.04</sup>	1.29 <sup>±0.03</sup>	1.27 <sup>±0.02</sup>
HA	1.22 <sup>±0.01</sup>	1.29 <sup>±0.05</sup>	1.29 <sup>±0.03</sup>	1.25 <sup>±0.02</sup>	1.26 <sup>±0.02</sup>
<b>Average</b>	1.23 <sup>±0.03</sup>	1.27 <sup>±0.02</sup>	1.27 <sup>±0.02</sup>	1.28 <sup>±0.01</sup>	
<i>F</i> -test	OM×Mn:0.89 <sup>ns</sup>		OM:0.31 <sup>ns</sup>		Mn:0.94 <sup>ns</sup>

The values in columns followed by different letters where available according to *F*-test significance are significantly different. The values are the mean of four replicates. Means followed by the same letters in the same column or same line do not differ significantly according to Duncan's multiple range tests ( $P < 0.05$ ).

## CONCLUSION

The interaction between OMs and manganese were found significantly only in vitamin C content and total yield of sweet pepper fruit with soil-Mn fertilization and leaf-Mn fertilization, respectively. Applied FM and HA to the soil partially affected growth parameters and fruit quality. While the HA application affected positively leaf-Mn concentration, the FM application was effective in fruit-Mn concentrations. Also, soil- and foliar-Mn fertilization affected partially the growth of the sweet pepper, but their effect on quality was not significant.

Foliar micronutrient applications may be a good option when factors affecting nutrient intake are highly variable and nutrient deficiency cannot be corrected by soil fertilization in field conditions. However, the application doses should be calculated very well. Otherwise higher doses may cause toxic effects. When appears deficiency symptoms, foliar applications could be the best way for nutrient addition, but the main mechanism in the uptake of minerals is root-uptake and this path should always be kept open.

In addition, further field studies are needed to observe the effects of micronutrients under natural conditions. However, in the planning of field conflicts, organic matter content of the soils, clay type/quantity, lime content, groundwater or drainage status, etc. Some details should be considered.

## ACKNOWLEDGMENTS

The manuscript is part of the Ph.D. thesis, named "The Effect of Manganese Applied to Soil and Leaf Along with Farmyard Manure and Humic Acid on the Content of Protein and Vitamin C and Some Yield Parameters in Pepper". This thesis was finished in Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Soil Science. The full thesis is available online in <http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/1602/>

## REFERENCES

- Akinremi OO, Janzen HH, Lemke RL, Larney FJ, 2000. Response of canola, wheat and green beans to leonardite additions. *Can J Soil Sci*, 80(3), 437-443.
- Aminifard MH, Aroiee H, Azizi M, Nemati H, Jaafar HZ, 2012. Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annum* L.). *J of Herbs, Spices Med Plants*, 18(4), 360-369.
- Anonymous, 1951. *Methods of Vitamin Assays*. II. Edition. Interscience Publishers, New York.

- Anonymous, 1973. Perkin Elmer Catalog. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Norwalk, Connecticut, USA.
- Bremner JM, 1982. Total nitrogen. Methods of soil analysis. Part 2. Madison. WI, ASA-SSA, 595-624.
- Burnell JN, 1988. The biochemistry of manganese in plants. In Manganese in soils and plants (pp. 125-137). Springer, Dordrecht.
- Campbell LC and Nable RO, 1988. Physiological functions of manganese in plants. In: Manganese in soils and plants (pp. 139-154). Springer, Dordrecht.
- Chianu JN and Tsujii H, 2005. Integrated nutrient management in the farming systems of the savannas of northern Nigeria: what future? Outlook on Agriculture, 34(3), 197-202.
- Cimrin KM, Yilmaz I, 2005. Humic acid applications to lettuce do not improve yield but do improve phosphorus availability. Acta Agric Scand B Soil Plant Sci. 55(1), 58-63.
- Dursun A, Güvenç I, Turan M, 2002. Effects of different levels of humic acid on seedling growth and macro and micronutrient contents of tomato and eggplant. Acta Agrobot, 55(2), 81-88.
- Farley RF and Draycott AP, 1973. Manganese deficiency of sugar beet in organic soils. Plant soil, 38(2), 235-244.
- García AC, De Souza LGA, Pereira MG, Castro RN, García-Mina JM, Zonta E, Lisboa FJG, Berbara RLL, 2016. Structure-property-function relationship in humic substances to explain the biological activity in plants. Scientific reports, 6, 20798.
- Hayes MHB, and Wilson WS, 1997. Humic substances, peats, and sludge's; health and environmental aspects (pp. 172, 496). Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Hebbern CA, Laursen KH, Ladegaard AH, Schmidt SB, Pedas P, Bruhn D, Husted S, 2009. Latent manganese deficiency increases transpiration in barley (*Hordeum vulgare*). Physiol Plant, 135(3), 307-316.
- Ibrahim A, Abdel-Razzak H, Wahb-Allah M, Alenazi M, Alsadon A, Dewir YH, 2019. Improvement in Growth, Yield, and Fruit Quality of Three Red Sweet Pepper Cultivars by Foliar Application of Humic and Salicylic Acids. Horttechnology, 1: 1-9.
- Jones Jr JB, Wolf B, Mills HA, 1991. Plant analysis handbook. I. Methods of plant analysis and interpretation (pp: 1-213). Micro-Macro Publishing Inc. USA.
- Kacar B, 1972. Chemical analysis of plant and soil II. Plant Analysis (Bitki ve toprağın kimyasal analizleri II. Bitki Analizleri). AU Faculty of Agriculture Publications: 453, Manual Application: 155, Ankara.
- Karagöz K and Hanay A, 2017. Effects of bat guano on some yield parameters of wheat. Aca J Environ Sci 5(11): 200-206.
- Karakurt Y, Unlu H, Unlu H, Padem H, 2009. The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. Acta Agric Scand Sect B, 59(3):233-237.
- Lindsay WL and Norwel WA, 1978. Development of a DTPA micronutrient soil test for Zinc, Iron, Manganese and Copper. Soil Sci Soc Am J, 42(3): 421-428.
- Longnecker NE, Graham RD, Card G, 1991. Effects of manganese deficiency on the pattern of tillering and development of barley (*Hordeum vulgare* cv. Galleon). Field Crops Res, 28(1-2), 85-102.
- McKenzie RM, 1980. The adsorption of lead and other heavy metals on oxides of manganese and iron. Soil Res, 18(1), 61-73.
- Marschner P, 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3<sup>rd</sup> Edition. London, UK, Elsevier. ISBN: 978-0-12-384905-2
- Mousavi SR, Galavi M, Ahmadvand G. 2007. Effect of zinc and manganese foliar application on yield, quality and enrichment on potato (*Solanum tuberosum* L.). Asian J Plant Sci, 6(8), 1256-1260.
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A, Vianello A, 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biol Biochem, 34(11), 1527-1536.
- Padem H, Ocal A, Alan R, 1997. Effect of humic acid added foliar fertilizer on seedling quality and nutrient content of eggplant and pepper. ISHS Symposium on Greenhouse Management for Better Yields and Quality in Mild Winter Climates, 3-5 November 1997. Acta Hort, 491, 241-246.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S., Dean, H. C. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. U.S. Dept. Of Agr. Cir. 939. Washington D.C.

- Papadakis IE, Sotiropoulos TE, Therios IN, 2007. Mobility of iron and manganese within two citrus genotypes after foliar applications of iron sulfate and manganese sulfate. *J Plant Nutr*, 30(9), 1385-1396.
- Pratt PF, 1965. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Ed. C.A. Black, Amer. Soc. of Argon. Inc. Pub. Argon. Series no: 9. Madison, Wisconsin. The USA.
- Reisenauer HM, 1988. Determination of plant-available soil manganese. In: Manganese in soils and plants (pp. 87-98). Springer, Dordrecht.
- Schmidt SB, Jensen PE, Husted S, 2016. Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. *Trends in Plant Science*, 21(7), 622-632.
- Sharma CP, Sharma PN, Chatterjee C, Agarwala SC, 1991. Manganese deficiency in maize affects pollen viability. *Plant Soil*, 138(1), 139-142.
- Sileshi GW, Akinnifesi FK, Gondwe FM, Ajayi OC, Mng'omba S, Mwafongo K, 2011. Effect of organic fertilizer on the growth and fruit yield of six paprika (*Capsicum annum L.*) cultivars in Malawi. *Agrofor Syst*, 83(3), 361-372.
- Venkataramani KS, 1950. Some factors governing the vitamin C content of *Trigonella foenum-graecum*. In: Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B (Vol. 32, No. 3, pp. 112-125). Springer India.
- Zandonadi DB, Canellas LP, Facanha AR, 2007. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H pumps activation. *Planta*, 225, 1583-1595.

## Temperature effects on the adsorption with microbeads in Reactive Orange 16 poly (EGDMA-VIM)

B.E. Kaplan<sup>2</sup>, A. Kara<sup>1</sup>, H.A. Eren<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Bursa Uludag, 16059 Bursa  
Turkey

<sup>2</sup>Department of Textile Engineering, University of Bursa Uludag, 16059  
Bursa Turkey

E-mail: [busra\\_e\\_kaplan@hotmail.com](mailto:busra_e_kaplan@hotmail.com)

### Abstract:

In this study poly(ethylene glycol dimethacrylate-vinyl imidazole) [poly(EGDMA-VIM)] microbeads were employed as adsorbent for reactive orange 16. Temperature effects of reactive orange 16, from aqueous solutions were studied by adsorption on poly(EGDMA-VIM). The poly(EGDMA-VIM) microbeads were synthesized; their use as adsorbent of temperature effects were investigated. In this study, the effects of temperature on adsorption were investigated. In this study, 4, 25, 45 and 65 degree temperatures were studied.

**Keywords:** pH; temperature, reactive dye; reactive orange 16; poly(EGDMA-VIM); adsorption

### 1.Introduction

Many important sources of environment contamination are synthesis of dye, leather, cosmetics, papers, food processing, pulp mill, pharmaceuticals, and plastics industries [1].

The water contaminated by dye at even a concentration of 1.0 mg/L would cause a change in color and make it improper for human usage. [2].

Reactive dye is one of the most important identified contaminants among the various dye pollutants of industrial effluents. Due to its good solubility, reactivity, high toxicity and possible accumulation in the environment, Reactive dye is a common water pollutant and it may frequently be found in trace quantities in industrial wastewater.[3-4].

Reactive dyes have been extensively used in many industries such as textile. [5-7]. Although the exact number and amount of dyes produced in the world is not known, it is estimated to be more than 100,000 commercially available dyes with over of dye-stuff produced annually [5-8]. Large volumes of water are consumed by textile industries for wet processing of textiles. [9] Discharging dyes to water sources can cause a number of problems as they have serious health risks on living organisms. [10]

Reactive dyes are classified as water soluble azo reactive dyes. Azo dyes are characterized by the presence of  $N=N$ , easy to apply and are known for their bright colors. [11]. It also has one or more azo boundaries ( $-N=N-$ ) and is widely used in many applications due to their solubility, low costs, stability and color variations. [12,13]. Azo reactive dyes with two azo groups are known to be toxic, carcinogenic and mutagenic. [14]. The reactive dyes have very low fixing rates and high concentration of reactive dyes are discharged into the waste water. They are water-soluble and cannot be readily biodegradable and therefore reactive dyes may remain in the waste water even after intensive processing. [15-22].

Reactive dyes are typically azo-based chromophores combined with different types of reactive groups. They are different from all other classes of dye because they are covalently bonded to textile fibers. [23,24] The use of reactive dyes over the last decade is resistant to biodegradation, ie, heat and light under aerobic conditions and biodegradable, which is usually due to poor biodegradation of such dyes (especially those containing azo groups). [25] A wide variety of treatment methods are used to remove dyestuffs from wastewater. [26]. Traditional treatment methods for waste water include biological, chemical and physical methods. [27-29]. There are many studies in the literature related to the removal of dyes from industrial effluents. In many industrial fields dyes are widely used in order to colourise products and by this way a large quantity of colored wastewater is produced. [30] Conventional methods for the removal of dyes in effluents include physical, chemical, and biological processes Unfortunately, reactive dyes are resistant to bacterial activity and biological treatment alone will take a long time to be effective. Furthermore, it is difficult to remove reactive dyes using chemical coagulation due to the dye's high solubility in water. Therefore, alternative technology must be developed to solve this problem. [31] Adsorption is widely used in wastewater treatment due to its ability to remove different types of paint, high quality purified water and easy handling. Adsorption technique is the

most suitable method for the removal of dyes due to its simple design, easy operation and relatively simple regeneration. [32] Several different adsorbent source materials have shown potential for dye adsorption [33] and there is a need to investigate adsorbents with the potential to bind with reactive dyes. The adsorption method is widely used in the removal of synthetic dyes from industrial wastes. . [34]

The aim of this study is to poly(ethylene glycol dimethacrylate-vinyl imidazole) [poly(EGDMA-VIM)] microbeads were employed as adsorbent for reactive orange 16. Temperature effects of reactive orange 16, from aqueous solutions will study by adsorption on poly(EGDMA-VIM).

## 2. Material and Methods

### 2.1 Materials

The dye used in this study is Reactive Orange 16. Reactive Orange 16 is an anionic dye and azo belongs to the class. In Table 1 its characteristics are summarized. Its general characteristics are shown. Table 1.

Generic name	Reactive Orange 16
Molecular Formula	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S <sub>3</sub>
Molecular weight (g/mol)	617,54
Chemical Name	2-((4- (7-Asetamido-1-Hidroksi-3-Sülfo-2-naftilazo) Fenil) Sülfonil) Etil Sülfat
Application Class	Reactive
Chromophore	Azo
$\lambda$ max(nm):	494

Table 1. Characterization of Reactive Orange 16 (Lee, Choi ve ark.; 2006) [35].

Characteristics RO16

Structure

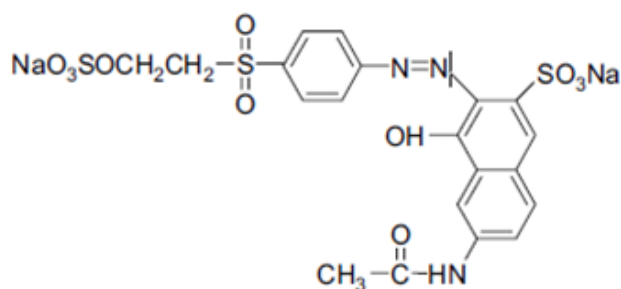


Fig 1. General characteristics of RO16 used dye in this study

Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), purified by passing through active alumina and stored at 48°C until use. N-Vinyl imidazole (VIM, Aldrich, Steinheim, Germany) was distilled under vacuum (74–76°C, 10 mm Hg). Benzoyl peroxide (BPO) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Poly(vinyl alcohol) (PVAL; Mw: 100.000, 98% hydrolyzed) was supplied from Aldrich Chem. Co. (USA). All other chemicals were of reagent grade and were purchased from Merck AG (Darmstadt, Germany).

### 2.2 Synthesis of the poly(EGDMA-VIM) Microbeads

EGDMA and VIM were polymerized in suspension by using BPO and poly(vinyl alcohol) as the initiator and the stabilizer, respectively. Toluene was included in the polymerization recipe as the diluent (as a pore former). A typical preparation procedure was exemplified below. Continuous medium was prepared by dissolving poly(vinyl alcohol) (200 mg) in the purified water (50 ml). For the preparation of dispersion phase, EGDMA (4 ml) and toluene (4 ml) were stirred for 15 min at room temperature. Then, VIM (3 ml) and BPO (100 mg) were dissolved in the homogeneous organic phase. The organic phase was dispersed in the aqueous medium by stirring the mixture magnetically (400 rpm), in a sealed-cylindrical pyrex polymerization reactor. The

reactor content was heated to polymerization temperature (i.e., 70 °C) within 4 h and the polymerization was conducted for 2 h with a 600 rpm stirring rate at 90 °C. Final beads were extensively washed with ethanol and water to remove any unreacted monomer or diluent and then stored in distilled water at 4 °C. [36]

**Table 2:** Recipe and polymerization conditions for preparation of the m-poly (EGDMA-VIM) microbeads.

### Aqueous Dispersion Phase

Distilled water: 50 mL

PVAL : 200 mg

### Organic Phase

EGDMA: 4 ml

VIM : 3 mL

Toluene: 10 mL

BPO : 100 mg

### Polymerization Conditions

Reactor volume: 100 ml

Stirring Rate: 600 rpm

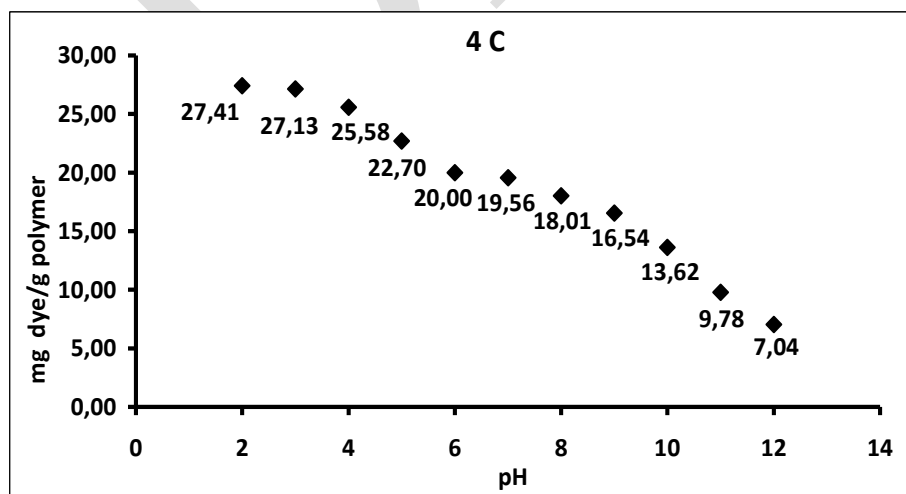
Temperature and Time: first at 65°C for 4 h, and then at 80°C for 2 h

## 3 Results and Discussion

This section discussed on effect of temperature on the adsorption of RO16 in the range 4 to 65 °C and the results are presented in Figure 4(a),(b),(c) and (d).

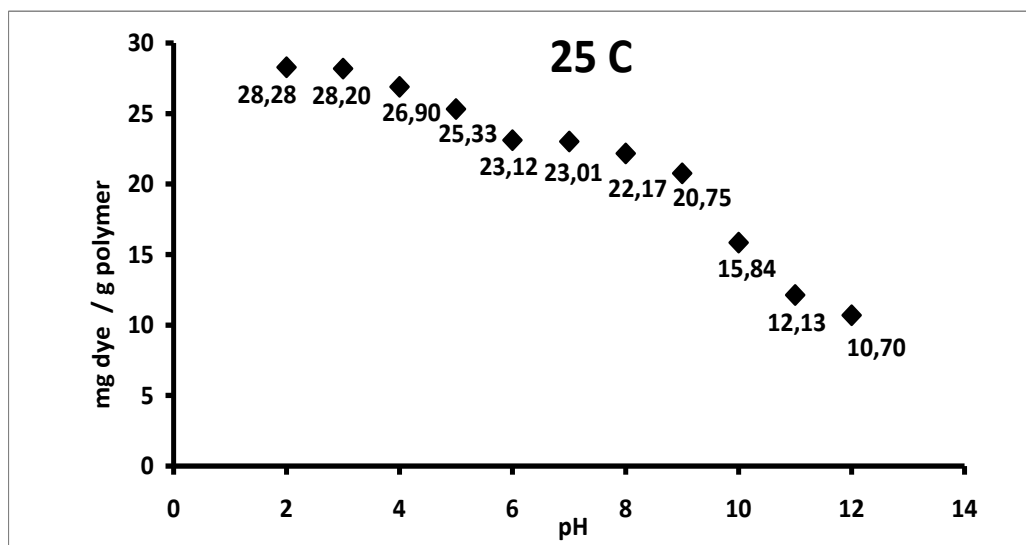
Maximum reactive orange 16 adsorption to poly (EGDMA-VIM) microspheres in the experiments was observed at pH 2.0. The relationship between the amount of reactive orange 16 adsorbed to the polymer microbeads and the starting pH is shown in Figure 4(a),(b),(c) and (d).

When the initial pH value of the solution of Reactive orange 16 is increased from 2.0 to 12.0; The amount of reactive orange 16 which is adsorbed per unit mass of adsorbent is decreasing. For example; When the pH value is increased from 2.0 to 12.0, the amount of reactive orange 16 adsorbed per adsorbent decreases from 27,41 mg / g to 7,04 mg / g.



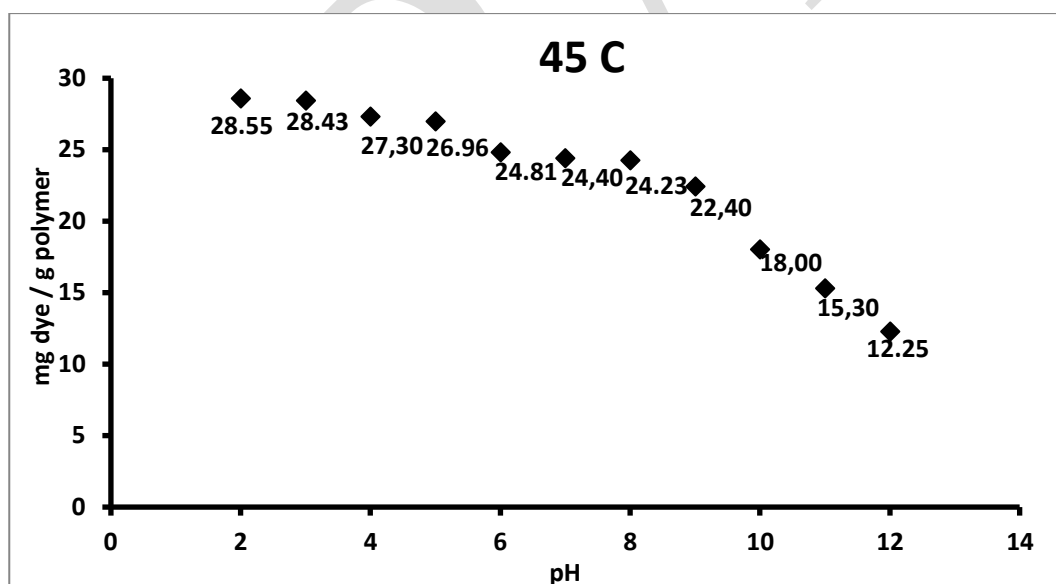
**Figure 4(a)** pH effect of RO16 adsorption of poly (EGDMA-VIM) microbeads at 4°C.

When the initial pH value of the solution of Reactive orange 16 is increased from 2.0 to 12.0; The amount of reactive orange 16 which is adsorbed per unit mass of adsorbent is decreasing. For example; When the pH value is increased from 2.0 to 12.0, the amount of reactive orange 16 adsorbed per adsorbent decreases from 28,28 mg / g to 10,70 mg / g.



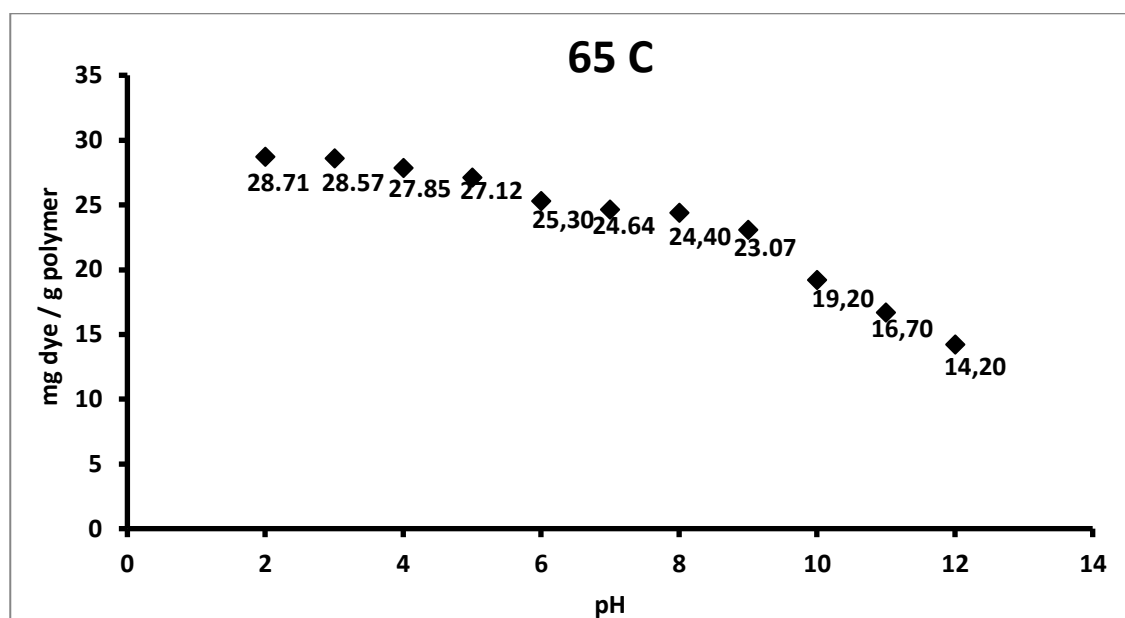
**Figure 4(b)** pH effect of RO16 adsorption of poly (EGDMA-VIM) microbeads at 25°C.

When the initial pH value of the solution of Reactive orange 16 is increased from 2.0 to 12.0; The amount of reactive orange 16 which is adsorbed per unit mass of adsorbent is decreasing. For example; When the pH value is increased from 2.0 to 12.0, the amount of reactive orange 16 adsorbed per adsorbent decreases from 28,55 mg / g to 12,25 mg / g.



**Figure 4(c)** pH effect of RO16 adsorption of poly (EGDMA-VIM) microbeads at 45°C.

When the initial pH value of the solution of Reactive orange 16 is increased from 2.0 to 12.0; The amount of reactive orange 16 which is adsorbed per unit mass of adsorbent is decreasing. For example; When the pH value is increased from 2.0 to 12.0, the amount of reactive orange 16 adsorbed per adsorbent decreases from 28,71 mg/g to 14,20 mg/g.



**Figure 4(d)** pH effect of RO16 adsorption of poly (EGDMA-VIM) microbeads at 65°C.

#### 4. Conclusion

In this study poly(ethylene glycol dimethacrylate-vinyl imidazole) [poly(EGDMA-VIM)]microbeads were employed as adsorbent for reactive orange 16. Adsorption technology enables the use of polymeric microbeads for rapid. In this study poly(EGDMA-VIM) were prepared and, was applied to the removal of reactive orange 16 from aqueous solutions.

Temperature effects of reactive orange 16, from aqueous solutions were studied by adsorption on poly(EGDMA-VIM). The poly(EGDMA-VIM) microbeads were synthesized and characterized; their use as adsorbent of temperature effects were investigated. In this study, the effects of temperature on adsorption were investigated. In this study, 4, 25, 45 and 65 °C temperatures were studied.

In this study for this reason, the effect of temperature on adsorption has been investigated in detail in pH: 2 and pH: 12. Maximum reactive orange 16 adsorption to poly (EGDMA-VIM) microspheres in the experiments was observed at pH 2.0.

Also maximum reactive orange 16 adsorption to poly (EGDMA-VIM) microspheres in the experiments was observed at 25 °C.

Our results suggest that poly(EGDMA-VIM) can be good reactive black 5 adsorbents and have great potential applications in environmental protection.

#### REFERENCES

- [1] Y. Yao, F. Xu, M. Chen, Z. Xu, and Z. Zhu, "Adsorption behavior of methylene blue on carbon nanotubes," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 9, pp. 3040–3046, 2010
- [2]. R. Malik, D. S. Ramteke and S. R. Wate, Adsorption of malachite green on groundnut shell waste based powdered activated carbon, *Waste Manage.*, 2007, 27, 1129–1138.
- [3]. Y. Zhang, P. Su, J. Huang, Q. Wang and B. Zhao, A magnetic nanomaterial modified with poly-lysine for efficient removal of anionic dyes from water, *Chem. Eng. J.*, 2015, 262, 313–318.
- [4] M. Shanehsaz, S. Seidi, Y. Ghorbani, S. M. R. Shoja and S. Rouhani, Polypyrrole-coated magnetic nanoparticles as an efficient adsorbent for RB19 synthetic textile dye: Removal and kinetic study, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2015, 149, 481–486.
- [5] Forgacs E, Cserhati T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ Int* 2004;30:953-71.
- [6] Papic S, Koprivanac N, Bozic AL, Metes A. Removal of some reactive dyes from synthetic wastewater by combined Al(III) coagulation/carbon adsorption process. *Dyes Pigments* 2004;62:293-300.



- [7] Nakagawa K, Namba A, Mukai SR, Tamon H, Ariyadejwanich P, Tanthapanichakoon W. Adsorption of phenol and reactive dye from aqueous solution on activated carbons derived from solid wastes. *Water Res* 2004;38:1791-8.
- [8] Kim TH, Park CH, Shin EB, Kim SY. Decolorization of disperse and reactive dye solutions using ferric chloride. *Desalination* 2004;161:49-58.
- [9]- M. L. Parisi, E. Fatarella, D. Spinelli, R. Pogni and R. Basosi, Environmental impact assessment of an eco-efficient production for coloured textiles, *J. Cleaner Prod.*, 2015, 108,514–524.
- [10] A. C. S. Rocha, M. A. Reis-Henriques, V. Galhano, M. Ferreira and L. Guimarães, Toxicity of seven priority hazardous and noxious substances (HNSs) to marine organisms: Current status, knowledge gaps and recommendations for future research, *Sci. Total Environ.*, 2016, 542, 728–749.
- [11] N.M. Mahmoodi and M. Arami, "Bulk phase degradation of Acid Red 14 by nanophotocatalysis using immobilized titanium (VI) oxide nanoparticles", *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 182 (2006) 60.
- [12] M.H. Entezari, Z.S. Al-Hoseini and N. Ashraf, "Fast and efficient removal of Reactive Black 5 from aqueous solution by a combined method of ultrasound and sorption process", *Ultr. Sonochem*, 15 (2008) 433.
- [13] M.S. Lucas and J.A. Peres, "Degradation of Reactive Black 5 by Fenton/UV-C and ferrioxilate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/solar light process", *Dye and Pigments*, 74 (2007) 622.
- [14] S. Chatterjee, S.-R. Lim, and S. H. Woo, "Removal of reactive black 5 by zero-valent iron modified with various surfactants," *Chemical Engineering Journal*, vol. 160, no. 1, pp. 27–32, 2010.
- [15] I. Arslan, I.A. Balcioglu and D.W. Bahnemann, Advanced chemical oxidation of reactive dyes in simulated dyehouse effluents by ferrioxalate-fenton/UV-A and TiO<sub>2</sub>/UV-A processes. *Dyes Pigments*, 47 (2000) 207–218.
- [16] Z. Eren and F.N. Acar, "Adsorption of reactive black 5 from an aqueous solution equilibrium and kinetic studies", *Desalination*, 194 (2006) 1–10.
- [17] G. Akkaya, I. Uzun and F. Güzel, "Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin", *Dyes Pigment*, 73 (2007) 168–177.
- [18] O. Gulnaz, A. Kaya and S. Dincer, "The reuse of dried activated sludge for adsorption of reactive dye", *J. Hazard. Mater.*, 134 (1–3) (2006) 190–196.
- [19] A.K. Jain, V.K. Gupta, A. Bhatnagar and Suhas, "Utilization of industrial waste products as adsorbents for the removal of dyes", *J. Hazard. Mater.*, B101 (2003) 31–42.
- [20] Mohan ve diğ. 2008; Akar ve ark. 2009
- [21] A. Özcan, E.M. Öncü and A.S. Özcan, "Kinetics isotherm and thermodynamic studies of adsorption of acid blue 193 from aqueous solutions onto natural sepiolite", *Colloid Surf. A*, 277 (2006) 90–97.
- [22] Z. Aksu and S. Tezer, Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. *Process Biochem.*, 36/5 (2000) 431–439.
- [23] N.H. Ince and G. Tezcanlı, Reactive dyestuff degradation by combined sonolysis and ozonation. *Dyes Pigments*, 49 (2001) 145–153.
- [24] L. Xubiao, Z. Youcai, H. Yining, Y. Lixia, T. Xinman, L. Shenglian, *J. Hazard Mater.*, 2011, 187 (9), 274–282.
- [25] A. Behnamfard and M.M. Salarirad, *J. Hazard Mater.*, 2009, 170, 127-133
- [26] Bhattacharyya, K. Adsorption characteristics of the dye, Brilliant Green, on Neem leaf powder. *Dyes Pigment*. 2003, 57, 211–222.
- [27] Crini, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 1061–1085.
- [28] D. Mohan, S.C.U. Pittman, Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water, *J. Hazard. Mater.* 137 (2006) 762–811.
- [29]-Bilsen Tural, Tuba Tarhan, Servet Tural, Removal Of Reactive Black 5 (Rb5) From Aqueous Solution by Cross-Linked Magnetic Biosorbent, *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, ISSN: 2321-9009, Vol-5, Iss-3, Spl. Issue-1 Aug.-2017
- [30]-Khalid Z. Elwakeel, Removal of Reactive Black 5 from aqueous solutions using magnetic chitosan resins, *Journal of Hazardous Materials* 167 (2009) 383–392
- [31] A. L. Ahmad, M. M. Loh, and J. A. Aziz, "Preparation and characterization of activated carbon from oil palm wood and its evaluation on methylene blue adsorption," *Dyes and Pigments*, vol. 75, no. 2, pp. 263–272, 2007.
- [32] Suteu, D.; Biliuta, G.; Rusu, L.; Coseri, S.; Nacu, G. Cellulose Cellets as new type of Adsorbent for the removal of Dyes from aqueous media. *Environ. Eng. Manag. J.* 2015, 14, 525–532.
- [33] Calvete et al. 2009; Liang et al. 2010
- [34] Lee, Choi ve ark.; 2006 ; Characterization of Reactive Orange 16
- [35]- Ali Kara , Lokman Uzun, Necati Besirli , Adil Denizli , Poly(ethylene glycol dimethacrylate-n-vinyl imidazole) beads for heavy metal removal; *Journal of Hazardous Materials* 106B (2004) 93–99

## Şeftali (*Prunus persica* (L.) Batsch) bitkisinin organogenezle çoğaltımı

Nazmi GÜR<sup>1</sup>, Yeşim MURAT<sup>1</sup>, Seher GÜR<sup>2</sup>, Aykut TOPDEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ngur@firat.edu.tr

### Özet

Şeftali'nin geleneksel vejetatif çoğaltma yöntemleri genellikle zaman alıcıdır ve mevsime bağlı olarak düşük çoğalma hızına sahiptir. Bu durum değerli bitki materyallerinin sınırlı kullanımını sağlar. Son yıllarda meyve fidan yetiştiriciliği "in vitro" kültür yöntemlerini kapsayan yüksek miktarlarda verim ve hastalısız bitki üretimine olanak tanıyan "biyoteknolojik" yöntemlerle yapılmaktadır. Bu çalışmada şeftali bitkisinin mikroçoğaltımı için bir protokol geliştirmek amacıyla, nodal eksplantlar kullanılarak sterilizasyon, sürgün oluşturma, köklendirme ve aklimatizasyon çalışmaları yapılmıştır. Besin ortamı olarak Murashige Skoog besiyerinin kullanıldığı araştırmamızda en iyi Sürgün oluşturma yeteneği 1 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren besiyerinde gözlemlenmiştir. Picloram içeren besi yerlerinde sürgün oluşumu gözlemlenmezken sadece kallus oluşumları gözlemlenmiştir. En az sürgün oluşumu ise, 2,4-D içeren besi yerlerinde kaydedilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Şeftali, *Prunus persica* (L.) Batsch, in vitro, organogenez.

### Reproduction of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) by organogenesis

#### Abstract

Peach's traditional vegetative propagation methods are often time-consuming and have low growth rates depending on the season. This allows for limited use of valuable plant materials. In recent years, fruit sapling cultivation has been carried out with "in vitro" culture methods including "biotechnological" methods that allow high yield and disease-free plant production. In this study, sterilization, shoot formation, rooting and acclimatization studies were performed by using nodal explants in order to develop a protocol for micro-propagation of peach plant. In our study using Murashige Skoog medium as the food medium, the best shoot formation ability was observed in 1 mg / L BAP + 1 mg / L NAA medium. In shoots containing picloram, shoot formation was not observed but only callus formations were observed. The least shoot formation was recorded in the medium containing 2,4-D.

**Keywords:** Peach, *Prunus persica* (L.) Batsch, in vitro, organogenesis.

#### GİRİŞ

Sert çekirdekli meyveler grubunda bulunan Latince adı ile "Prunus persica L. Batsch" olarak bilinen şeftali Türkiye'de meyve üretiminde gelişme gösteren önemli meyve türlerinden birisidir (Çetinbaş, 2010). Şeftali (*Prunus persica* L. Batsch), 2n = 16 kromozom sayısında olup Rosaceae' nin bir alt familyası olan Prunoideae' ye aittir. Prunus, kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yaklaşık 400 tür içerir (Krusmann, 1986). Şeftali bitkisi meyve olarak kullanılabilirliği gibi süs bitkisi olarak da değerlendirilmektedir. Dünyada kuzey-güney yarım kürelerin 30o – 45o enlemlerinde ılıman ve subtropik iklime sahip alanlarda bulunurlar (Scorza and Okie 1991; Scorza and Sherman 1996). Ülkemizde sert çekirdekli meyveler içinde yer alan şeftali, kayısıdan sonra en fazla yetiştirilen meyve çeşididir. Türkiye şeftali üreticiliği açısından uygun standartlarda iklimsel özelliklere sahip bölgeleri bulundurmasına rağmen Akdeniz ülkeleri arasında dahi yer alamamıştır (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, 2011, Yağmur ve Bülent, 2015). Son zamanlarda kalkınmış ülkelerde, sert çekirdekli meyve türleri için seçilen klon anaçları, hastalısız olarak doku kültürü yöntemleri ile çoğaltılmaktadır (Muna ve ark., 1999; Erturk ve ark., 2007). Ülkemizde ise, klon anaçı üretimi yaygın hale gelememiştir. Bu nedenle, klon anaçları genellikle diğer ülkelerden ithal etme zorunluluğunu doğurmuştur.

Türkiye’de klon anacı çoğaltımının artırılması, anaç malzemelerin ithalini engelleyecek ve maliyeti azaltacaktır (Anonim, 2008)

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada, Elazığ ili, Baskil ilçesi, Sütlüce köyü’nden toplanan üzerinde aksiler tomurcuk bulunduran şeftali (*Prunus Persica* (L.) Batsch) dalları kullanılmıştır.

### Metot

#### Yüzey Sterilizasyonu

Toplanan şeftali dalları yapraklarından ayrılarak akan musluk suyu altında bir saat bekletilmiştir. Yapraklarından ayrılan dallar 1.5-2 cm uzunluğunda olacak şekilde boğum aralarından (sürgün ucu kısımlarından) kesilmiştir. Boğum aralarından kesilen eksplantlar bir beher içerisine koyularak ön sterilizasyon işlemi için üzerine su ilave edilip suda yarım saat bekletilmiştir. Yarım saat içerisinde su 3 kez süzülüp tazelenmiştir.

#### Kültür Başlangıcı

#### Besin Ortamlarının Hazırlanması

Besiyeri hazırlanırken ilk aşama olarak, 1 litrelik besiyeri ortamı için 1 litre saf su içerisine % 3 sükroz ve 4,4 gr MS (Murashige ve Skoog) hassas terazide tartılarak ilave edildi. Ortamın pH’ı 5,7-5,8 olarak ayarlandı.

#### Sürgün Çoğaltımı

#### Sürgün Çoğaltımı İçin Ortam Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Eksplantlar sürgün oluşumu için sükroz, plant agar, MS ve belirli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren magenta kaplarındaki besin ortamlarına kültürlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyici olarak BAP (Benzilaminopürin), IBA (İndol Bütirik Asit), IAA ( İndol-3 asetik asit), NAA (Naftalin asetik asit), 2,4-D (Diklorofenoksiasetikasit) ve Picloram farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Tablo 1). Sürgün oluşumu için sükroz, MS ve plant agar içeren besin ortamına ek olarak 1 mg/L BAP + 1, 0,5, 0,25 mg/L konsantrasyonlarında IBA, IAA, NAA, 2,4D ve Picloram kombinasyonu ve 0,5 mg/L BAP+ 1-0,5-0,25 mg/L konsantrasyonlarında IBA, IAA, NAA, 2,4-D ve Picloram kombinasyonu olacak şekilde 2 protokol uygulanmıştır. IBA, IAA, NAA, 2,4-D ve Picloram bitki büyüme düzenleyicilerinin her konsantrasyonu için 5 paralel olmak üzere 150 magenta kabı kültürlenmiştir.

**Tablo 1.** Sürgün Oluşumu İçin Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyici Kombinasyonları.

Bitki Büyüme Düzenleyici	BAP (1 mg/l)	BAP (0.5 mg/l)
IAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
IBA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
NAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
2,4D	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Picloram	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan nodal eksplantların, Tablo 1. deki gibi farklı konsantrasyonlarda BBD içeren MS besiyerlerinde kültürlere alındıktan 15 gün sonra filizlenme başlangıçları gözlemlenmiştir. 0.5-1 cm aralığında değişim gösteren filizler günlük olarak takip edilmiştir. Sürgün oluşumunda belirli aralıklarla sürgün sayıları ve uzunlukları kaydedilmiştir. Her BBD kombinasyonu ve konsantrasyonundan 5 paralel olacak şekilde toplamda 150 tane ekim yapılmıştır. Bu ekimlerdeki sürgün gelişim %’leri (Tablo 2) hesaplanmıştır.

**Tablo 2.** Sürgün Gelişim %'leri.

Bitki Büyüme Düzenleyiciler	Sürgün Gelişim (%)			
	BAP ( 0.5 mg/L)		BAP ( 1 mg/L)	
IAA	1 mg/L	80	1 mg/L	80
	0.5 mg/L	80	0.5 mg/L	80
	0.25 mg/L	60	0.25 mg/L	40
IBA	1 mg/L	60	1 mg/L	40
	0.5 mg/L	80	0.5 mg/L	80
	0.25 mg/L	60	0.25 mg/L	80
P	1 mg/L	-	1 mg/L	-
	0.5 mg/L	-	0.5 mg/L	-
	0.25 mg/L	-	0.25 mg/L	-
NAA	1 mg/L	60	1 mg/L	100
	0.5 mg/L	80	0.5 mg/L	80
	0.25 mg/L	40	0.25 mg/L	80
2,4-D	1 mg/L	40	1 mg/L	80
	0.5 mg/L	80	0.5 mg/L	20
	0.25 mg/L	80	0.25 mg/L	-

Tablo 2' de görüldüğü gibi en fazla sürgün oluşumu 1 mg/L BAP +1 mg/L NAA içeren besi yerlerinde gözlemlendi. Yaprak uzunluğunun ise en fazla (28.9 mm) 0.5 mg/L BAP+ 1 mg/L NAA içeren besiyerlerinde kaydedilmiştir. En az sürgün oluşumu, Tablo 2'de de görüldüğü üzere 2,4-D içeren besi yerlerinde kaydedildi. Bununla birlikte P içeren besi yerlerinde ise hiçbir sürgün oluşumu (%0) gözlemlenmiş ancak bu besiyerlerindeki eksplantlarda yer yer kallus oluşumları gözlemlendi.

Tablo 3'te 0.5 mg/L BAP ile birlikte kullanılan 4 farklı BBD'lerinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarının şeftali nodal eksplantlarında sürgün gelişimi üzerine olan etkisi ANOVA testi kullanılarak ortalama (Mean) ve standart sapma (SE) değerleriyle hesaplandı. Bu test sonucunda elde edilen p (anlamlılık değeri) değerine göre yaptığımız çalışmanın ve elde ettiğimiz verilerin doğruluğu ( $p \leq 0,05$ ) saptandı.

**Tablo 3.** 0.5 mg/ L BAP ve 4 farklı oksinin "*P. persica* L. Batsch" eksplantlarında sürgün gelişimine etkileri.

BBD'ler ve Konsantrasyonları		Mean+ SE	p değeri ( <0,05 )
IAA	1 mg/L	4,6000 ± 1,28841	0.041 < 0.05
	0.5 mg/L	6,6000 ± 1,69374	
	0.25 mg/L	1,4000 ± 0,60000	
IBA	1 mg/L	1,6000 ± 0,678323	0.032 < 0.05
	0.5 mg/L	6,2000 ± 1,59374	
	0.25 mg/L	2,2000 ± 1, 01980	
2,4- D	1 mg/L	1,0000 ± 0,63246	0.041 < 0.05
	0.5 mg/L	3,0000 ± 0,89443	
	0.25 mg/L	5,2000 ± 1,39284	
NAA	1 mg/L	1, 8000 ± 0,80000	0.024 < 0.05
	0.5 mg/L	5,8000 ± 1,56205	
	0.25 mg/L	1,2000 ± 0,73485	

NAA'nın eksplant başına sürgün sayıları ANOVA testine tabi tutulup anlamlılık değeri 0.024 olarak hesaplandı. 0.024<0,05 olduğundan elde ettiğimiz sonuçlar anlamlıdır. Aynı şekilde yapılan diğer BBD'lerinde de anlamlılık değerleri 0,05'ten küçük bulunarak sonuçların anlamlı olduğunu göstermiştir.

**Tablo 7.** 1 mg/ L BAP ve 4 farklı oksinin “*P. persica* L. Batsch” eksplantlarında sürgün gelişimine etkileri.

BBD’ler ve Konsantrasyonları		Mean + SE	p değeri ( < 0,05 )
IAA	1 mg/L	5,0000 ± 1,48324	0.046 < 0.05
	0.5 mg/L	6,4000 ± 1,63095	
	0.25 mg/L	1,0000 ± 0,73485	
IBA	1 mg/L	1,0000 ± 0,63246	0.040 < 0.05
	0.5 mg/L	4,4000 ± 1,20830	
	0.25 mg/L	5,8000 ± 1, 56205	
2,4- D	1 mg/L	3,8000 ± 1,01980	0.004 < 0.05
	0.5 mg/L	0,6000 ± 0 ,60000	
	0.25 mg/L	0,0000 ± 0,00000	
NAA	1 mg/L	7,8000 ± 0,66332	0.001 < 0.05
	0.5 mg/L	3,4000 ± 0,92736	
	0.25 mg/L	2,4000 ± 0,67823	

Tablo 4’te 1 mg/L BAP ile birlikte kullanılan 4 farklı BBD’lerinin farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarının şeftali nodal eksplantlarında sürgün gelişimi üzerine olan etkisi ANOVA testi kullanılarak ortalama (Mean) ve standart sapma (SE) değerleriyle hesaplandı. Bu test sonucunda elde edilen p (anlamlılık değeri) değerine göre yaptığımız çalışmanın ve elde ettiğimiz verilerin doğruluğu ( $p \leq 0,05$ ) saptandı. NAA’nın eksplant başına sürgün sayıları ANOVA testine tabi tutulup anlamlılık değeri 0.001 olarak hesaplandı.  $0.001 < 0,05$  olduğundan elde ettiğimiz sonuçlar anlamlıdır. Aynı şekilde yapılan diğer BBD’lerinde de anlamlılık değerleri 0,05’ten küçük bulunarak sonuçların anlamlı olduğunu göstermiştir.

## SONUÇ

Nodal eksplantlardan sürgün oluşumu için yaptığımız çalışmada Tablo 2’deki sonuçlar göz önüne alındığında; farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda P içeren besi yerlerinde hiçbir sürgün oluşumu (%0) gözlemlenmedi. Şeftali bitkisi kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmaları arasında P’in kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. P içeren besi yerlerinde sürgün yerine sadece kallus oluşumu gözlemlendi. Maksimum sürgün oluşumu, 1 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren besiyerinde gözlemlendi. Şeftali bitkisinden farklı olarak sert çekirdekli meyveler kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmalarına baktığımızda; Yıldırım ve ark.’nın 2011 yılında yaptığı kayısı (*Prunus armeniaca* L.) cv.’nin mikroçoğaltımı’nda; 2 mg/L BAP içeren ortamların (Yıldırım ve ark., 2011), 2008 yılında yapılan badem (*Amygdalus communis* L. cv.) anacının mikroçoğaltımı çalışmasında, 1 mg/L BAP konsantrasyonunun (Isikalan ve ark., 2008) en iyi sürgün gelişim ortamları olduğunu

bildirmişlerdir. Şeftali bitkisi kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında ise, Shehata ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı bir mikroçoğaltım çalışmasında, 0.5 mg/L BAP+0.1 mg/L IBA içeren ortamların (Shehata and Al-Khayri, 2012), 2015 yılında yapılan bir mikroçoğaltım çalışmasında, 0.5 mg/L BAP+0.01 mg/L IBA içeren ortamların (Felek ve ark., 2017) Dejanpour ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı bir mikroçoğaltım çalışmasında, 2 mg/L BAP içeren ortamların (Dejanpour ve ark., 2011) ve 2015 yılında yapılan diğer bir mikroçoğaltım çalışmasında ise 2 mg/L BAP içeren ortamların (Ahmed ve ark., 2015) kullanıldığı besiyerlerinde en iyi sürgün oluşumlarının gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Ancak yaptığımız çalışma sonucunda BAP konsantrasyonunun artmasının, P, 2,4-D, IAA oksinlerinin bulunduğu besiyerlerinde, sürgün canlılığında azalmaya ve kallus oluşumlarına neden olduğu gözlemlendi. Kallus oluşumu ile BAP konsantrasyonunun artışı arasındaki paralellik birkaç mikroçoğaltım çalışmasında da gözlemlenmiştir (Gürel ve Gülşen, 1998; Isikalan ve ark., 2008). Bu sonuç istenmeyen bir durumdur çünkü kallus oluşumu mikroçoğaltımın bir sonraki aşaması olan kök gelişimine engel olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed S and Mbarki R, Hamz E and Momtaz A 2015. Effect Of Cytokinin Types On Micropropagation Of Nemaguard Peach, *Minufiya J. Agric.* 40. 155-168.
- Anonim, 2008d. <http://www.bahcesel.com/content/view/914/3188/>.
- Çetinbaş M 2010, Bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin 'Monreo' şeftali çeşidinde verim ve meyve kalitesi üzerine etkisi, Doctoral dissertation, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dejanpour J, Majidi I, Khosravi S, Farhadi S and Shadmehr A 2011. In Vitro Propagation of HS314 Rootstock (*Prunus amygdalus* × *P. persica*), *HortScience*, 46(6), 928-931.
- Ertürk U, Sivritepe N, Yerlikaya C, Bor M, Özdemir F, ve Turkan I 2007, Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro, *Biologia Plantarum*, 51(3), 597-600.
- Felek W, Mekibib F and Admassu B 2017. Micropropagation of Peach (*Prunus persica* L. Batsch. Cv. Garnem), *African Journal of Biotechnology*, 16(10), 490-498.
- Gürel S and Gülşen Y 1998. The effects of IBA and BAP on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.), *Turkish Journal of Botany*, 22(6), 375-380.
- Isikalan C, Akbas FA, Namli S, Tilkat E and Basaran D 2008. In vitro micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil), *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
- Krussmann G 1986, Manual of cultivated broad leaved trees and shrubs. Vol. 3. Timber Press, Portland, Oregon. pp. 18-58.
- Muna AS, Ahmad AK, Mahmoud K and Abdul-Rahman K 1999. In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 203-208.
- Scorza R and Okie WR 1991, Peaches (*Prunus*), Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops 290, 177-234.
- Scorza R and Sherman WB 1996, Peaches (Eds. J. Janick and J.N. Moore). Fruit Breeding, Vol I: Tree and Tropical Fruits, John Wiley & Sons, Inc, New York, pp: 325-440.
- Shehata WF and Al-Khayri JM 2013. Conservation of Endangered Hassawi Peach (*Prunus persica* L.) Through Micropropagation. *Journal of Biological Sciences* Volume 13 (2): 75-81.
- T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Bahçecilik Yetiştiriciliği, Ankara 2011.  
[http://www.megep.meb.gov.tr/mte\\_program\\_modul/moduller\\_pdf/%C5%9Eeftali%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/%C5%9Eeftali%20Yeti%C5%9Ftiricili%C4%9Fi.pdf) (Erişim Tarihi: 20/09/2018).
- Yağmur B ve Bülent OKUR 2015. Salihli (Manisa) yöresindeki şeftali (*Prunus persica* L.) bahçelerinin beslenme ve kirlilik durumları, *Meyve Bilimi*, 2(1), 16-26.
- Yıldırım H, Onay A, Tilkat E ve Aktürk Z 2011. Micropropagation of the apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Hacıhaliloğlu by means of single node culture, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(1), 55-64.

## Heavy metals' chemical partitioning in solid matrices and their use in environmental studies

E. Duyuşen Güven\*, Gökem Akıncı

Dokuz Eylül University, Department of Environmental Engineering, Izmir, Turkey

\*Corresponding author: duyusen.kokulu@gmail.com

### Abstract

The mobilities and behaviors of metals in the environment are determined by their specific physicochemical forms rather than by their total concentrations. Since each form has separate binding properties, chemical fractionation of the metals in the solid phase environmental samples gives a better indication of the environmental impact of them. The determination of the chemical speciation at present are based on sequential extraction procedures by using several reagents to extract the defined phases from the solids. The major methods used in the literature are the Tessier extraction method and the BCR sequential extraction scheme, which is a simplified version of Tessier procedure. Both methods define the selected fractions from labile to stable forms such as exchangeable, carbonate bound, Fe-Mn oxides bound, organic matter bound, and residual fractions. Numerous studies have been conducted in order to determine the metals' speciation in environmental samples such as soils, sediments, mining wastes, solid waste composts, sewage sludge. Among them, soils and sediments constitute the major portion of the studies, since they are the distinctive environmental medias that metal pollution can be determined. After defining the importance of chemical distribution in environment, a number of studies have been discussed in this paper investigating and explaining the metals' fractioning in sediments, soils, sludges, mining wastes, composts, and road dusts. The results highlight the significance of determination of heavy metals in chemical forms, and emphasize their environmental behaviors and polluting impacts.

**Keywords:** heavy metals, chemical speciation, environment, pollution

### INTRODUCTION

Metals are frequent and important contaminants, which have the effects on all spheres of the environment, which are, hydrosphere, lithosphere, biosphere and atmosphere. Their multiple industrial, domestic, agricultural, medical and technological applications have caused wide distribution in the environment, leading to their raised potential effects on human health and the environment (Tchonwou et al., 2014). Because of their toxicity, persistency and tendency to accumulate in organisms, heavy metals are kept under serious pollutant category in the environment (Rajeswari and Namburu, 2014).

Heavy metals in solid environmental matrices (soils, sediments, street dusts, mining wastes, composts, etc.) exist in several different forms associated with a range of components. The particular behaviours of metals in the environment are determined by their specific physicochemical forms rather than by their total concentrations (Tack and Verlo, 1995). In other words, the fate and transport of the metals in an environment depends significantly on the chemical form and speciation of the metal (Rajeswari and Namburu, 2014). Chemical speciation (chemical fractionation, distribution) can be defined as the identification and quantification of different species, forms or phases present in a material, or the description of these (Fytianos and Laurantou, 2004). Chemical fractionation of the metals gives a better indication of the environmental impact of them, since each form has separate binding properties.

The current study aims to make an assessment on the use of chemical partitioning of heavy metals for different solid environmental matrices. Published studies covering the metals' chemical partitioning in soils, sediments, wastewater sludge samples, and composts will be examined in order to point out their realistic environmental impacts. Selected sequential extraction procedures used to determine these fractions will be mentioned in order to lay out the literature studies about this subject.

### Heavy metals in the environment

Heavy metals are defined as the naturally occurring elements that have high atomic weights and high densities, which are at least five times greater than the water's density (Masindi and Muedi, 2018). They are the group of elements with similar and chemical properties, they are persistent and they have the tendency to accumulate in the living organisms (Rajeswari and Namburu, 2014). Heavy metals are counted among the most significant inorganic contaminants due to their non-degradable nature and toxic effects on plants, animals, and human beings. Although heavy metals are the naturally occurring elements found in the earth's crust, they are concentrated in the nature due to the anthropogenic impacts. The reported sources of the metals in the



environment include geogenic, industrial, agricultural, pharmaceutical, domestic effluents as well as urban effects (i.e. traffic emissions) and atmospheric sources (Tchounwou et al., 2014).

Originating from both natural and anthropogenic processes, heavy metals end up in different matrices in the environment such as soil, water, air, and their interface areas. In addition, they can be found largely on the bottom sediments of various water bodies such as lakes, streams, and seas. As their concentrations increase above the natural background levels for a definite site, then the area can be assumed as “polluted by heavy metals”. The most common heavy metals are lead (Pb), nickel (Ni), chromium (Cr), cadmium (Cd), arsenic (As), mercury (Hg), zinc (Zn) and copper (Cu) (Masindi and Muedi, 2018).

Figure 1 shows the heavy metals sources in different matrices in the environment. Heavy metals occur naturally, as they are components of the lithosphere and are released into the environment through volcanism and weathering of rocks (Fergusson, 1990). However, heavy metals in the aquatic environment is often generated from anthropogenic activities such as increasing urbanization, industrial development, and recreational activities. Some important anthropogenic sources which significantly contribute to the heavy metal contamination in the environment include automobile exhaust which releases lead; smelting which releases arsenic, copper and zinc; insecticides which release arsenic and burning of fossil fuels which release nickel, vanadium mercury, selenium and tin (Masindi and Muedi, 2018). Industrial processes that release a variety of metals into waterways include mining, smelting and refining. Almost all industrial processes that produce waste discharges are potential sources of heavy metals to the water bodies (Denton et al., 1997). The industrial processes that release a variety of metals into waterways include mining, smelting and refining. Domestic wastewater, sewage sludge, urban runoff, and leachate from solid waste disposal sites are also obvious sources of heavy metals into rivers, estuaries and coastal waters (Mance, 1987).

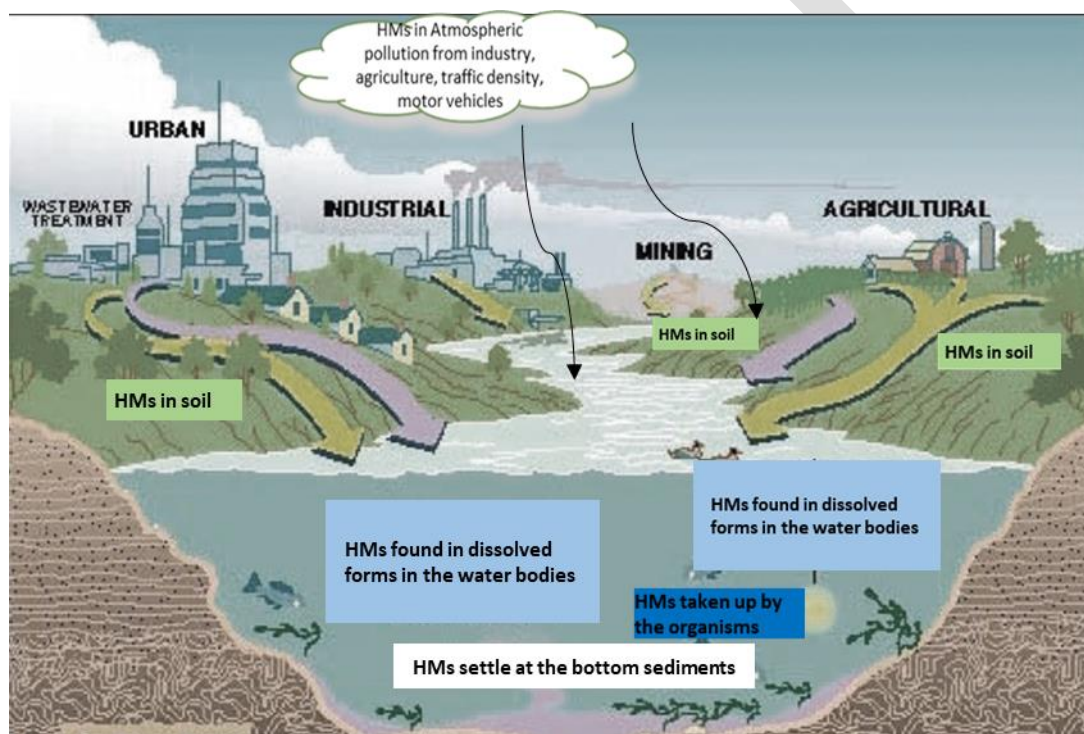


Figure 1. Heavy metals in the environment (Adopted from Masindi and Muedi, 2018)

Heavy metals are emitted into the air from many industrial plants and heavy traffic loads in the urban areas. Metals in the air can fall back to earth as rain, enter the water bodies, and cause water pollution (Woodford, 2006). Heavy metals in the atmosphere can sink on the earth as dry atmospheric deposition and cause heavy metal pollution in soils and road dusts.

Soil heavy metals may have various sources such as; geochemical background, atmospheric deposition, run off water washing, contaminated areas such as landfills and industrial areas, and irrigation water and agrochemicals used in parks and recreational areas (Alloway, 2013).

Being accumulated at the bottom of the water bodies, the heavy metals in sediments come from natural sources (rock weathering, soil erosion, etc.) as well as anthropogenic sources such as municipal wastewater-treatment plants, industries, and agricultural activities etc.

## METHODS TO DETERMINE THE FRACTIONATION OF SOLID PHASE ASSOCIATED METALS

Chemical fractionation significantly influences the metals' mobility in the solid phase environmental samples. In order to determine the chemical speciation, the most widely used methods at present are based on sequential extraction procedures where several reagents are used consecutively to extract operationally defined phases from the solids (Morillo et al., 2004). In the past a major method improved by Tessier and his colleagues was used to determine different forms of metals in sediments (Tessier et al., 1979). This procedure, defines five selected fractions such as exchangeable, bound to carbonates, bound to Fe-Mn oxides, bound to organic matter, and residual. Being as the versions of Tessier extraction procedure, many other procedures were improved and used in environmental studies. Recently, a scheme developed by the European Commission for Standards, Measurement and Testing (ECTS&T, previously BCR) has been widely used which is the simplified and less time consuming version and which divides metals into four bounding fractions such as exchangeable and acid soluble, reducible, bound to organic matter, and residual fractions (Rauret et al, 1999). Table 1 presents the properties of the binding fractions for both Tessier and modified BCR Sequential Extraction Procedures.

Table 1. The bounding fractions defined in sequential extraction procedures

Method	Fraction	Bounding properties
Tessier Scheme	Exchangeable	The most labile materials which are under the effects of sorption-desorption processes, and easily effected by changes in water ionic composition
	Bound to carbonates	The metals bound on the carbonates; this fraction would be susceptible to changes of pH.
	Bound to iron-manganese oxides	Iron-manganese oxides are excellent scavengers for trace metals and are thermodynamically unstable under anoxic conditions (i.e., low Eh)
	Bound to organic matter	Trace metals bound to various forms of organic matter: living organisms, detritus, coatings on mineral particles, etc.
	Residual	The metals on the residual solid containing mainly primary and secondary minerals, which may hold trace metals within their crystal structure.
BCR Extraction Procedure	Exchangeable and acid soluble	Weekly absorbed metals which can be released easily by ion exchange processes and affected by pH changes
	Reducible	Metals bound to iron and manganese oxides which may be released if the solid phase changes from oxic to anoxic state
	Bound to organic matter (oxidizable)	Metals bound to organic matter like sulfides and degradation of organic matter under oxidizing conditions can release the metals bound to this component
	Residual	Metals bound within the cyristal matrix, and nor expected to be released under normal conditions in nature

The chemical binding fractions in both procedures are almost similar as given in Table 1, the Tessier scheme presents a detailed separation of the labile fractions (step 1 and 2). Besides, the extraction steps have similar experimental applications used in environmental studies. The extraction schemes are summarized in Figure 2.

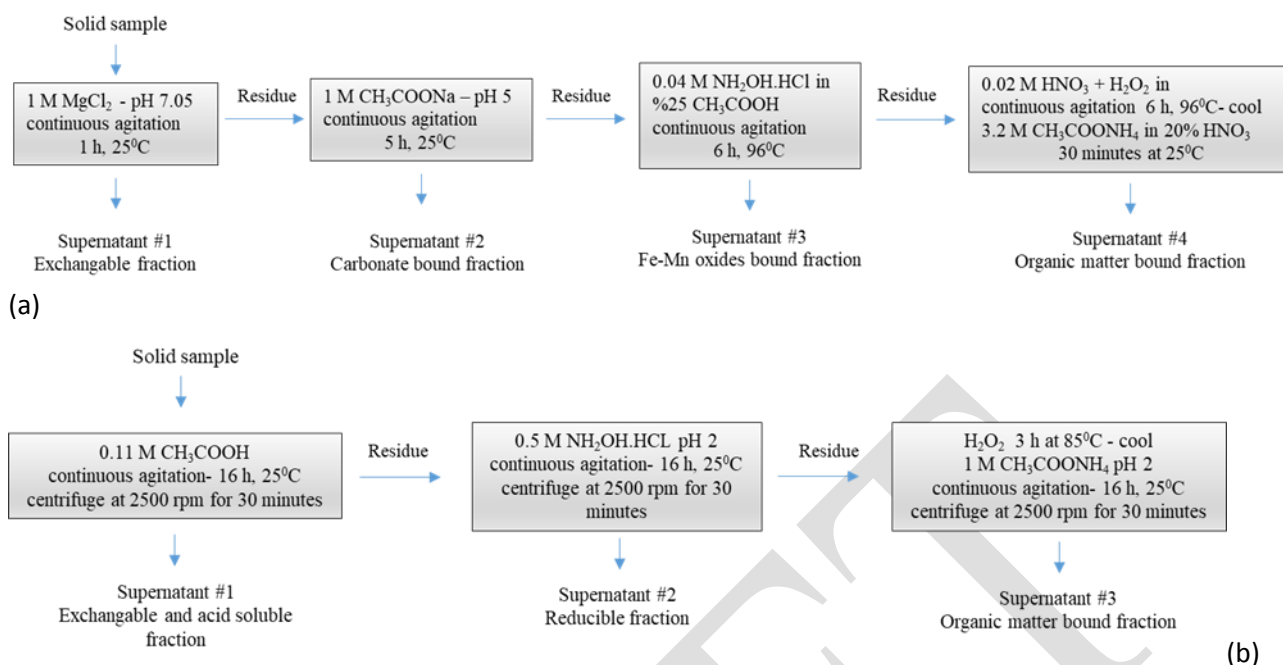


Figure 2. a. Flow diagrams of (a) Tessier Extraction Scheme (b) Modified BCR Extraction Procedure

## HEAVY METALS' CHEMICAL FRACTIONATION IN ENVIRONMENTAL STUDIES

Numerous studies have been conducted in order to determine the chemical fractionation of heavy metals in different solid phase environmental samples such as soils, sediments, mining wastes, solid waste composts, sewage sludge, etc. Among them, soils and sediments constitute the major portion of the studies. This section separately mentions the chemical distribution of the heavy metals in different solid matrices.

### Chemical partitioning of metals in soils

Lu et al. studied the chemical fractionation of Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe and Mn in urban soils of Guangzhou city in China by taking samples from 40 points. They worked with top 10 cm layer of the soil and used the modified BCR sequential extraction technique. The solid of Guangzhou appeared to be polluted by Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn where the higher concentrations were detected in urban parks and industrial sites. The modified BCR sequential extraction technique showed that Cu, Fe, Ni, Pb and Zn were primarily in the residual fractions (average ratios were 51.2%, 88.4%, 75.2%, 37%, and 49.6%, respectively) and reducible fractions (average ratios were 23.3%, 11.4%, 12.8%, 55.2%, and 22.9%, respectively). Mn was found to be uniformly distributed among the exchangeable and acid soluble residual, and reducible fractions with the ratios of 33.2%, 32.6%, and 30.6%, respectively. The HOAc extractable Cd in soils is the highest among all heavy metals (44.6% of total). Cadmium was found to be the most mobile and iron was the least mobile of the elements in the urban soils of Guangzhou (Lu et al., 2007).

In another study, Pichtel and his friends studied chemical fractions of Pb, Cd, and Ba in two former industrial sites; a superfund facility and a Pb battery dump located in the Midwest USA. The sequential extraction was performed by using KNO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>EDTA, and HNO<sub>3</sub> to determine the exchangeable, organic, carbonate, and sulfide-residual fractions. Sequential extraction results indicate that, for the Superfund site, 71.4% of the Pb, 83.5% of the Cd and 53.2% of the Ba were not associated with the residual fraction. Similarly, the percentages of Pb, Cd and Ba in the non-residual fraction for the dumpsite were 92.2%, 77.7%, and 46.3%, respectively showing that these metals were highly available for plant uptakes in the area (Pitchel et al., 2000).

In 2003, Imperato et al. investigated the spatial distribution of heavy metals in Naples city (Italy) by collecting 173 soil samples from the urban sites including a motorway and old oil refineries. According to the results, Cu and Cr were mainly found in the oxidizable (~68%) and residual (~24%) fractions, while the other forms consisted the metals in less than 10% of the total. Lead was primarily held in the residual mineral fraction (77%) with smaller amounts held in oxidizable (18%) and reducible (3%) forms. Zinc was uniformly distributed between easily extractable (23%), reducible (24%) and residual (49%) fractions, with a very small

percentage occurring in oxidizable forms (4%). This finding showed that this element is potentially bioavailable and may leach through the soil (Imperato et al., 1999).

Sanchez et al. investigated the forms of Cd, Pb, and Zn in polluted mining soils in Soria province, Spain. The 40 samples were collected from the Pb-Zn mining area (10 from the mine dumps and 30 from nearby cultivated areas). The sequential extraction method of Tessier et al (1979) was used to partition the selected metals. The results showed that the greatest amounts of Cd were present in the exchangeable form. The highest amounts of Zn and Pb were found in the residual and oxide fractions. The authors explained this different pattern with regard to the Cd fractionation as the consequence of a lower Cd input into the soil than that of Pb and Zn, probably because the source of pollution contained relatively little Cd. (Sanchez et al., 1999)

Aydinalp and Marinova conducted a study in 2003 to identify the distribution and forms of Cd, Cu, Pb, Mn, Ni and Zn in the agricultural soils of Bursa Plain (Turkey). Due to the sequential extraction method, KNO<sub>3</sub> was assumed to take up exchangeable forms of metals, NaOH held organically bound forms, and Na<sub>2</sub>EDTA forms were associated with carbonates. The results demonstrated that, the quantity of heavy metals extracted with KNO<sub>3</sub>, except for Mn was less than 0.1% of the total extracted. Manganese presence were attributed to the Mn-oxides (field observations) that exist in these soils. Sodium hydroxide extracted the highest quantity of Cu, 26% of the total, sodium hydroxide-extractable Zn accounted for 5.2% of the total. Pb showed the highest (59% of the total) quantities extracted with Na<sub>2</sub>EDT. Pb, Zn and Mn extracted with Na<sub>2</sub>EDTA were 27.0% and 24.5 % of the total, while Cu, Ni, and Cr were 18.1%, 9.6%, and 4.6%, respectively. Nitric acid extracted the major fractions of all the heavy metals except for Pb. For example, HNO<sub>3</sub>-extractable Cr was 92%, Ni 87.4%, Mn 75.2%, Zn 67.5%, Cd 59.2%, Cu 55.5% and Pb 40% of the total (Aydinalp and Marinova, 2003).

### **Chemical partitioning of metals in sediments**

A large number of scientific studies exist on the chemical distributions of heavy metals in the aquatic sediments. Flytianos and Laurantou investigated the metals' chemical speciations in the sediments of Volvi and Koronia lakes in Greece, by applying the Tessier sequential extraction. The total metal concentrations in the two lakes decreased in the order Fe>Mn>Zn>Cr>Pb>Cu>Cd. For nearly all samples, Cu was observed at Fraction 4 (bound to organic matter and sulfide). Cd was majorly found to be bound to sulfur (~40%) and carbonates (~35%) for the lakes Volvi and Koronia. Fe and Zn were distributed mostly on the residual fraction (~45%) followed by reducible and oxidizable forms. Mn distribution showed varieties due to the abundance of it in earth crust. Cd, Cr, and Pb were distributed primary in the reducible, residual and oxidizable phases. All the results showed that the sum of metals associated with the first 3 fractions were considerably high that can be remobilized by changes in environmental conditions (Fytianos and Laurantou, 2004).

In 2008, Guven and Akinci investigated the chemical speciation of Cr, Cu, Pb, and Zn in the sediments of Izmir Bay. They took sediment samples from 7 stations presenting different points and applied the modified BCR sequential extraction method. According to the results, Cr was found highly as the oxidizable form (71% to 92%). Similarly, Cu tended to accumulate mostly on the organic fraction of the sediment samples (44%–88). The ratios of Pb in the reducible fraction were found to high in the sediment samples (mean value 44%). Zn was mostly found in the acid soluble and reducible fractions (mean value for the sum of these fractions was 63%). This study pointed that none of the metals studied had the tendency to accumulate on the residual fraction which can be considered as the environmentally safest component. All the metals were detected mostly in the acid soluble, reducible, and oxidizable fractions, which are unstable under natural environmental conditions and can be solubilized under certain conditions (Guyen and Akinci, 2008).

Wang et al. studied the heavy metal distribution in the surface sediments of the Pearl River (Southern China) by using the Tessier procedure to analyze for Cd, Cr, Pb, Cu, and Zn. Cd in all the sediment samples was mostly associated with the exchangeable fraction (37.8%) indicating the high mobility and bioavailability. Cu was predominantly bound to the organic matter (49.8%), then the residual fraction. Cr and Cu showed similar bounding behaviours and the decreasing fractioning order was found as residual (43.5% and 58.6% for Cr and Pb), organic matter (27.9% and 28.7%), and carbonate (15.3% and 7.3%). The percentages of Zn associated with different mineral phases were in the order of organic matter (37.5%) > residual (33.8%) > carbonate (13.2%) > exchangeable (9.7%) > oxides (5.8%) (Wang et al., 2011).

In another study, Morillo and his friends searched for the partitioning of Cu, Zn, Cd, Pb, Fe, Ni, Cr in the sediments of the Odiel River in Spain. The river estuary was one of the most industrialized areas in southern Spain. The researchers collected samples in the non-estuarial and estuary parts of the river and applied the

BCR sequential extraction to determine the 4 selected binding fractions. Cd reached the highest percentage (over 40% in most samples) in acid soluble fraction and the lowest in the residual fraction. Zn and Cu concentrations showed varieties. In the non-estuarial samples, both metals mainly accumulated on the residual fraction (>40%). In the estuary, Zn mobility increased in the reducible and oxidizable fractions, while Cu in the estuary was detected mainly in the oxidizable form (~70%). Pb was detected as the most stable element and it was found in the residual fraction in amounts over 90%. Fe, Ni, and Cr showed low mobility, as Fe amount was generally above 70% in the residual fraction (Morillo et al., 2002).

In another study conducted in Diyarbakir (Turkey), Gumgum and Ozturk investigated the chemical speciation of Co, Cu, Ni, and Zn in the sediments of Tigris river by using the Tessier Scheme. According to the results, 44–46 % of Co, 24–36 % of Cu, 69–81 % of Ni, and 55–73 % of Zn were calculated to be in the residual fraction (Gumgum and Ozturk, 2001).

### **Chemical partitioning of metals in sludge**

In 2007, Delgado et al. investigated the chemical partitioning of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn metals in sewage sludges from different treatment plants due to the seasons and time variabilities. Sludge samples were collected from seven wastewater treatment plants of Salamanca city (N-W Spain) during 3 years at winter and summer. They used a five-step chemical fractionation method (Elliot et al., 1990). For each individual metal, significant differences were observed between fractions of sludges collected at different sites, years and seasonal periods. The fractionated metals Cd, Ni and Zn were observed to be in mobile or bioavailable fraction of the sludge up to 35% of total metal content. Cu and Pb distributed in the organically bound fraction up to 25% and 60%, respectively. The Cd, Cr, Cu, Ni, Zn in sludges were predominantly bound within the oxide or silicate components. The authors concluded that although Cd, Ni, Pb, and Zn were released in the first two extraction steps, their levels were so low that leaching or plant uptake should be minimal (Delgado et al., 2007).

Lombardi and Garcia investigated the chemical fractionation and bioleaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in municipal sewage sludge by using anaerobic municipal sewage sludge collected from a wastewater treatment plant (anaerobic digester). The aim of the study was to see the impact of bioleaching on the metals' partitioning. The choice of reagents (KNO<sub>3</sub>, KF, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, EDTA and HNO<sub>3</sub>) was a compromise between selectivity of extraction and presence in literature. The metals originally presented as more stable forms (Cu and Al), then they presented lower solubilization efficiency and the effect upon them would be less. If the metals were originally present as more readily available forms, such as the KNO<sub>3</sub> and KF, then they would be more easily solubilized as a consequence of the bioleaching process, and the remaining metal would be mostly extracted as KNO<sub>3</sub> form after the bioleaching (Mn and Zn) (Lombardi and Garcia, 2002).

Morera et al. aimed to evaluate the mobility of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) in four soils amended with different rates of anaerobically stabilized urban sewage sludge. Sludge, soils and sludge-soil mixtures were fractionated by the Tessier sequential extraction procedure. The apparent mobility of metals in the sludge was Zn > Cd > Ni > Pb > Cu. The addition of sewage sludge in soils increased the percentages of metal extracted in non-residual fractions. Exchangeable Zn from sludge was immobilized in basic soils. The other trace metals showed no fraction redistribution (Morera et al., 2001).

### **Chemical partitioning of metals in other solid phase environmental samples**

In 2011, Paradelo and his colleagues searched for the chemical distribution of Cu, Zn, Pb, Cr and Ni in five Spanish municipal solid waste composts. The chemical fractionation was different for each trace element. Pb was evenly distributed among the soluble, oxidizable, reducible and residual fractions of the BCR scheme; Cu was mainly found in the oxidizable fraction, linked to organic matter, and Zn was mainly associated to iron oxides (reducible fraction), while Ni and Cr were present almost exclusively in the residual fraction (Paradelo et al., 2011).

In 2015, Swietlik et al. worked on the partitioning of Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in the road dusts of an expressway in Poland. They aimed to examine the occurrence mode and mobility of traffic-related metals and find out if driving conditions had a perceptible effect on speciation of these metals. The results of the Tessier scheme showed that Cu was mainly associated with the environmentally persistent fraction (av. 50%), majority of Pb was bound to the reducible fraction (av. 58%), whereas Zn was predominantly present in the weak acid soluble fraction (54%) (Swietlik et al., 2015).

In 2019, Guven and Akinci investigated the total and chemically distributed As, Cr, Cu, Ni, Mn, Zn, Al, and Fe contents of solid matrices in a colemanite mining site. The samples of natural soil, processing products, and mining wastes were analyzed for the mentioned elements. The results of the BCR sequential extraction procedure showed that As was mostly found in the labile forms (exchangeable, reducible, oxidizable). Al, Fe, Zn, Ni, and Cr were the metals mostly bound on the residual fraction in the solid samples. It was revealed that not only mine wastes but also the products, and the ore itself might have potential to release the contaminants to the environment (Akinci and Guven, 2019).

## CONCLUSION

Heavy metals in solid environmental matrices (soils, sediments, street dusts, mining wastes, composts, etc.) exist in several different forms associated with a range of components. Various studies investigating the speciation of the metals in different solid phase environmental samples show that, the partitioning depends on the metal itself, type and components of the sample, and the conditions of the environmental media such as pH and temperature changes, redox potential, etc. The labile forms such as exchangeable or carbonate bound release metals easily and constitute a potential environmental risk, while metals bound on the residual fraction are not expected to be released under normal environmental conditions. Estimating the environmental impact of a given metal depends on its partitioning on the selected forms, rather than its total concentration. Therefore, the chemical distribution of metals should be more emphasized for heavy metal monitoring in environmental studies.

## REFERENCES

- Akinci, G., Guven, D., 2019. Assessment of chemical fractionations and mobilization potentials for heavy metals in wastes and other solid matrices in a mining site in the inland Aegean Region in Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*. 191: 25(1-13).
- Alloway BJ., 2013. Heavy metals in soils- Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. Springer Science+Business Media Dordrecht
- Aydinalp, C., Marinova, S., 2003. Distribution and forms of heavy metals in some agricultural soils. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12:629-633.
- Delgado, M.G., Rodriguez-Cruz, M.S., Lorenzo, M.F., Arienzo, M., Sanchez-Martin, M.J., 2007. Seasonal and time variability of heavy metal content and of its chemical forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*.382:82–92.
- Denton, G.R.W., Wood, H.R., Concepcion, L.P., Siegrist, H.G., Eflin, V.S., Narcis, D. K., Pangelinan, G.T. 1997. Analysis of In-Place Contaminants in Marine Sediments from Four Harbor Locations on Guam: A Pilot Study, Water and Environmental Research Institute of the Western Pacific, Technical Report No. 87 -93 University of Guam, Mangilao, Gua.
- Elliott HA, Dempsey BA, Maille PJ., 1990. Content and fractionation of heavy metals in water treatment sludges. *Journal of Environmental Quality*, 19:330–4.
- Fergusson, J.E. 1990. *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, Oxford: Pergamon Press. ISBN: 0080402755 9780080402758 0080348602 9780080348605
- Fytianos, K., Laurantou, A., 2004. Speciation of elements in sediment samples collected at lakes Volvi and Koronia, N. Greece. *Environment International*, 30, 11-17.
- Gungum, B., Ozturk, G., 2001. Chemical speciation of heavy metals in the Tigris River sediment. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 13(1): 25-29.
- Guven, D., Akinci, G., 2008. Heavy metals partitioning in the sediments of Izmir Inner Bay, *Journal of Environmental Sciences*, 20:413-418.
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D., Violante, 2003. Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environmental Pollution*, 124: 247-256.

- Lombardi, A.T., Garcia JR, O., 2002. Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by Thiobacillus ferrooxidans and its effect on metal partitioning. *Water Research*, 36: 3193–3202
- Lu, Y., Zhu, F., Chen, J., Gan, H., Guo, Y. 2007. Chemical fractionation of heavy metals in urban soils of Guangzhou, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 134:429-439.
- Mance, G. (1987). *Pollution Threat of Heavy Metals in Aquatic Environments*, New York: Elsevier Applied Science Publishers Ltd. ISBN 978-94-009-3421-4
- Masindi, V., Muedi, K.L., 2018. Environmental Contamination by Heavy Metals. Open Access book chapter available at <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76082>
- Morera, M. T., Echeverría, J. C. and Garrido, J. J. 2001. Mobility of heavy metals in soils amended with sewage sludge. *Canadian Journal of Soil Science*. 81: 405–414.
- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I., 2004. Heavy metal distribution in marine sediments from the southwest coast of Spain. *Chemosphere*, 55, 431-442.
- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I., 2002. Partitioning of metals in sediments from the Odiel River (Spain). *Environment International*, 28: 263– 271.
- Paradelo, R., Villada, A., Devesa-Ray, R., Moldes, AB, Dominguez, M., Patino, J., Barral, M.T., 2011. Distribution and availability of trace elements in municipal solid waste composts, *Journal of Environmental Monitoring*. 13:201.
- Pichtel, J., Kuroiwa, K., Sawyerr, H.T., 2000. Distribution of Pb, Cd, and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution*, 110: 171-178.
- Rajeswari T.W., Namburu, S., 2014. Impact of heavy metals on environmental pollution. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 3, 175-181.
- Rauret, G., Lopez-Sanches, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., 1999. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*, 1:57-61.
- Sanchez, A.G., Moyano, A., Munez, C., 1999. Forms of cadmium, lead and zinc in polluted mining soils and uptake by plants (Soria province, Spain). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 30(9&10): 1385-1402.
- Swietlik, R., Trojanowska, M., Strzelecka, M., Bocho-JAniszewska, A., 2015. Fractionation and mobility of Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in the road dust retained on noise barriers along expressway e A potential tool for determining the effects of driving conditions on speciation of emitted particulate metals. *Environmental Pollution*. 196: 404-413.
- Tack, F.M., Verloo, M.G., 1995. Chemical speciation and fractionation in soil and sediment heavy metal analysis: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 59, 225-238.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J., 2014. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *NIH Public Access*. 101: 133–164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4\_6.
- Tessier, A., Campbell, B.C.G., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 5(7), 844-851.
- Wang, S., Lin, C., Cao, X., 2011. Heavy metals content and distribution in the surface sediments of Guangzhou section of the Pearl River, Southern China. *Environmental Earth Sciences*, 64: 1593-1605.
- Woodford, C. (2006) *Water pollution* . Retrieved August, 2010 from <http://www.explainthatstuff.com/waterpollution.html>

## ***In vitro* sürgün ucu yöntemiyle erik (*Prunus domestica* L.) anacının klonal çoğaltımı**

Nazmi GÜR<sup>1</sup>, Seda GÖKDERE<sup>1</sup>, Aykut TOPDEMİR<sup>1</sup>, Seher GÜR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: ngur@firat.edu.tr

### **Özet**

Eriğinin kültür tarihinin günümüzden 2000 yıl öncesine kadar gittiği ve daha o zamanlarda çok güzel ve çeşitli kültür çeşitlerinin bulunduğu bilinmektedir. Bu seçkin türlerin özelliklerini kaybetmeden üretilmesi için klonal çoğaltım yapılması gerekmektedir. Bir bitkinin genetik yapısının korunarak eşeysiz olarak üretimi anlamına gelen klonal çoğaltım için kullanılan tekniklerden biride *in vitro* ortamda gerçekleştirilen mikroçoğaltımdır. Bu çalışmada farklı sitokin ve oksin kombinasyonları kullanılarak erik bitkisinin mikroçoğaltımı için bir protokol geliştirmek amaçlanmıştır. Sürgün oluşumunun en fazla görüldüğü besin ortamı 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Erik, *Prunus Domestica* L., klonal, sürgün.

### **Clonal propagation of plum (*prunus domestica* l.) rootstock by *in vitro* shoot tip method**

#### **Abstract**

It is known that the cultural history of plum dates back to 2000 years ago and there are many different kinds of culture at that time. Clonal propagation is not required to produce these elite species without losing their properties. One of the techniques used for clonal propagation, which means asexual production of a plant while preserving its genetic structure, is micropropagation *in vitro*. In this study, it was aimed to develop a protocol for the micropropagation of plum plant using different combinations of cytokinin and auxin. The nutrient medium where shoot formation is most common is 0.5 mg / L BAP + 0.25 mg / L IBA.

**Keywords:** Plum, *Prunus Domestica* L., clonal, shoot.

#### **GİRİŞ**

Sert çekirdekli meyveler sınıfında yer alan erik meyvesinin türleri dünya üzerinde birbirinden uzak bölgelerde oluşum göstermişlerdir. Tür sayısının çok oluşu, bu türlerin farklı ekolojik bölgelere uyum sağlaması ve eriğin dünya üzerindeki yetişme alanının artmasına olanak sağlamıştır (Özçağırın ve ark., 2003; Doğan, 2017). Erik, flavonoller, hidroksinamik asitler ve antosiyaninleri içine alan fenolik bileşiklerin çeşitli türlerini içerir. Klorojenik asit, yaygın olarak kan LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesini düşüren bir antioksidan olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra oksijen ve azotun reaktif türleri için bir süpürücü ve linoleik asit oksidasyonu konjuge dienlerin oluşmasına karşı bir inhibitör olarak bilinmektedir. Neoklorojenik asit, taze ve kuru erikte bulunan en kuvvetli polifenoldür (Kim ve ark., 2003a). Erikte flavonoller yaygın olarak kuersetin türevleri şeklinde bulunmaktadır. Kuersetin rutin eriklerde bulunan en baskın flavonoldür (Kim ve ark., 2003b). Kuersetin, kanser ve kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği bilinen yüksek antioksidan özelliğe sahip olan bir bileşendir. Epidemiyolojik araştırmalar sonucunda yüksek kuersetin miktarının göğüs ve kolon kanser hücrelerinin üremesini engellediği görülmüş ve düşük kuersetin miktarının ise hücre üremesini arttırdığı (kolon kanser hücrelerinde %20, göğüs kanser hücrelerinde %100) tespit edilmiştir (Woude ve ark., 2003). Sarı erik dışındaki bütün erik türlerinde siyanidin 3-rutinozit gibi antosiyaninler genellikle bulunur (Kim ve ark., 2003a). Antosiyanin, karotenoid pektin gibi biyoaktif madde içerikleri yoğun olduğu için, erik ve kayısı çeşitleri önemli sert çekirdekli meyvelerdendir. Ayrıca A vitamini, kalsiyum, potasyum, magnezyum, lif içerikleri yüksek olup, karbonhidrat ve antioksidan kaynağıdır (Tulay, 2003; Ionica et al., 2013, Fedakar, 2015).

Tohum, kesme ve aşılama ile erik üretimindeki problemlerin *in vitro* kültür veya mikroçoğaltım ile üstesinden gelinmektedir (Kassaye, E., Bekele, B., 2015). Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi



oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, gövde, tohum, kök, sürgün vb.) yapay olarak hazırlana besin ortamlarında ve mikroorganizmalardan arındırılmış şartlar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltmak amaçları için tercih edilen bir doku kültürü tekniğidir.

Genetik çalışmaların doğru ve yeterli düzeyde yapılabilmesi için, ilk ve temel aşama olan doku kültürü protokollerinin tamamlanması gerekmektedir. Gerekliliklerin daha açıklayıcı hali olarak; sterilizasyon, uygun ortam tespiti ve kültür şartları ile birlikte birçok değişkeni içeren in vitro tekniklerdeki protokolleri etkileyen faktörlerin optimize edilmesi gerekmektedir. Eriğin, doku kültürü çalışmaları ile ve in vitro çoğaltım yöntemleri üzerine yapılan çalışmalar olmasına rağmen çok fazla çalışma yapılamamıştır. Bu çalışma ile Eriğin in vitro mikroçoğaltım yöntemleri kullanılarak klon bitkiler elde edilmesine ve üretim aşamalarının standardizasyonu için protokol geliştirilmesine imkân sağlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada materyal kaynağı olarak *Prunus domestica* L. erik türünün Elazığ ili Mürüdü köyünde bulunan ve genç erik ağacı dallarından alınan nodlar kullanılmıştır.

### Metot

#### Yüzey Sterilizasyonu

Toplanan erik dalları yapraklarından ayrılarak akan musluk suyu altında bir saat bekletilmiştir. Yapraklarından ayrılan dallar 1.5-2 cm uzunluğunda olacak şekilde boğum aralarından (sürgün ucu kısımlarından) kesilmiştir. Boğum aralarından kesilen eksplantlar bir beher içerisine koyularak ön sterilizasyon işlemi için üzerine su ilave edilip suda yarım saat bekletilmiştir. Yarım saat içerisinde su 3 kez süzülüp tazelenmiştir.

### Kültür Başlangıcı

#### Besin Ortamlarının Hazırlanması

Besiyeri hazırlanırken ilk aşama olarak, 1 litrelik besiyeri ortamı için 1 litre saf su içerisine % 3 sükröz ve 4,4 gr MS (Murashige ve Skoog) hassas terazide tartılarak ilave edildi. Ortamın pH'ı 5,7-5,8 olarak ayarlandı.

### Sürgün Çoğaltımı

#### Sürgün Çoğaltımı İçin Ortam Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Eksplantlar sürgün oluşumu için sükröz, plant agar, MS ve belirli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerini içeren magenta kaplarındaki besin ortamlarına kültürlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyici olarak BAP (Benzilaminopürin), IBA (İndol Bütirik Asit), IAA (İndol-3 asetik asit), NAA (Naftalin asetik asit), 2,4-D (Diklorofenoksiasetikasit) ve Picloram farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda kullanılmıştır (Tablo 1). Sürgün oluşumu için sükröz, MS ve plant agar içeren besin ortamına ek olarak 1 mg/L BAP + 1, 0,5, 0,25 mg/L konsantrasyonlarında IBA, IAA, NAA, 2,4D ve Picloram kombinasyonu ve 0,5 mg/L BAP+ 1-0,5-0,25 mg/L konsantrasyonlarında IBA, IAA, NAA, 2,4-D ve Picloram kombinasyonu olacak şekilde 2 protokol uygulanmıştır. IBA, IAA, NAA, 2,4-D ve Picloram bitki büyüme düzenleyicilerinin her konsantrasyonu için 5 paralel olmak üzere 150 magenta kabı kültürlenmiştir.

**Tablo 1.** Sürgün Oluşumu İçin Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyici Kombinasyonları.

Bitki Büyüme Düzenleyici	BAP (1 mg/l)	BAP (0.5 mg/l)
IAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
IBA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
NAA	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
2,4D	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l
Picloram	1 mg/l	1 mg/l
	0,5 mg/l	0,5 mg/l
	0,25 mg/l	0,25 mg/l

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Eksplantlarda Sürgün Oluşumu Üzerine BBD'lerinin Etkisi

#### Eksplantlardan Sürgün oluşum ve gelişimine 1 mg/l BAP ve Oksin Konsantrasyonlarının Etkisi

1 mg/L BAP konsantrasyonuna indol asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), naftalin asetik asit (NAA), diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve P oksin grubu büyüme düzenleyicilerinin 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin kültür oluşumuna etkisi incelenmiştir.

#### Indol Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1BAP ve IAA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1 mg/l, 0.5 mg/l ve 0.25 mg/l konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1 mg/l BAP ile birlikte besi ortamına eklenen IAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan çalışmaya ait yüzde sonuçlar tablo 2'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+IAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 85'in üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve IAA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 1'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Sürgün Oluşumuna 1 mg/L BAP ve IAA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	IAA Konsantrasyonu	% Oluşum
1 mg/L	0.25 mg/L	80
	0.5 mg/L	80
	1 mg/L	100

**Çizelge 1.** 1 mg/L BAP ve IAA Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/L IAA	1,40 ± 0,9880
0,5 mg/L IAA	6,00 ± 1,3038
1 mg /L IAA	5,40 ± 1,1662

p değeri 0,032 < 0,05

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (6,00 ± 1,3038) 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Farklı IAA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

#### Indol Bütirik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1 mg/L BAP ve IBA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 1 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen IBA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar tablo 3'te verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+IBA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve IBA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 2'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Sürgün Oluşumuna 1 mg/l BAP ve IBA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	IBA Konsantrasyonu	% Oluşum
1 mg/L	0.25 mg/L	100
	0.5 mg/L	80
	1 mg/L	100

**Çizelge 2.** 1 mg/L BAP ve IBA Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/L IBA	7,60 ± 0,5099
0,5 mg/L IBA	3,60 ± 1,1661
1 mg/L IBA	4,20 ± 1,3191

p değeri 0,043 < 0,05

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (7,60 ± 0,5099) 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Görülen en yüksek değer kaydedilen IAA konsantrasyon değerlerinden daha yüksektir ve daha fazla yapraklanma görülmüştür. Farklı IBA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

## Naftalin Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1 mg/L BAP ve NAA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 1 mg/l BAP ile birlikte besi ortamına eklenen NAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar tablo 15'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 85'in üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve NAA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 3'de verilmiştir.

**Tablo 4.** Sürgün Oluşumuna 1 mg/L BAP ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	NAA Konsantrasyonu	% Oluşum
1 mg/L	0.25 mg/L	80
	0.5 mg/L	80
	1 mg/L	100

**Çizelge 3.** 1 mg/L BAP ve NAA Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0.25 mg/LNAA	7,60 ± 0,6782
0,5 mg/L NAA	4,40 ± 0,9273
1 mg/L NAA	5,00 ± 0,8366
p değeri 0,039< 0,05	

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (7,60 ± 0,678) 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Görülen en yüksek değer kaydedilen 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA konsantrasyonu ile aynı yapraklanma sayısı görülmüştür fakat standart hata payı IBA çalışmasına göre daha fazladır. Farklı NAA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

## Diklorofenoksi Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1 mg/L BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1 , 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 1 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen 2,4D'nin etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar tablo 5'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP + 2,4-D konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 85'in üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/l BAP ve 2,4D konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 4'de verilmiştir.

**Tablo 5.** Sürgün Oluşumuna 1 mg/l BAP ve 2,4D Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	2,4- D Konsantrasyonu	% Oluşum
1 mg/L	0.25 mg/l	100
	0.5 mg/l	60
	1 mg/l	100

**Çizelge 4.** 1 mg/L BAP ve 2,4-D Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0.25 mg/L D	7,20 ± 0,8602
0,5 mg/L D	4,40 ± 0,5099
1 mg/L D	3,20 ± 1,0677
p değeri 0,016< 0,05	

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (7,20 ± 0,8602 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l 2,4-D büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Görülen en yüksek 2,4-D büyüme düzenleyici konsantrasyonunda, kaydedilen en yüksek IBA ve NAA konsantrasyonlarından daha az yapraklanma sayısı görülmüştür. Farklı 2,4-D konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

## Picloram

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 1 mg/L BAP ve Picloram konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 1 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen P'nin etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6.** Sürgün Oluşumuna 1 mg/l BAP ve Picloram Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	P Konsantrasyonu	% Oluşum
1 mg/l	0.25 mg/L	0
	0.5 mg/L	0
	1 mg/L	0

Sürgün oluşumu için kullanılan 1 mg/L BAP ve Picloram konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün oluşumu, gelişimi ve yaprak sayısına olumlu bir etkisi olmamıştır. Herhangi bir gelişim kaydedilememiştir.

## Eksplantlardan Sürgün oluşumuna 0.5 mg/L BAP ve Oksin Konsantrasyonlarının Etkisi

0.5 mg/L BAP konsantrasyonuna indol asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), naftalin asetik asit (NAA), diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Picloram oksin grubu büyüme düzenleyicilerinin 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin kültür oluşumuna etkisi incelenmiştir.

## Indol Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve IAA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 0.5 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen IAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 7'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 0,5 mg/L BAP+ IAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 85'in üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve IAA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 5'de verilmiştir.

**Tablo 7.** Sürgün Oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve IAA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	IAA Konsantrasyonu	% Oluşum
0,5 mg/l	0.25 mg/L	60
	0.5 mg/L	100
	1 mg/L	100

**Çizelge 5.** 0,5 mg/L BAP ve IAA Yaprak Sayısı Konsantrasyonlarının Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/L IAA	1,40 ± 0,5099
0,5 mg/L IAA	4,60 ± 0,6782
1 mg/L IAA	4,00 ± 1,1402
p değeri 0,039 < 0,05	

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (4,60 ± 0,6782) 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Farklı IAA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

## Indol Bütirik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve IAA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 0.5 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen IBA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+ IBA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 85'in üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 0,5 mg/L BAP ve IBA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan çalışma sonuçları çizelge 6'da verilmiştir.

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (8,60 ± 1,6911) 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA büyüme düzenleyici

konsantrasyonlarında görülmüştür. Kaydedilen en yüksek değer, önceki çalışmalarda kaydedilen yüksek yaprak sayılarından olan 1 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA konsantrasyonundan daha fazla olduğu görülmüştür. Farklı IBA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

**Tablo 8.** Sürgün Oluşumuna 0,5 mg/l BAP ve IBA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	IBA Konsantrasyonu	% Oluşum
0,5 mg/L	0.25 mg/L	100
	0.5 mg/L	80
	1 mg/L	80

**Çizelge 6.** 0,5 mg/l BAP ve IBA Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/L IBA	8,60 ± 1,6911
0,5 mg/L IBA	3,00 ± 1,2649
1 mg/L IBA	6,20 ± 1,2409

p değeri 0,048 < 0,05

### Naftalin Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve NAA konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0.5 ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 0.5 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen NAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+ NAA konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve NAA konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 7'de verilmiştir.

**Tablo 9.** Sürgün Oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	NAA Konsantrasyonu	% Oluşum
0,5 mg/L	0.25 mg/L	100
	0.5 mg/L	100
	1 mg/L	80

**Çizelge 7.** 0,5 mg/L BAP ve NAA Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/L NAA	8,20 ± 0,9695
0,5 mg/L NAA	6,60 ± 0,6000
1 mg/L NAA	4,20 ± 1,2410

p değeri 0,039 < 0,05

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). En yüksek oran (8,20 ± 0,9695) 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L NAA büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Kaydedilen en yüksek değer, kaydedilen IBA en yüksek değerinin altında kalmıştır. Farklı IBA konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

### Diklorofenoksi Asetik Asit

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1 mg/L, 0.5 mg/L ve 0.25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 0.5 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen 2,4-D'nin etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 10'da verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/L BAP+ 2,4-D konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 80 olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumunda 1 mg/L BAP ve 2,4-D konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün yaprak sayısına etkilerini belirlemek üzere ait yapılan deney sonuçları çizelge 8'de verilmiştir.

**Tablo 10.** Sürgün Oluşumuna 0,5 mg/l BAP ve 2,4D Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	2,4-D Konsantrasyonu	% Oluşum
0,5 mg/L	0.25 mg/L	80
	0.5 mg/L	80
	1 mg/L	80

**Çizelge 8.** 0,5 mg/l BAP ve 2,4D Konsantrasyonlarının Yaprak Sayısı Üzerine Etkisi.

BBD	Mean ± SE (Yaprak Sayısı)
0,25 mg/LD	2,40 ± 1,0295
0,5 mg/L D	8,00 ± 1,4142
1 mg/L D	3,80 ± 1,0677

p değeri 0,015 < 0,05

Sürgün gelişiminde yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). En yüksek oran ( $8,00 \pm 1,4142$ ) 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L 2,4-D büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında görülmüştür. Farklı 2,4-D konsantrasyonlarında elde edilen sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

### Picloram

Erik eksplantlarından sürgün oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve Picloram konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere 1, 0,5 ve 0,25 mg/L konsantrasyonlarından 5'er paralel çalışılmıştır. Erik eksplantlarından sürgün oluşumu için 0,5 mg/L BAP ile birlikte besi ortamına eklenen Picloram'ın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 11'de verilmiştir.

**Tablo 11.** Sürgün Oluşumuna 0,5 mg/L BAP ve Picloram Konsantrasyonlarının Etkisi.

BAP Konsantrasyonu	Picloram Konsantrasyonu	% Oluşum
0,5 mg/L	0.25 mg/L	0
	0.5 mg/L	0
	1 mg/L	0

Yapılan çalışma sonucunda 1 mg/l BAP+ P konsantrasyonlarının sürgün oluşumuna etkisinin ortalama % 0 olduğu görülmüştür. Sürgün oluşumu için kullanılan 0,5 mg/L BAP ve P konsantrasyonlarının eklendiği besi ortamının sürgün oluşumu, gelişimi ve yaprak sayısına olumlu bir etkisi olmamıştır. Herhangi bir gelişim kaydedilememiştir.

### SONUÇ

Eksplantlardan sürgün ucu kültürü için yaptığımız çalışmalar göz önüne alındığında; farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda P içeren besi yerlerinde hiçbir sürgün oluşumu (%0) gözlemlenmedi. Erik bitkisi kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmaları arasında P'in kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Sürgün oluşturma yeteneği, en iyi 0,5 mg/L BAP+0,25 mg/L IBA içeren besiyerinde gözlemlenmiştir. Yapılan mikroçoğaltım çalışmalarına baktığımızda; 2011 yılında Yıldırım ve ark. yaptığı kayısı (*Prunus armeniaca* L.) cv.'nin in vitro çoğaltımında; 2 mg/L BAP içeren ortamların, Işıkalın ve ark.'larının 2008 yılında yaptıkları badem (*Amygdalus communis* L. cv.) anacının in vitro çoğaltım çalışmasında, 1 mg/L BAP konsantrasyonun, 2011 yılında Dejanpour ve ark.'nın yaptığı bir mikroçoğaltım çalışmasında, 2 mg/L BAP içeren ortamların sürgün gelişimi için en iyi ortamlar olduklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak; tohumla kullanılarak yapılan üretimlerde istenilen özellikleri barındırma ve hastalıklardan arı bitki eldesi zor bir iştir. İşte in vitro teknikler kullanılarak yapılan mikroçoğaltım teknikleri ile istenilen özelliklere sahip fidanların üretimi mümkün olmaktadır.

### KAYNAKLAR

- Fedakar SO 2015, Myrobolan B Erik Kök Anacının (*Prunus cerasifera* L.) Sıvı Kültürlerde Büyük Ölçekte Mikroçoğaltımı, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı.
- H van der Woude A, Gliszczynska-Swiglo K, Struijs A, Smeets GM, Alink IM 2003. Rietjens Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. Cancer letters, 200 (1) (2003), pp. 41-47.

- Ionica ME, Violeta NOUR, Trandafir I, Cosmulescu S, Mihai BOTU 2013. Physical and chemical properties of some European plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 499-503.
- Kassaye E, Bekele B 2015. In vitro optimization of the protocol for micropropagation of Plum (*Prunus Salicina* L. Var. Methley) from nodal explants. *Biotechnology International*, 8(4), 137-148.
- Kim DO, Chun OK, Lee CY 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(27), 8067-8072.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(22), 6509-6515.
- Özçağırın R, Ünal A, Özeker E, İsfendiyaroğlu M 2003. İlman İklim Meyve Türleri Sert Çekirdekli Meyveler. Cilt-I, Ege Üni. Ziraat Fak. Yayınları, (553).
- Tülay S 2003. Kayısı Sektör Araştırması. İstanbul Ticaret Odası, Dış Ticaret Şubesi, Araştırma Servisi. <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-54.pdf> (Erişim Tarihi 15 Kasım 2014).

## Supercapacitor device performances of rGO/PPy/Carbon black nanocomposite

Murat Ates<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tekirdag Namik Kemal University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Tekirdag, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: mates@nku.edu.tr

### Abstract

rGO, polypyrrole (PPy) and rGO/PPy/carbon black nanocomposites were synthesized by electrospinning method. These nanocomposites were characterized by FTIR-ATR, SEM-EDX, TGA-DTA, BET surface and XRD analysis. Nanofibers were used in two electrode system in supercapacitor devices. Electrochemical performances were examined by 3 different methods (CV, GCD and EIS analysis). In addition, energy and power density performances were studied to calculate optimum conditions. A proper equivalent circuit model was used to interpret circuit parameters of EIS method.

**Keywords:** reduced graphene oxide, supercapacitor, polypyrrole, electrospinning, circuit model.

### INTRODUCTION

Energy storage technology has rapidly developed in recent years (Chauhan et al., 2016). Supercapacitors or electrochemical capacitors are used to be the mostly supercapacitor devices to gain a higher electrochemical performances (Liu et al., 2017; Yu et al., 2013; Dong et al., 2019).

Conducting polymers having  $\pi$ -electron conjugated structure, such as polypyrrole (PPy) has been obtained to use in supercapacitor devices. Graphene oxide (GO) based nanocomposites were done using in-situ polymerization of pyrrole to study the interaction of GO and polypyrrole (Hughes et al., 2004). PPy and their derivatives are used in many fields, such as supercapacitors, battery and corrosion inhibition processes (Volgi et al., 2012; Frackowiak et al., 2001).

Carbon black has many advantageous in their usage due to easy synthesis, low cost (Crouch et al., 2005), long time stability, high specific surface area, and good electrical conductivity (Zha et al., 2015).

To the best of our knowledge, there are still no reports of experimental work for rGO/CB/PPy nanocomposites via electrospinning method.

### MATERIALS AND METHODS

#### Synthesis of Graphene oxide (GO)

Graphene oxide (GO) was synthesized using modified Hummers method obtaining from graphite powder (Hummers and Offeman, 1958). Graphite converts to graphene oxide with mixture of sulphuric acid and potassium permanganate. GO might be obtained as a layer by layer. Firstly, graphite (3 g, 70 ml) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M) were mixed in ice bath. KMnO<sub>4</sub> (9 g) was slowly added to mixture and mixed in constant rate. The reaction mixture temperature should be at below 20 °C to avoid explosion. Then, the temperature was risen to 35 °C and added all KMnO<sub>4</sub> substance via mixing in 30 min. Then, diionized (DI, 150 ml) water was added and temperature was increased to 95 °C. Lastly, DI water (500 ml) and 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15ml) were added to solution and reaction ended. The obtained material was centrifuged in 15 min. And precipitation was washed with water at least 3 times.

#### Synthesis of reduced graphene oxide (rGO)

The reduction process of GO was performed by microwave-assisted method at 180 Watt in 10 min. After obtaining rGO material and characterization methods, carbon nanofiber was obtained by electrospinning method.

#### Synthesis of Polypyrrole (PPy)

Polypyrrole (PPy) was synthesized in-situ polymerization method using ammonium persulfate initiator. Firstly, pyrrole monomer (70  $\mu$ l, 1 mmol) was dissolved in DI (20 ml) water and applied ultrasonication method in 30 min. APS (1 mmol) was mixed at 60 °C for 24 h. Secondly, the precipitate was washed with DI water and dried at 70 °C for 24 h. The resultant product was obtained as black color as PPy (Han et al., 2018).



### Synthesis of GO/PPy/Carbon black

GO (0.04 g) was dissolved in DI water and using ultrasonication in 15 min. In the other pyrex, PPy (0.04 g) was dissolved in dimethylformamide (DMF, 4 ml) and added carbon black (0.011 g) and mixed for 4 h to obtain GO/PPy/carbon black material.

### Synthesis of rGO/PPy/Carbon black

GO/PPy/carbon black material reduces to rGO/PPy/carbon black using microwave-assisted method, 180 Watt, 10 min. The obtained material was filtrated and washed with DI water and dried at 60 °C in an oven.

### Electrochemical measurements

Electrochemical measurements were performed by Ivium-vertex and partstat 2273 model potansioestat/galvanostat with CV, GCD and EIS methods. In CV method, specific capacitance ( $C_{sp}$ ) was calculated as (1);

$$C_{sp} = \int(I \times dV) / (v \times \Delta V \times m) \quad (1)$$

In this formula, I: Discharge current (mA), v: scan rate (mV/s),  $\Delta V$ : Potential window (V), m: total active material weight (mg). CV measurements were taken as a symmetrical device in the potential range between 0.0 – 0.8 V at a scan rate of 1-1000 mV/s (Mohd Abdal et al., 2018).

In GCD method,  $C_{sp}$  values can be calculated as the formula of (2);

$$C_{sp} = (I \times \Delta t) / (\Delta V \times m) \quad (2)$$

In this formula, I: discharge current and  $\Delta t$ : discharge time,  $\Delta V$ : Potential window, m: total active material weight. Measurements were taken as a constant current values (1, 2, 5, 10, 20 and 50 mA) (Huang et al., 2016).

In EIS method,  $C_{sp}$  values can be calculated from Nyquist plot as low frequency (0.01 Hz) in the following formula (3);

$$C_{sp} = -1 / (2\pi \times f \times Z''') \quad (3)$$

In this formula, the frequency range were taken between 10 mHz and 100 kHz.

Double layer capacitance ( $C_{dl}$ ) can be calculated from Bode-Magnitude plot as extrapolation of  $w=1$  ( $\log w=0$ ) in the following formula (Kumar et al., 2014).

$$C_{dl} = 1 / |Z| \quad (4)$$

Stabilite tests were performed by CV method, 1000 charge/discharge measurements in 1 M  $H_2SO_4$  solution at a scan rate of 100 mV/s.

Energy and power values can be calculated in the following formula of 5 and 6.  $C_t = C_s / 4$  can be taken as specific capacitance.

$$E = 1/2 \times C_t \times V^2 \quad (5)$$

$$P = E / \Delta t \quad (6)$$

V: Voltage window (V);  $\Delta t$ : Discharge time (s).

## RESULTS and DISCUSSION

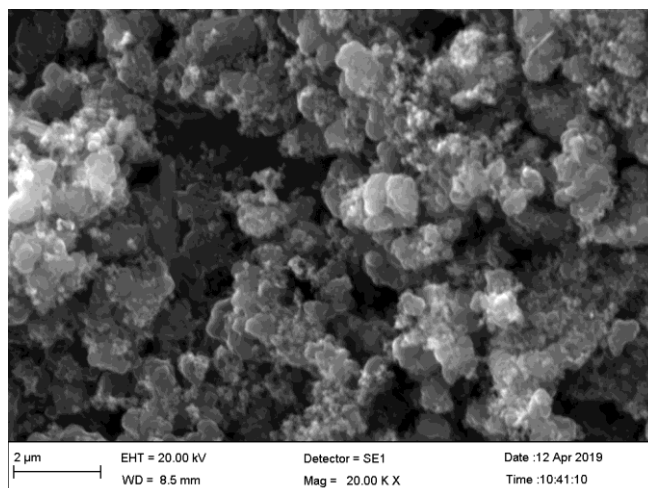


Figure 1. SEM images of rGO/PPy/carbon black nanocomposite.

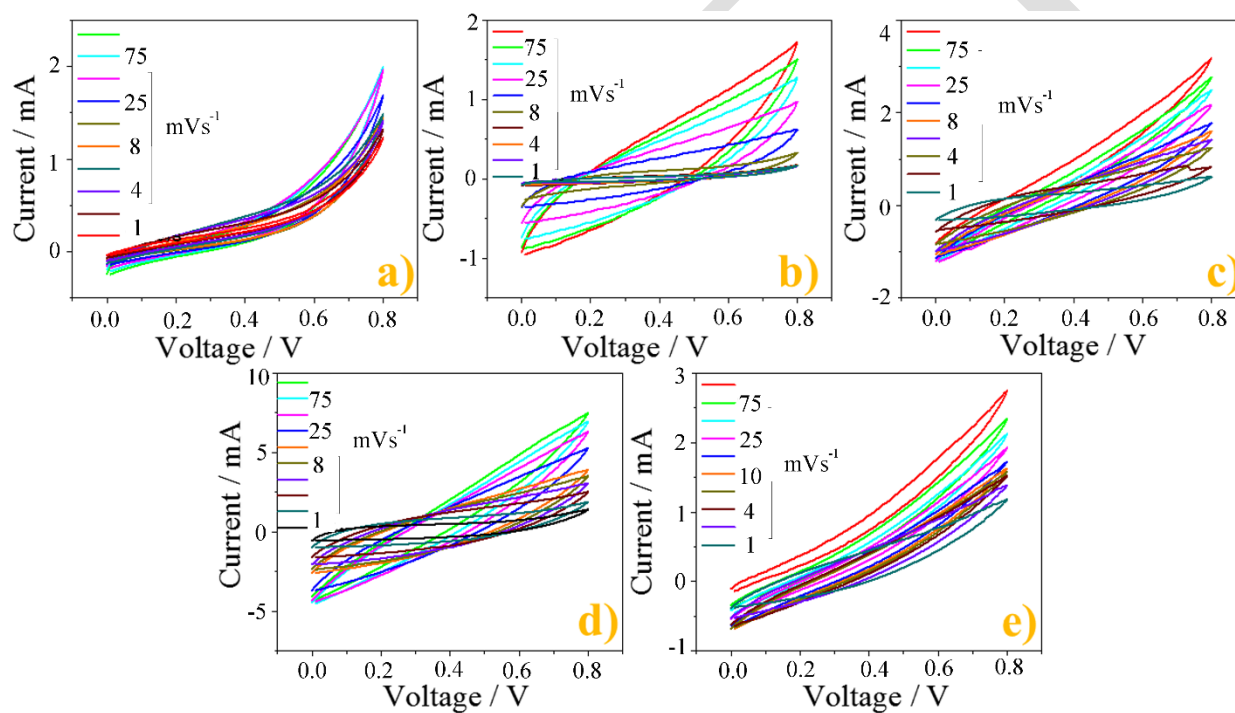
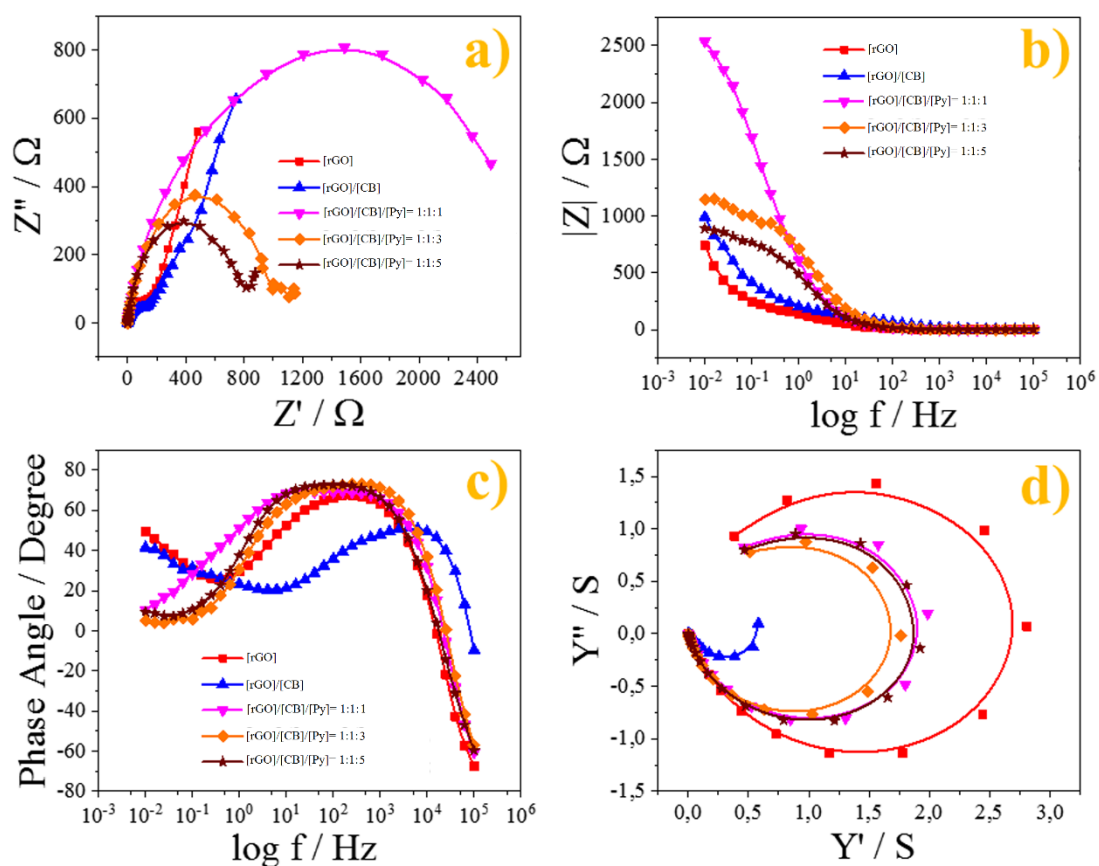
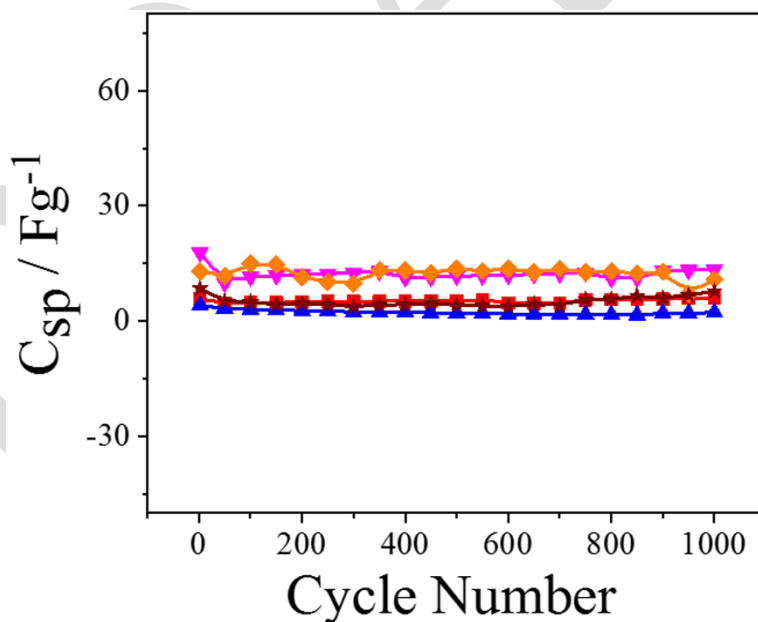


Figure 2. CV plots of a) rGO, b) rGO/CB c) rGO/CB/PPy nanocomposite at  $[rGO]_0/[CB]_0/[Py]_0 = 1:1:1$ , d)  $[rGO]_0/[CB]_0/[Py]_0 = 1:1:3$ , e)  $[rGO]_0/[CB]_0/[Py]_0 = 1:1:5$ .



**Figure 3.** EIS plots of a) Nyquist, b) Bode-magnitude, c) Bode-phase, d) Admittance for rGO/PPy/carbon black nanocomposite.



**Figure 4.** Stability test performances of rGO, rGO/CB, rGO/CB/PPy nanocomposite at  $[rGO]_0/[CB]_0/[PPy]_0 = 1:1:1; 1:1:3$  and  $1:1:5$ .

## CONCLUSION

rGO/ CB/PPy nanocomposite materials were examined by FTIR-ATR, SEM-EDX, TGA-DTA, BET surface, CV, GCD, and EIS methods. The highest specific capacitance was obtained as  $C_{sp} = 5.35$  F/g at 1 mV/s  $E = 0.024$  Wh/kg and  $P = 145.52$  W/kg. We have obtained the initial capacitance protection as 100%, 95.8%, 86.5%, 85.55% and 76% for  $[rGO]_0/[CB]/[PPy]_0 = 1:1; 1:2; 1:5$  and 1:10 respectively.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are honored to accept The Scientific Research Project Unit at Tekirdag Namik Kemal University, (project number: NKUBAP.01.ÖNAP.19.213) financial support as the source of the study's funding.

## REFERENCES

- Crouch E, Cowell DC, Haskins S, Pittson RW, Hart JP 2005. A novel disposable, screen-printed amperometric biosensor for glucose in serum fabricated using a water-based carbon ink. *Biosens. Bioelectron.*, 21: 712-718.
- Chauhan NPS, Mozafari M, Chundawat NS, Meghwal K, Ameta R, Ameta SC 2016. High performance supercapacitors based on polyaniline-graphene nanocomposites: Some approaches, challenges and opportunities. *J. Ind. Eng. Chem.*, 36: 13-29.
- Dong J, Lin Y, Zong H, Yang H 2019. Hierarchical  $LiFe_5O_8@PPy$  core-shell nanocomposites as electrode materials for supercapacitors. *Appl. Surf. Sci.*, 470: 1043-1052.
- Frackowiak E., Jurewicz K., Delpeux S., Beguin F., Nanotubular materials for supercapacitors, *J. Power Sources*, 97-98(2001) 822-825.
- Han Y, Zhang Z, Yang M, Li T, Wang Y, Cao A, Chen Z 2018. Facile preparation of reduced graphene oxide / polypyrrole nanocomposites with urchin-like microstructure for wide potential window supercapacitors. *Electrochim. Acta*, 289: 238-247.
- Huang Y, Lai F, Zhang L, Lu H, Miao YE, Liu T 2016. Elastic carbon aerogels reconstructed from electrospun nanofibers and graphene as three-dimensional networked matrix for efficient energy storage / conversion. *Scientific Reports*, 6: 31541.
- Hughes M., Chen G.Z., Shaffer MSP, Fray DJ., Windle AH 2004. Controlling the nanostructure of electrochemically grown nanoporous composites of carbon nanotubes and controlling polymers. *Composites Science and Technology*, 64: 2325-2331.
- Hummers WS, Offeman RE 1958. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 1339-1339.
- Liu L, Niu Z, Chen J 2017. Design and integration of flexible planar micro-supercapacitors. *Nano Res.*, 10: 1524-1544.
- Kumar A, Singh RK, Singh HK, Srivastava P, Singh R 2014. Enhanced capacitance and stability of p-toluene sulfonate doped polypyrrole / carbon composite for electrode application in electrochemical capacitors. *J. Power Sources*, 246: 800-807.
- Mohd Abdah MAA, Abdul Rahman N, Sulaiman Y 2018. Enhancement of electrochemical performance based on symmetrical poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coated polyvinyl alcohol / graphene oxide / manganese oxide microfiber for supercapacitor. *Electrochim. Acta*, 259: 466-473.
- Volgi E., Trueba M., Trasatti SP 2012. Electrochemical investigation of conformational rearrangements of polypyrrole deposited on Al alloys. *Progress in Organic Coatings*, 74: 376-384.
- Yu GH, Xie X, Pan LJ, Bao ZN, Cui Y 2013. Hybrid nanostructured materials for high-performance electrochemical capacitors. *Nano Energy*, 2: 213-234.
- Zha D, Xiong P, Wang X 2015. Strongly coupled manganese ferrite / carbon black / polyaniline hybrid for low-cost supercapacitors with high rate capability. *Electrochim. Acta*, 185: 218-228.

## Beden kütle indeksi ile konstipasyon gelişim riski arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi

Mehmet Arif İcer<sup>1\*</sup>, Teslime Özge Şahin<sup>1</sup>, Nilüfer Acar-Tek<sup>1</sup>, Gamze Akbulut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara.

\*Sorumlu yazar e-mail: m.arif.icer@gmail.com

### Özet

Konstipasyon metabolik, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir etiyolojiye sahiptir. Bu faktörlerden biri olduğu düşünülen beden kütle indeksi (BKİ) ve konstipasyon riski arasındaki ilişki de önemli bir araştırma konusudur. Bu çalışmanın amacı, BKİ ile konstipasyon arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir. Bu çalışma, yaşları 18-65 yıl arasında değişen 1445 birey üzerinde yürütülmüştür. Tüm katılımcıların boy uzunluğu (cm), vücut ağırlığı (kg), bel çevresi (cm) ve boyun çevresi (cm) yöntemine uygun bir şekilde ölçülerek kaydedilmiştir. Ayrıca katılımcıların konstipasyon riskinin ve ciddiyetinin belirlenmesi amaçlı Türkçe geçerlilik güvenilirliği olan “Konstipasyon Risk Belirleme Skalası” ve “Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği” kullanılmıştır. Dünya sağlık örgütünün BKİ sınıflandırmasına göre çalışmaya katılan bireylerin %3,3’ ünün zayıf, %37,7’ sinin normal, %34,7’ sinin fazla kilolu ve %24,3’ ünün obez olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, obez bireylerin zayıf, normal ve fazla kilolu bireylere göre konstipasyon gelişim riskinin daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Fazla kilolu bireylerin normal bireylere göre konstipasyon ciddiyet skorunun daha yüksek olduğu da çalışmanın bir diğer sonucudur ( $p < 0,05$ ). Ayrıca, katılımcıların BKİ ( $r=0,098$ ;  $p=0,000$ ) ve bel çevresi (cm) ( $r= 0,077$  0;  $p= 0,003$ ) ile konstipasyon gelişim riski arasında pozitif yönlü, bel çevresi (cm) ( $r=-0,058$ ;  $p=0,028$ ) ile konstipasyon ciddiyeti arasında ise negatif yönlü anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Bu çalışmanın verilerine göre artan BKİ, bel ve boyun çevresinin konstipasyon gelişim riskini artırabileceği düşünülebilir. Ancak kesin sonuçlara varabilmek için örneklem sayısının artırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Konstipasyon, Obezite, Beden kütle indeksi

### Abstract

Constipation has a multifactorial etiology which is caused by the interaction of metabolic, genetic and environmental factors. The relationship between body mass index (BMI) and constipation risk, which is thought to be one of these factors, is also an important research topic. The aim of this study was to evaluate the relationship between BMI and constipation. This study was conducted on 1445 individuals aged between 18-65 years. Height (cm), body weight (kg), waist circumference (cm) and neck circumference (cm) of all participants were measured and recorded. In addition, "Constipation Risk Assessment Scale" and "Constipation Severity Scale" which are the Turkish validity and reliability, were used to determine the constipation risk and severity of the participants. According to the BMI classification of the World Health Organization, it was found that 3.3% of the participants were underweight, 37.7% were normal weight, 34.7% were overweight and 24.3% were obese. In the study, obese individuals had a higher risk of developing constipation than underweight, normal and overweight individuals ( $p < 0.05$ ). Constipation severity score was higher in overweight individuals compared to normal weight individuals ( $p < 0.05$ ). A positive correlation was found between the BMI ( $r = 0.098$ ;  $p = 0.000$ ) and waist circumference (cm) ( $r = 0.077$  0;  $p = 0.003$ ) and the risk of developing constipation. In addition, a significant negative correlation was found between waist circumference (cm) ( $r=-0,058$ ;  $p=0,028$ ) and constipation severity. According to the data of this study, increasing BMI, waist and neck circumference may increase the risk of developing constipation. However, in order to reach conclusive results, new studies increasing the number of samples are needed.

**Keywords:** Constipation, Obesity, Body mass index

### GİRİŞ

Obezite ve fazla kiloluluk dünya çapında prevalansı artan önemli bir halk sağlığı sorunudur (Organization, 1998). Obezite tip2 diyabet, kardiyovasküler ve gastrointestinal hastalıklar gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmektedir. Konstipasyon da obezitenin ilişkilendirildiği önemli gastrointestinal hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (Acosta ve Camilleri, 2014).

Konstipasyon için standartlaştırılmış bir tanım söz konusu değildir. Hastaların çoğu kabızlığı, sert dışkı, seyrek dışkı (genellikle haftada üçten az), aşırı ıkınma ihtiyacı, yetersiz bağırsak tahliyesi hissi ve tualete geçirilen aşırı zaman gibi bir veya daha fazla semptom ile tanımlamaktadır (Koch ve ark., 1997; Sandler ve Drossman,

1987). Kabızlığın bilinen en genel tanımı ise haftada üç veya daha fazla kez tamamen ve kendiliğinden dışkıyı tahliye edememe durumudur (Stewart ve ark., 1999). Günümüzdeki çalışmalarda konstipasyon tanısı için sıklıkla Roma IV olacak tanı kriterleri kullanılmaktadır (Thompson ve ark., 1999).

Toplumlarda konstipasyon prevalansını belirlemek amaçlı yapılmış birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda genel olarak konstipasyon prevalansı %2-28 arasında bildirilmiştir (Meinds ve ark., 2017; Pare ve ark., 2001; Talley, 2004). Roma I kriterlerinin kullanılarak Kanada’da yapılan bir çalışmada fonksiyonel konstipasyon sıklığı %16.7 olarak saptanmıştır (Pare ve ark., 2001).

Kabızlık akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Kronik kabızlık ise en basit haliyle üç aydan daha uzun bir süren kabızlık olarak tanımlanmaktadır (Gray, 2011). Kronik kabızlık genellikle kolonik veya anorektal fonksiyon bozukluklarının altında yattığı varsayılan yaygın bir semptomdur. Kabızlık problemi yaşayanların azınlığı tıbbi yardım almak istemesine rağmen, ABD ‘de her yıl ortalama 8 milyon kişi kabızlık şikayeti nedeniyle tıbbi yardım almak için hastanelere gitmektedir (Shah ve ark., 2008). Kabızlık semptomları ile hastanelere başvuru yapanların yanı sıra reçetesiz olarak eczanelerden laksatif türevi ilaç edinen insan sayısı da oldukça yüksektir (Wald, 2016).

Konstipasyon metabolik, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir etiyojiye sahiptir (Johanson, 1998). Düşük sosyoekonomik durum, kırsal yerleşim, soğuk iklim ve düşük eğitim düzeyi konstipasyon için risk faktörü olarak belirtilmektedir (Belsey ve ark., 2010; Higgins ve Johanson, 2004; Johanson, 1998). Ayrıca kadın cinsiyeti, düşük fiziksel aktivite düzeyi ve ileri yaş önemli konstipasyon risk faktörlerindedir (Orhan ve ark., 2015). Bireylerin beslenme alışkanlıkları, gut mikrobiyotaları ve vücut ağırlıklarının da önemli konstipasyon risk faktörleri arasında olduğu bildirilmektedir (Fayfman ve ark., 2019).

Bu çalışma, beden kütle indeksi (BKİ) ile konstipasyon riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla planlanıp yürütülmüştür.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Çalışmanın Genel Planı**

Bu araştırma 18-65 yaş arası 451 erkek, 994 kadın olmak üzere toplam 1445 gönüllü birey ile yürütülmüş kesitsel tipte bir çalışmadır.

Çalışmanın verileri anket formu aracılığıyla yüz yüze görüşme tekniği kullanılarak toplanmıştır. Anket formuyla bireylere ait tanımlayıcı bilgiler, (yaş, cinsiyet, medeni durum, eğitim süresi ve sigara kullanma durumları) sorgulanmıştır. Bireylerin bazı antropometrik ölçümleri alınmış ve konstipasyon riskinin ve ciddiyetinin belirlenmesi amaçlı Türkçe güvenilirlik ve geçerliliği yapılmış “Konstipasyon Risk Belirleme Skalası” ve “Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği” ölçekleri kullanılmıştır.

### **Antropometrik Ölçümler**

Araştırma kapsamında katılımcıların vücut ağırlığı (kg), boy uzunluğu (cm), bel çevresi (cm) ve boyun çevresi (cm) ölçülmüştür.

Katılımcıların vücut ağırlığı ölçümleri 10-12 saatlik açlık sonrası Tanita BC 532 marka biyoelektrik impedans cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Bireylerin 24 saat öncesine kadar ağır fiziksel aktivite yapmamış olmaları, en az 4 saatlik açlık durumunda olmaları, çok fazla sıvı tüketmemiş olmaları (su, çay, kahve), üzerlerinde metal eşya bulundurmamaları istenmiştir. Ayrıca ölçüm sonuçlarını etkileyeceğinden kadın katılımcıların menstrüel dönemlerinde olmamalarına dikkat edilmiştir (Pekcan, 2011).

Katılımcıların beden kütle indeksi (BKİ) ‘vücut ağırlığı/boy uzunluğu<sup>2</sup> (kg/m<sup>2</sup>)’ denkleminde hesaplanmıştır. Elde edilen BKİ değerleri Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO) sınıflaması temel alınarak erkek ve kadın bireyler için <18,5 kg/m<sup>2</sup> zayıf, 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> arası normal ağırlık, 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup> arası hafif şişman ve ≥30,0 kg/m<sup>2</sup> ise şişman olarak gruplandırılmıştır (WHO and Organization, 2003).

Boy uzunluğu ölçümü baş Frankfort düzlemde, topuklar, sırt, ve omuzlar dik durumdayken, derin nefes aldirılarak stadiometre ile yapılmıştır (Pekcan, 2011).

Katılımcıların bel ve boyun çevresi ölçümleri ise esnemeyen bir mezür ile tekniğine uygun olarak ölçülmüştür.

## Konstipasyon Risk ve Ciddiyet Belirleme Ölçekleri

Kutlu ve arkadaşları tarafından Türkçe güvenilirlik ve geçerliliği yapılan Konstipasyon Risk Belirleme Skalası toplam 18 başlıktan oluşmakta olup bazı başlıklar kendi içerisinde alt sorulara ayrılmaktadır (Kutlu ve ark., 2011). Sorular 0-5 arasında bir puan alabilmektedir. Konstipasyon Risk Belirleme Skalasından alınabilecek toplam puan en düşük 1, en yüksek 67'dir. Elde edilen toplam puana göre;

Düşük Konstipasyon Riski  $\leq 10$  puan

Orta Konstipasyon Riski 11-15 puan

Yüksek Konstipasyon Riski  $\geq 16$  puan olarak değerlendirilmiştir.

Kaya ve arkadaşları tarafından Türkçe güvenilirlik ve geçerliliği yapılan Konstipasyon Ciddiyet Ölçeğinde 16 soru yer almaktadır (Kaya ve Turan, 2011). Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği; Dışkı Tıkanıklığı, Kalın Bağırsak Tembelligi (KBT) ve Ağrı olmak üzere üç alt ölçeğe sahiptir. Dışkı Tıkanıklığı alt boyutundan alınabilecek puan 0-28, Kalın Bağırsak Tembelligi alt boyutundan alınabilecek puan 0-27, Ağrı alt boyutundan alınabilecek puan ise 0-16 arasındadır. Konstipasyon Ciddiyet Ölçeğinden alınabilecek toplam puan en düşük 0, en yüksek 71'dir. Ölçekten alınan yüksek puan belirtilerin ciddi olduğunu göstermektedir.

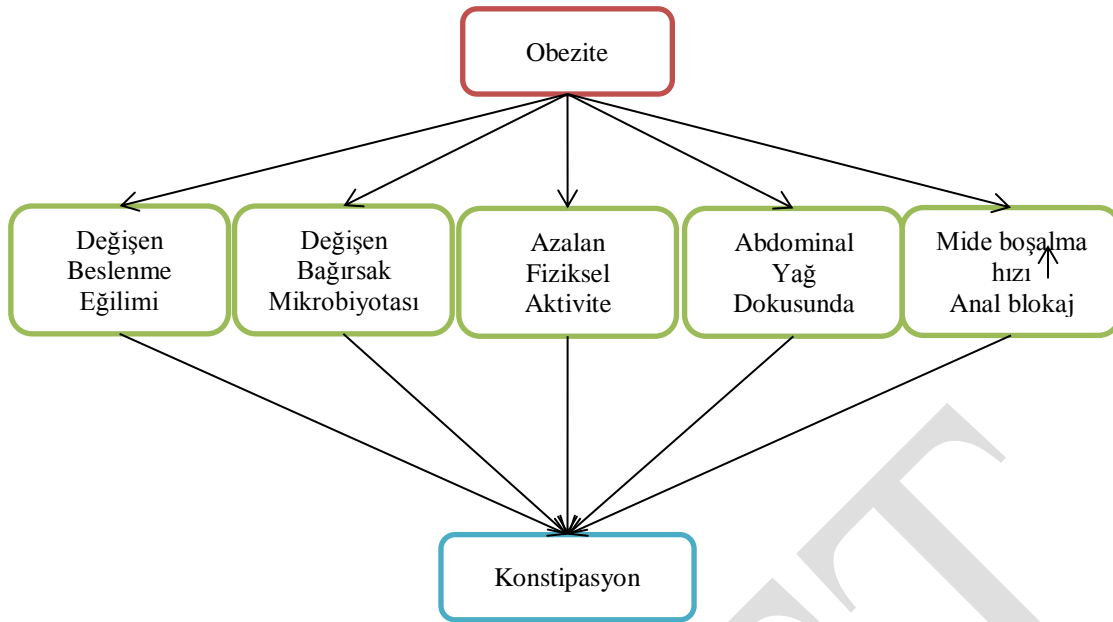
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Beden kütle indeksi kullanılarak obezite prevalansının saptanması her yaş ve her iki cinsiyet içinde güvenilir olarak belirtilmektedir (Javed ve ark., 2015; Okorodudu ve ark., 2010). Amerika Birleşik Devletlerinde erkek bireyler için obezite ( $BKİ \geq 30$ ) prevalansının %35, kadınlar için ise %40.4 olduğu bildirilmektedir (Flegal ve ark., 2016). Obezite prevalansının saptanması amaçlı Türkiye'de gerçekleştirilen bir çalışmada ise obezite ( $BKİ \geq 30$ ) prevalansı %38.5 olarak tespit edilmiştir (Set ve Ates, 2017). Ayrıca ulusal düzeyde obezite prevalansının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde 1990-2010 yılları arasında obezite prevalansının ülkemizde yıllar içerisinde önemli ölçüde arttığı görülmektedir (Erem, 2015). Yapılan bu çalışmada Dünya sağlık örgütünün BKİ sınıflandırmasına göre çalışmaya katılan bireylerin %3,3' ünün zayıf, %37,7' sinin normal, %34,7' sinin fazla kilolu ve %24,3' ünün obez olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). Çalışmadan elde edilen bu veriler literatür ile paralellik göstermektedir. Ancak obezite prevalansını ve obezite prevalansının yıllar ile değişimini belirlemeye yönelik örneklem sayısının artırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Tablo 9.** Bireylerin BKİ dağılımları

BKİ	Katılımcı	
	S	%
Zayıf	48	3,3
Normal	545	37,7
Hafif Şişman	502	34,7
Obez	350	24,3

Konstipasyon gelişiminin birçok risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Obezitenin de bu risk faktörleri arasında olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle obezite ve konstipasyon gelişim riski arasındaki ilişki önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Belsey ve ark., 2010; Higgins ve Johanson, 2004; Johanson, 1998). Obezite durumunun konstipasyon gelişim riski üzerine etki mekanizmaları henüz tam olarak açık olmamakla birlikte farklı olası mekanizmalar mevcuttur (Şekil 1). Obez bireylerin fiziksel olarak inaktif olmaya ve beslenme eğilimlerinin daha çok posasız besinleri tüketmeye yönelik olduğu bu durumda barsak hareketliliğini azaltabileceği ve konstipasyon riskini bu mekanizmalar ile arttırabileceği bildirilmektedir (de Carvalho ve ark., 2006). Obez bireylerin gut mikrobiyotalarının normal BKİ'ne sahip bireylerin gut mikrobiyotalarına göre farklılaştığı bu durumun bir diğer olası mekanizma olabileceği belirtilmektedir (Delzenne ve ark., 2011; Dimidi ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2014). Abdominal yağ dokusu artışının bazı metabolik hormonların düzeylerinde yarattığı değişiklik ile konstipasyon riskini arttırabileceği de bildirilmektedir (Acosta ve Camilleri, 2014; Eslick, 2012; Pashankar ve Loening-Baucke, 2005).



Şekil 1. Obezite ve konstipasyon gelişim riski arasındaki ilişkiye dair muhtemel mekanizmalar.

Obezite ve konstipasyon arasındaki ilişki tartışmalıdır. Yaşları 6-70 arasında değişen 1987 katılımcı üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada obez bireylerin daha sık konstipe olduğu saptanmıştır (Pecora ve ark., 1981). İran’ da gerçekleştirilen başka bir çalışmada da fazla kilolu ve obez bireylerin daha sık konstipasyon sorunu yaşadığı tespit edilmiştir (Pourhoseingholi ve ark., 2009). Bu çalışmaların aksine konstipasyon ve obezite arasında ilişki olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (Delgado-Aros ve ark., 2004; Talley ve ark., 2004). Yapılan bu çalışmada, obez bireylerin zayıf, normal ve fazla kilolu bireylere göre konstipasyon gelişim riskinin istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Fazla kilolu bireylerin normal bireylere göre konstipasyon ciddiyet skorunun daha yüksek olduğu da çalışmanın bir diğer sonucudur ( $p<0,05$ ) (Tablo 2). Ayrıca katılımcıların BKİ ( $r=0,098$ ;  $p=0,000$ ) ve bel çevresi (cm) ( $r= 0,077$  0;  $p= 0,003$ ) ile konstipasyon gelişim riski arasında pozitif yönlü, bel çevresi (cm) ( $r= -0,058$ ;  $p=0,028$ ) ile konstipasyon ciddiyeti arasında ise negatif yönlü anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (Tablo 3). Bu veriler doğrultusunda; artan BKİ’ nin belirtilen olası mekanizmalar ile konstipasyon riskini arttırabileceği düşünülebilir.

Tablo 10. Bireylerin beden kütle indekslerine göre Konstipasyon Risk Belirleme Skalası ve Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoru Dağılımları

	Zayıf	Normal	Fazla Kilolu	Obez	
Kullanılan Ölçekler	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	p
Konstipasyon Risk Belirleme Skalası Skoru	7,05±2,65	7,17±3,01	7,18±2,86	8,10±3,32	$P_1 = 0,782$ $P_2 = 0,756$ $P_3 = 0,041$ $P_4 = 0,997$ $P_5 = 0,000$ $P_6 = 0,000$
Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoru	16,77±12,10	17,13±13,06	15,08±13,07	16,37±13,94	$P_1 = 0,885$ $P_2 = 0,367$ $P_3 = 0,722$ $P_4 = 0,006$ $P_5 = 0,203$ $P_6 = 0,275$

\* $p<0,05$ , Mann-Whitney U” testi kullanılmıştır.



P<sub>1</sub>: Zayıf-Normal, P<sub>2</sub>:Zayıf-Fazla Kilolu, P<sub>3</sub>: Zayıf-Obez, P<sub>4</sub>: Normal-Fazla Kilolu, P<sub>5</sub>:Normal-Obez, P<sub>6</sub>:Fazla Kilolu-Obez

**Tablo 11.** Bireylerin Konstipasyon Risk Belirleme Skalası Skoruna ve Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoruna göre BKİ, bel ve boyun çevresi ölçümleri ile ilişkisi

Parametreler	Konstipasyon risk belirleme skalası skoru		Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoru	
	r	p	r	p
BKİ (kg/m <sup>2</sup> )	0,098	0,000	-0,012	0,658
Bel çevresi (cm)	0,077	0,003	-0,058	0,028
Boyun çevresi (cm)	0,044	0,101	-0,046	0,085

\*p<0,05, Spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

Katılımcıların konstipasyon risk belirleme skala skoru (r=0,190; p=0,000) ile konstipasyon ciddiye ölçeği skoru arasında pozitif yönlü anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (Tablo 4). Bu veriler doğrultusunda konstipasyon gelişim risk puanının artışının konstipasyon nedeni şikayetlerin şiddetinde artışa neden olabileceği düşünülebilir.

**Tablo 12.** Bireylerin Konstipasyon Risk Belirleme Skalası Skorunun Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoru ile ilişkisi

	Konstipasyon risk belirleme skalası skoru	
	r	p
Konstipasyon Ciddiyet Ölçeği Skoru	0,190	0,000

\*p<0,05, Spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır.

## SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışma ve literatür verileri doğrultusunda BKİ'nin ve obezite durumunun konstipasyon risk ve şiddetini arttırabileceği sonucuna varılabilir. Ayrıca, artan bel çevresi (cm) ölçümünün konstipasyon gelişim riskini arttırdığı saptanmıştır. Ancak obezite ve konstipasyon arasındaki ilişkiye dair mekanizmaların net olarak ortaya konmamış olması ve literatürde var olan çelişkili çalışma sonuçları nedeniyle kesin yargılara varabilmek için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Acosta, A., & Camilleri, M. (2014a). Gastrointestinal morbidity in obesity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311(1), pp. 42-56.
- Belsey, J., Greenfield, S., Candy, D., & Geraint, M. (2010). Systematic review: impact of constipation on quality of life in adults and children. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 31(9), pp. 938-949.
- de Carvalho, É. B., Vitolo, M. R., Gama, C. M., Lopez, F. A., Taddei, J. A. C., & de Moraes, M. B. (2006). Fiber intake, constipation, and overweight among adolescents living in Sao Paulo City. *Nutrition*, 22(7-8), pp. 744-749.
- Delgado-Aros, S., Locke III, G. R., Camilleri, M., Talley, N. J., Fett, S., Zinsmeister, A. R., & Melton III, L. J. (2004). Obesity is associated with increased risk of gastrointestinal symptoms: a population-based study. *The American journal of gastroenterology*, 99(9), p 1801.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Bäckhed, F., & Cani, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(11), p 639.
- Dimidi, E., Christodoulides, S., Scott, S. M., & Whelan, K. (2017). Mechanisms of action of probiotics and the gastrointestinal microbiota on gut motility and constipation. *Advances in Nutrition*, 8(3), pp. 484-494.
- Erem, C. (2015). Prevalence of overweight and obesity in Turkey. *IJC Metabolic & Endocrine*, 8, pp. 38-41.

- Eslick, G. (2012). Gastrointestinal symptoms and obesity: a meta-analysis. *Obesity reviews*, 13(5), pp. 469-479.
- Fayfman, M., Flint, K., & Srinivasan, S. (2019). Obesity, Motility, Diet, and Intestinal Microbiota—Connecting the Dots. *Current gastroenterology reports*, 21(4), p 15.
- Flegal, K. M., Kruszon-Moran, D., Carroll, M. D., Fryar, C. D., & Ogden, C. L. (2016). Trends in obesity among adults in the United States, 2005 to 2014. *Jama*, 315(21), pp. 2284-2291.
- Gray, J. R. (2011). What is chronic constipation? Definition and diagnosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(Suppl B), pp. 7B-10B.
- Higgins, P. D., & Johanson, J. F. (2004). Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *The American journal of gastroenterology*, 99(4), p 750.
- Javed, A., Jumean, M., Murad, M. H., Okorodudu, D., Kumar, S., Somers, V., . . . Lopez-Jimenez, F. (2015). Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric obesity*, 10(3), pp. 234-244.
- Johanson, J. F. (1998). Geographic distribution of constipation in the United States. *The American journal of gastroenterology*, 93(2), pp. 188-191.
- Kaya, N., & Turan, N. (2011). Konstipasyon Ciddiyet Ölçeğinin Güvenilirlik ve Geçerliliği. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 31(6), pp. 1491-1501.
- Koch, A., Voderholzer, W. A., Klauser, A. G., & Müller-Lissner, S. (1997). Symptoms in chronic constipation. *Diseases of the colon & rectum*, 40(8), pp. 902-906.
- Kutlu, A. K., Yilmaz, E., Çeçen, D., & Eser, E. (2011). The reliability and validity of the Turkish version of the constipation risk assessment scale. *Gastroenterology Nursing*, 34(3), pp. 200-208.
- Meinds, R. J., van Meegdenburg, M. M., Trzpis, M., & Broens, P. M. (2017). On the prevalence of constipation and fecal incontinence, and their co-occurrence, in the Netherlands. *International journal of colorectal disease*, 32(4), pp. 475-483.
- Okorodudu, D., Jumean, M., Montori, V. M., Romero-Corral, A., Somers, V., Erwin, P., & Lopez-Jimenez, F. (2010). Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *International journal of obesity*, 34(5), p 791.
- Organization, W. H. (1998). *Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 3-5 June 1997*.
- Orhan, C., Akbayrak, T., Serap, K., Taylan, K., & GÜNEL, M. K. (2015). Fiziksel aktivite seviyesi ile konstipasyon şiddeti arasındaki ilişkinin incelenmesi. *Journal of Exercise Therapy and Rehabilitation*, 2(2), pp. 66-73.
- Pare, P., Ferrazzi, S., Thompson, W., Irvine, E., & Rance, L. (2001). An epidemiological survey of constipation in Canada: definitions, rates, demographics, and predictors of health care seeking. *The American journal of gastroenterology*, 96(11), pp. 3130-3137.
- Pashankar, D. S., & Loening-Baucke, V. (2005). Increased prevalence of obesity in children with functional constipation evaluated in an academic medical center. *Pediatrics*, 116(3), pp. e377-e380.
- Pecora, P., Suraci, C., Antonelli, M., De, S. M., & Marrocco, W. (1981). Constipation and obesity: a statistical analysis. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 57(23), pp. 2384-2388.
- Pekcan, G. (2011). Beslenme Durumunun Saptanması *DİYET EL KİTABI* (6 ed., pp. 67-142). ANKARA: HATİBOĞLU YAYINLARI.
- Pourhoseingholi, M. A., Kaboli, S. A., Pourhoseingholi, A., Moghimi-Dehkordi, B., Safaee, A., Mansoori, B. K., . . . Zali, M. R. (2009). Obesity and functional constipation; a community-based study in Iran. *J Gastrointestin Liver Dis*, 18(2), pp. 151-155.
- Sandler, R. S., & Drossman, D. A. (1987). Bowel habits in young adults not seeking health care. *Digestive diseases and sciences*, 32(8), pp. 841-845.
- Set, T., & Ates, E. (2017). Obesity prevalence among adults in east black sea region of Turkey. *Biomedical Research*, 28(9), pp. 4219-4222.
- Shah, N. D., Chitkara, D. K., Locke, G. R., Meek, P. D., & Talley, N. J. (2008). Ambulatory care for constipation in the United States, 1993–2004. *The American journal of gastroenterology*, 103(7), p 1746.
- Stewart, W. F., Liberman, J. N., Sandler, R. S., Woods, M. S., Stemhagen, A., Chee, E., . . . Farup, C. E. (1999). Epidemiology of constipation (EPOC) study in the United States: relation of clinical subtypes to sociodemographic features. *The American journal of gastroenterology*, 94(12), pp. 3530-3540.
- Talley, N. J. (2004). Definitions, epidemiology, and impact of chronic constipation. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 4, pp. S3-S10.

- Talley, N. J., Howell, S., & Poulton, R. (2004). Obesity and chronic gastrointestinal tract symptoms in young adults: a birth cohort study. *The American journal of gastroenterology*, 99(9), p 1807.
- Thompson, W., Longstreth, G., Drossman, D., Heaton, K., Irvine, E., & Müller-Lissner, S. (1999). Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut*, 45(suppl 2), pp. II43-II47.
- Wald, A. (2016). Constipation: advances in diagnosis and treatment. *Jama*, 315(2), pp. 185-191.
- WHO, J., & Organization, W. H. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WH.
- Zhu, L., Liu, W., Alkhouri, R., Baker, R. D., Bard, J. E., Quigley, E. M., & Baker, S. S. (2014). Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiological genomics*, 46(18), pp. 679-686.

DRAFT

## Türk mutfak kültüründe fermente ederek saklama

Mehmet Arif İcer<sup>1\*</sup>, Sıdıka Bulduk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: m.arif.icer@gmail.com

### Özet

Fermentasyon bilinen en eski ve ekonomik besin saklama yöntemlerinden biridir. Fermente gıdalar ve içecekler, bazı bakteri, maya ve mantarlar gibi mikroorganizmaların aktivasyonu ve onların enzimleri aracılığı ile üretilir. Türk geleneksel besin saklama yöntemleri içerisinde de fermentasyon çok yaygın olarak kullanılmakta olup, kullanımının çok eskiye dayandığı belirtilmektedir. Türk geleneksel mutfak kültüründe kullanılan süt ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünlere yoğurt, ayran, kurut, kefir ve kıymık örnek olarak verilebilir. Yoğurt yapımı esnasında Streptococcus thermophilus ve Lactobacillus bulgaricus adı verilen süt asidi bakterileri sütte bulunan laktozu parçalayarak glukoz ve galaktoza hidrolize eder. Bu her iki bileşen de fermentasyon sonucu laktik aside dönüşür. Oluşan laktik asit sütü pıhtılaştırarak yoğurt meydana gelir. Kurut ise yoğurt ve ayranın kurutulmuş şeklidir. Kefir, kefir daneleri tarafından oluşturulan, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum gibi doğal probiyotikler ile birçok laktik asit bakterisi ve maya içeren fermente bir süt ürünüdür. Kıymık ise kırsak sütünden yapılan ve Orta Asya'da tüketilen hafif alkollü fermente bir süt içeceğidir. Tahıl ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünlere ise boza ve tarhana örnek olarak verilebilir. Tarhana yüksek besin değeri ve uzun raf ömrü ile Orta Doğu ve Türkiye'deki birçok insanın diyetinde önemli bir yer tutmaktadır. Sebze ve meyve ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünlere turşu ve şalgam örnek olarak verilebilir. Türkiye'de fermente sebze-meyvelerin genel adı "Turşu" olarak adlandırılmaktadır. Türk mutfak kültüründe birçok fermente et ürünü olmasına rağmen en fazla tüketilen fermente et ürünleri sucuk ve pastırma'dır. Türk mutfak kültüründe besin saklama yöntemi olarak sıklıkla tercih edilen fermentasyon yöntemi ile bir çok besinin raf ömrü uzatılabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Besin saklama, fermentasyon, kefir, boza, turşu, sucuk

### Fermented storage in Turkish culinary culture

#### Abstract

Fermentation is one of the oldest known and economical food storage methods. Fermented foods and beverages are produced by the activation of microorganisms such as some bacteria, yeasts and fungi and by their enzymes. Fermentation is also widely used in Turkish traditional food preservation methods and it is stated that its use is very old. Some traditional fermented products based on dairy products used in Turkish traditional cuisine are yoghurt, ayran, kurut, kefir and kıymık. During the formation of yogurt, Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus called milk acid bacteria hydrolyze into glucose and galactose by breaking down lactose in milk. Both of these components are converted to lactic acid as a result of fermentation. The lactic acid formed forms a yogurt by coagulating the milk. Kurut is the dried form of yoghurt and ayran. Kefir is a fermented dairy product containing natural probiotics such as Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum and many lactic acid bacteria and yeasts formed by kefir grains. Kıymık is a light alcoholic fermented milk drink made from mare milk and consumed in Central Asia. Some traditional fermented products based on cereal products can be given as an example of boza and tarhana. High nutritional value and having a long shelf life Tarhana holds an important place in the diet of many people in the Middle East and Turkey. Some traditional fermented products based on vegetables and fruit products can be given as pickles and turnips. General name of fermented fruit and vegetables in Turkey "pickle" is called. Although there are many fermented meat products in the Turkish cuisine culture, the most consumed fermented meat products are sausage (sucuk) and pastırma. In the Turkish culinary culture, the shelf life of many nutrients can be extended by the fermentation method, which is frequently preferred as a method of food storage.

**Keywords:** Food preservation, fermentation, kefir, boza, pickles, sausage

#### 1. Giriş

Orta Asya'ya yerleşen Türkler atlı göçebe bir kültüre sahip olup ilkbaharda geniş meraları olan yaylalara göçüp; sonbaharda ise kurak vadilere ve bilhassa nehir kıyılarına inerek yaşamlarını sürdüren ve

ekonomilerinin temelini hayvancılık ve buğday oluşturan bir millettir (Koşay ve Ülkücan, 2011, Memiş ve Ersoy, 2014). Bu göçebe yaşam biçiminin etkisiyle Türkler gıda muhafaza yöntemlerine büyük önem vermişlerdir (Memiş ve Ersoy 2014). Orta Asya'dan günümüze, Türk mutfağında besinlerin uzun süre saklanabilmesi ve dayanıklılığını koruyabilmesi için bazı muhafaza yöntemleri kullanılmaktadır (Alçay ve ark., 2015).

Besin saklamanın yöntemlerinin temel amacı yiyeceklerini uzun süre muhafaza ederek saklamak ve bu maddelerin tazelerini bulmanın güç olduğu zamanlarda tüketmektir (Westerband ve Hicks, 2018). Besin saklamada en dikkat edilmesi gereken en önemli husus ise saklanacak besinin fiziksel ve kimyasal olarak bozulmasının önlenmesi ve besinsel değerinin korunmasıdır (Ratti, 2001).

Türk mutfak kültüründe birçok geleneksel besin saklama yöntemi bulunmaktadır. Bu geleneksel besin saklama yöntemlerinden biri fermantasyon ile besin saklama yöntemidir. Fermantasyon bilinen en eski ve ekonomik besin saklama yöntemlerinden biridir (Kabak ve Dobson, 2011). Fermente gıdalar ve içecekler, bazı bakteri, maya ve mantarlar gibi mikroorganizmaların aktivasyonu ve onların enzimleri aracılığı ile üretilir (Nout, 2003).

Fermantasyon, mikroorganizmaların aktivitesi sonucu işlem uygulanan besinin bozulmasını önlemesinin yanı sıra fermantasyon süresince esansiyel aminoasitlerin ve vitaminlerin sentezlenmesi aracılığıyla işlem uygulanan gıdanın besinsel kalitesini artırmanın doğal bir yoludur (Kabak ve Dobson, 2011). Ayrıca, fermantasyon ürünün duyu özelliklerini iyileştirmektedir (Hancioğlu ve Karapınar, 1997).

Hem bitki hem de hayvansal ürünlerin fermantasyonu için çeşitli yöntemler tanımlanmış olup, en erken kayıtlar MÖ 6000 yıllarına dayanmaktadır (Kabak ve Dobson, 2011). Türk geleneksel besin saklama yöntemleri içerisinde de fermantasyon çok yaygın olarak kullanılmakta olup, kullanımının çok eskiye dayandığı belirtilmektedir. Türk geleneksel mutfak kültüründe kullanılan bazı fermente gıdalara yoğurt, ayran, kurut, kefir, kımız, boza, tarhana, turşu, şalgam ve sucuk-pastırma örnek olarak verilebilir (Levent ve Cavuldak 2017; Sengun ve ark., 2009; Erkmen, 2008; Ertenve ark., 2008; Fiorda ve ark., 2017).

Bu derlemede Türk mutfak kültüründe yer alan fermantasyon ile saklama yöntemi geniş bir perspektif ile irdelenmiştir.

## 2. Süt ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünler

*Yoğurt, ayran, kurut, kefir, kımız*

Yoğurt ve benzeri fermente süt ürünleri yüzyıllardır Orta Doğu ülkeleri ve Türkiye' deki birçok insan tarafından üretilmekte ve tüketilmektedir (Akalin ve ark., 1998). Yoğurt *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* adı verilen süt asidi bakterileri sütte bulunan laktozu parçalayarak glukoz ve galaktoza hidrolize eder. Bu her iki bileşen de fermantasyon sonucu laktik aside dönüşür. Oluşan laktik asit sütü pıhtılaştırarak yoğurt meydana gelir (Akalin ve ark., 1998). Ayran ise yüzlerce yıldır Anadolu'da geleneksel olarak yoğurdun su ve tuz ile karıştırılmasıyla üretilmektedir (Kabak ve Dobson, 2011).

Kurut yoğurt ve ayranın kurutulmuş şeklidir. Özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde sütün bol olduğu dönemlerde küçük parçalar halinde güneşte kurutulmuş geleneksel olarak yapılan tadı mayhoş, sulandırıldığında yoğurt benzeri koyu kıvamlı bir fermente süt ürünüdür (Karaçıl ve Acar Tek, 2013).

Kefir, kefir daneleri tarafından oluşturulan, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* gibi doğal probiyotikler ile birçok laktik asit bakterisi ve maya içeren fermente bir süt ürünüdür (Köroğlu ve ark., 2015). Kefirin ilk üretiminin Kafkas dağlarına, Tibet veya Moğolistan'a dayandığı tahmin edilmektedir (Irigoyen ve ark., 2005). Kefir kelimesi Türkçede 'keyif' kelimesinden türemiştir (Kabak ve Dobson, 2011). Yüzyıllardır Sovyet ülkelerinde yaygın olarak tüketilirken, sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle Avrupa ülkelerinde, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde de giderek tüketimi artmaktadır (Kabak ve Dobson, 2011; Farnworth, 1999).

Kımız kısrak sütünden yapılan ve Orta Asya'da tüketilen hafif alkollü fermente bir süt içeceğidir (Danova ve ark., 2005). Kımız tüketime hazırlandıktan sonra da fermantasyon devam ettiğinden içerik değerleri sabit değildir (Karaçıl ve Acar Tek, 2013). Kımız ayrıca Moğolistan, Kazakistan, Kırgızistan ve Rusya'nın bazı bölgelerinde airag, kumys, kumis gibi çeşitli isimler altında üretilmektedir (Danova ve ark., 2005).

### 3. Tahıl ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünler

#### *Boza*

Geleneksel bir içecek olan boza, ekşimsi-tatlımsı bir tadı olan fermente bir içecektir. Bu içecek koyu bir kıvamda, açık sarı renge ve karakteristik asidik-alkolik koya sahip olup özellikle soğuk kış gecelerinde tüketimi tercih edilmektedir (Arici ve Daglioglu, 2002). Boza günümüzde Anadolu, Güney Rusya, Doğu Avrupa ülkeleri, Orta Doğu ve Kuzey İran'da yaygın olarak üretilmekte ve tüketilmektedir (Arici ve Daglioglu, 2002).

Boza, "yabancı maddelerinden temizlenmiş darı, pirinç, buğday, mısır ve benzeri hububatın kırma veya unlarından biri veya bir kaçına içme suyu katılarak pişirilmesi ve beyaz şeker ilave edilerek tekniğine uygun olarak alkol ve laktik asit fermentasyonlarına tabi tutulması ile hazırlanan bir mamul" olarak tanımlanmaktadır (Levent ve Cavuldak, 2017). Fermentasyon 24 saat boyunca 30 derecede gerçekleştirilir. Fermentasyonun ardından boza, buzdolabı sıcaklığına soğutulur ve 3-5 gün içinde tüketilmelidir (Arici ve Daglioglu, 2002).

Ülkemizde bozanın besin değeri içeriğinin artırılması ve raf ömrünün uzatılması amaçlı bazı besinlerin eklenmesinin denendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Çelik ve ark., 2016; Tamer, 2004; Duran Balkan, 2011). Bu amaçlar ile ülkemizde bozaya çeşitli meyvelerin (Tamer 2004), keçiyoynuzunun (Duran Balkan, 2011), leblebi ununun (Çelik ve ark., 2016) ve çeşitli baharatların (Coskun ve Cakır, 2014) eklenmesi denenmiştir.

#### *Tarhana*

Tarhana, yüksek besin değeri ve uzun raf ömrü ile Orta Doğu ve Türkiye'deki birçok insanın diyetinde önemli bir yer tutmaktadır (Kabak ve Dobson, 2011). Divanü Lügati't Türk'te tarhana için, yazdan kışa saklanan yoğurt anlamında "tar" kelimesi kullanılmıştır. Türk sözlüklerinde ilk olarak Kıpçak ve Mısır Memluk Türklerine ait deyişler arasında "tarhanah" şeklinde yazılmıştır (Coşkun, 2014).

Tarhana "buğday unu, kırması, ırmik veya bunların karışımı ile yoğurt, biber, tuz, soğan, domates ve tat, koku verici, sağlığa zararsız bitkisel maddelerin karıştırılıp yoğrulduktan ve bir ile yedi gün arasında fermente edildikten sonra kurutulması, öğütülmesi ve elenmesiyle elde edilen bir besin maddesidir" şeklinde tanımlanmaktadır (Coşkun, 2014; Kabak ve Dobson, 2011). Ancak tarhananın yapılışı ve içerisindeki besinler ülkemizde yöreden yöreye hatta ilden ile değişebilmektedir (Coşkun, 2014).

### 4. Sebze ve meyve ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünler

#### *Turşu*

Dünyada pek çok tür fermente et, süt ürünleri ve sebze-meyve ürünleri vardır, ancak fermente sebzeler fermente et ve süt ürünleri olarak yaygın ticari ürünler değildir. Çünkü fermente edilmiş sebzeler-meyveler standart bir bileşene sahip değildir ve bileşenleri iklimsel ve coğrafi koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Çetin, 2011).

Türkiye'de fermente sebze-meyvelerin genel adı "Turşu" dur. Turşu kelimesi ise Farsça "torsh" kelimesinden gelir ve bu kelime "ekşi" anlamına gelmektedir. Turşu, Anadolu'da insan tarafından kullanılan en eski fermentasyon ürünlerinden biridir. Turşu çok çeşitli sebze ve meyvelerden yapılabilir. Ancak sebzeler, yapıları nedeniyle turşu üretimi için daha uygundur. Salatalık, lahana, yeşil domates, yeşilbiber ve Acur turşu hazırlamak için kullanılan en popüler sebzelerdir. Ayrıca, bazı bölgelerde tüketici tercihinine göre birçok farklı sebze ve meyve de turşu yapımına dahil edilebilmektedir (Kabak ve Dobson, 2011).

Turşu hazırlamak için sebze ve / veya meyveler aroma maddeleri ile birlikte cam veya plastik kaplara konular ve preslenir. Üzüm sirkesi içeren tuzlu su (su içinde % 10-15 NaCl çözeltisi) eklenir ve turşu 4 hafta boyunca yaklaşık 20 ° C'de fermente edilir (Kabak ve Dobson, 2011).

#### *Şalgam*

Şalgam suyu; bulgur unu, ekşi hamur, içme suyu ve yemeklik tuzun karıştırılıp laktik asit fermentasyonuna tabi tutulduktan sonra elde edilen özütün, şalgam (Brassica rapa), siyah havuç (Daucus carota) ve istenirse acı toz biber ilave edilerek hazırlanan karışımın tekrar laktik asit fermentasyonuna tabi tutulması ile elde edilen ve istendiğinde ısı işlem ile dayanıklı hale getirilen bir ürün olarak tanımlanmaktadır (Say ve Ballı, 2012). Şalgam suyu üretimi başta Adana olmak üzere Mersin, Hatay, Osmaniye ve Kahramanmaraş illerinde ve bu

illere bağılı ilçelerde yaygın olarak yapılmaktadır. Ayrıca son yıllarda İstanbul, Ankara ve İzmir gibi illerde de üretimi gerçekleştirilmektedir (Bayram ve ark., 2014).

## 5. Et ürünleri bazı bazı geleneksel fermente ürünler

### *Sucuk-pastırma*

Sucuk ve pastırma ülkemizde en fazla tüketilen fermente et ürünleri arasında yer almaktadır (Işıksal ve ark., 2009). Sucuk-pastırma daha çok karakteristik aroma ve lezzeti nedeniyle tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Kayaardı ve Gök, 2004). Geleneksel fermente Türk sucuğu, hammadde olarak kullanılan et ve yağ karışımına değişik oranlarda baharat ve katkı maddelerinin ilave edilmesiyle hazırlanan ve belirli koşullarda olgunlaştırıldıktan sonra tüketime sunulan değerli bir et ürünüdür. Pastırma ise çoğunlukla sığır karkaslarının belirli bölgelerinden çıkarılan etlerin, uzun ve çeşitli işlemleri kapsayan, tuzlanıp kurutma işlemlerinden sonra çemenlenmesiyle elde edilen ve ince dilimler halinde kesilerek tüketilen uzun, yassı bir et ürünüdür (Sancak ve ark., 2008).

## 6. Sonuç

İnsanoğlu farklı besin saklama yöntemlerini geliştirerek, gıdaların doğal tüketim sürelerini uzatmış, kendisi için besinlerin tüketim takvimini değiştirmiştir. Bununla birlikte, geçmişte yaşamış uygarlıkların kullandıkları besin saklama metotları ve deneyimleri günümüzün bilimsel bilgisine ışık tutmuş ve oldukça uzun süre kullanılmaya devam etmiştir. Farklı kültürlerin farklı beslenme alışkanlıkları olduğu gibi uygulamış oldukları farklı besin saklama yöntemleri de bulunmaktadır. Türk mutfak kültüründe ise en sık kullanılan besin saklama yöntemlerinden biri fermantasyon ile besin saklama yöntemidir. Türk mutfak kültüründe birçok süt, tahıl, sebze-meyve ve et ürünlerinin fermantasyon yoluyla saklanarak raf ömürlerinin uzatıldığı ve bazı istenen dokusal özelliklerin bu saklama yöntemiyle besinlere kazandırılacağı söylenebilir.

## Kaynaklar

- Akalın, A Sibel, Özer Kınık, and Sıddık Gönç 1998. "Yoğurt üretimi ve depolama sırasında organik asitlerin belirlenmesi." *GIDA/THE JOURNAL OF FOOD*, 23 (1).
- Alçay, Ayla ÜNVER, S Yalçın, Kamil Bostan, and Ekin Dinçel 2015. "Orta Asya'dan Anadolu'ya kurutulmuş gıdalar." *ABMYO Dergisi*, 40:83-93.
- Arici, Muhammet, and Orhan Daglioglu 2002. "Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food." *Food Reviews International*, 18 (1):39-48.
- Bayram, Mustafa, Sebiha Erdoğan, Yasemin Esin, Onur Saraçoğlu, and Cemal Kaya 2014. "Farklı Siyah Havuç Miktarlarının Şalgam Suyunun Bileşimine ve Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi." *Akademik Gıda*, 12:29-34.
- Coskun, F, and E Cakır 2014. "Effect of the addition of different spices on some characteristics of boza during storage." *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (5):1079-1084.
- Coşkun, Fatma 2014. "Tarhananın tarihi ve Türkiye'de tarhana çeşitleri." *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9 (3):69-79.
- ÇelİK, İlyas, Fatma Işık, and Yusuf Yılmaz 2016. "Effect of roasted yellow chickpea (leblebi) flour addition on chemical, rheological and sensory properties of boza." *Journal of Food Processing and Preservation*, 40 (6):1400-1406.
- Çetin, Bülent 2011. "Production of probiotic mixed pickles (Tursu) and microbiological properties." *African Journal of Biotechnology*, 10 (66):14926-14931.
- Danova, Svetla, Kaloyan Petrov, Plamen Pavlov, and Penka Petrova 2005. "Isolation and characterization of Lactobacillus strains involved in koumiss fermentation." *International Journal of Dairy Technology*, 58 (2):100-105.
- Duran Balkan, N 2011. "Keçiboynuzlu Bozannın Bazı Kalitatif Özelliklerinin İncelenmesi." Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü ...
- Erkmen, Osman 2008. "Modeling the effects of sucuk production technique on Listeria monocytogenes, aerobic bacteria and lactic acid bacteria during ripening and storage." *food and bioproducts processing*, 86 (3):220-226.
- Erten, Huseyin, Hasan Tanguer, and Ahmet Canbaş 2008. "A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (Salgam)." *Food Reviews International*, 24 (3):352-359.
- Farnworth, Edward R 1999. "Kefir: from folklore to regulatory approval." *Journal of nutraceuticals, functional & medical foods*, 1 (4):57-68.

- Fiorda, Fernanda Assumpção, Gilberto Vinicius de Melo Pereira, Vanete Thomaz-Soccol, Sudip Kumar Rakshit, Maria Giovana Binder Pagnoncelli, Luciana Porto de Souza Vandenberghe, and Carlos Ricardo Soccol 2017. "Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review." *Food microbiology*, 66:86-95.
- Hancioğlu, Ömre, and Mehmet Karapinar 1997. "Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage." *International Journal of Food Microbiology*, 35 (3):271-274.
- Irigoyen, A, I Arana, M Castiella, P Torre, and FC Ibanez 2005. "Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage." *Food Chemistry*, 90 (4):613-620.
- Işıksal, Seyfullah, Ayla Soyer, and Recai Ercan 2009. "Sucuk ve pastırmanın desorpsiyon izotermlerine sıcaklığın etkisi." *GIDA*, 34 (1):11-20.
- Kabak, Bulent, and Alan DW Dobson 2011. "An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey." *Critical reviews in food science and nutrition*, 51 (3):248-260.
- Karaçıl, Merve Şeyda, and Nilüfer Acar Tek 2013. "Dünyada üretilen fermente ürünler: tarihsel süreç ve sağlık ile ilişkileri."
- Kayaardı, S, and V Gök 2004. "Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk)." *Meat science*, 66 (1):249-257.
- Koşay, Hamit Zübeyir, and Akile Ülkücan 2011. *Anadolu yemekleri ve Türk mutfağı: Çiya*.
- KÖROĞLU, Özge, Esra BAKIR, Günsel ULUDAĞ, Sedat KÖROĞLU, and Kenan Sinan DAYISOYLU 2015. "Kefir ve Sağlık." *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 18 (1):26-30.
- Levent, Hacer, and Özge Algan Cavuldak 2017. "Geleneksel Fermente Bir İçecek: Boza." *Akademik Gıda*, 15 (3):300-307.
- Memiş, Emel, and Yasemin ERSOY 2014. "GELENEKSEL GIDA MUHAFAZA YÖNTEMLERİ."
- Nout, MJ ROBERT 2003. "Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia." In *Yeasts in food-beneficial and detrimental aspects*, 451-473. Behr's Verlag.
- Ratti, Cristina 2001. "Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review." *Journal of food engineering*, 49 (4):311-319.
- SANCAK, Yakup Can, Kamil EKİCİ, and Özgür İŞLEYİCİ 2008. "Fermente Türk sucuğu ve pastırmalarda kalıntı nitrat ve nitrit düzeyleri." *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1):41-45.
- Say, Dilek, and E Ballı 2012. "Şalgam suyunun (şalgam) özellikleri ve Adana Bölgesi'nin gastronomi turizmindeki önemi, II." *Disiplinlerarası Turizm Araştırmaları Kongresi*:612-620.
- Sengun, Ilkin Yucel, Dennis S Nielsen, Mehmet Karapinar, and Mogens Jakobsen 2009. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food." *International journal of food microbiology*, 135 (2):105-111.
- Tamer, CE 2004. "Meyveli ve Meyve Aromalı Boza Üretiminin Araştırılması." Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Westerband, Edward I, and Andrea L Hicks 2018. "Nanosilver-Enabled Food Storage Container Tradeoffs: Environmental Impacts Versus Food Savings Benefit, Informed by Literature." *Integrated environmental assessment and management*, 14 (6):769-776.



## Yetişkin Bireylerin İçecek Tüketim Alışkanlıkları ile Kolon Geçiş Zamanları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Teslime Özge ŞAHİN<sup>1</sup>, Mehmet Arif İÇER<sup>1</sup>, Gamze AKBULUT<sup>1</sup>, Nilüfer ACAR TEK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail:tozgeyrnsn@gmail.com

### Özet

Kolon geçiş zamanının hızlı olması diyare, yavaş olması ise konstipasyon ile ilişkilendirilmektedir. Literatür incelendiğinde kolon geçiş süresi ile içecek tüketimi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısının yetersiz olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu araştırma, yetişkin bireylerin içecek tüketim alışkanlıkları ile kolon geçiş zamanları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla planlanmıştır. Araştırmaya 18-65 yaş aralığında 1439 birey dahil edilmiştir. Bireylerin içecek tüketim alışkanlıkları “Sıvı Tüketim Sıklığı Formu”, kolon geçiş zamanı “Bristol Dışkı Ölçeği” ile değerlendirilmiştir. Araştırmaya katılan bireylerin yaş ortalaması 37.5±11.19’ dur. Bireylerin % 29.4’ ünün yavaş, %55.2’ sinin normal, %15.4’ ünün hızlı kolon geçiş zamanına sahip olduğu saptanmıştır. Günlük toplam sıvı alımının kolon geçiş zamanı yavaş olanlarda hızlı olanlardan anlamlı şekilde yüksek (p<0.05) ve toplam sıvı alımı (mL/gün) ile kolon geçiş hızı arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu görülmüştür (r=.173; p<0.01). Kolon geçiş zamanı yavaş olanlar ile hızlı olanların günlük su, ayran, hazır meyve suyu, siyah çay, bitki çayı, kahve soda, enerji içeceği ve alkollü içecek tüketim miktarlarının anlamlı şekilde farklı olduğu bulunmuştur (p<0.05). Kolon geçiş zamanı ile içecek tüketim miktarları (mL/gün) arasındaki korelasyonlar incelendiğinde toplam sıvı, su, ayran, siyah çay, kahve ve soda tüketimi ile pozitif yönlü; hazır meyve suyu, bitki çayı ve enerji içeceği tüketimi ile negatif yönlü bir korelasyon bulunmuştur(p<0.05). Bu sonuçlar sıvı alımının kolon geçiş zamanı ile yakından ilişkili olduğunu ancak her içecek çeşidinin kolon geçiş zamanı üzerindeki etkisinin aynı olmadığını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kolon geçiş zamanı, sıvı tüketimi, içecek, konstipasyon

### Abstract

The rapid transit time of the colon is associated with diarrhea and the slow duration is associated with constipation. When the literature was examined, it was seen that the number of studies examining the relationship between colon transit time and beverage consumption was insufficient. Therefore, this study was planned to evaluate the relationship between the consumption habits of adult individuals and the transition times of colon. 1439 individuals aged 18-65 years were included in the study. The beverage consumption habits of the individuals were evaluated by “Fluid Consumption Frequency Questionnaire” and colon transit time by “Bristol Stool Scale”. The mean age of the participants was 37.5 ± 11.19 years. It was determined that 29.4% of the subjects had slow, 55.2% had normal and 15.4% had fast colon transit time. Daily total fluid intake was significantly higher (p <0.05) in patients with slow colon transit time, and there was a positive correlation between total fluid intake (mL / day) and column passage rate (r = .173; p <0.01). Daily water, buttermilk, instant fruit juice, black tea, herbal tea, coffee, mineral water, energy drink and alcoholic beverages were found to be significantly different between the ones with slow colon transition time and the fast ones (p <0.05). When the correlations between colon transit speed and beverage consumption amounts (mL / day) were examined, total fluid, water, buttermilk, black tea, coffee and soda consumption were positively correlated with; and there was a negative correlation with the consumption of instant fruit juice, herbal tea and energy drink (p <0.05). These results show that fluid intake is closely related to the colon transit time, but the effect of each beverage type on the transition time is not the same.

**Key words:** Colon transit time, liquid consumption, beverage, constipation

### 1.GİRİŞ

Kolon geçiş zamanı dışkıdan kolondan geçiş süresi olarak tanımlanmaktadır. Kolon geçiş zamanının hızlı olması kalın bağırsakta emilim fonksiyonunu bozarak, mikrobiyotayı değiştirerek ve distal kolonu asitleştirerek diyareye yol açabilmektedir. Yavaş geçiş zamanı ise, safra asidi metabolizmasını ve östrojen metabolizmasını değiştirmekte ve konstipasyon, irritabl bağırsak sendromu, kolon kanseri ve safra kesesi taşı riskini artırmaktadır (Bengi, Yalçın, & Akpınar, 2014). Yaş ve cinsiyet açısından sağlıklı kontrollerle eşleştirilen konstipasyonlu bireylerde kolon geçiş zamanının 4.7 gün, kontrol grubunun 2.4 gün olduğu bulunmuştur (Annells & Koch, 2003). Ayrıca kadınların erkeklere göre daha uzun kolon geçiş zamanına sahip

olduğu belirtilmiştir (Bohlin et al., 2018). Yapılan bir araştırmada kolon geçiş zamanı kadınlarda 2.5 gün, erkeklerde 1.7 gün olarak bulunmuştur ( $P < 0.001$ ) (Bohlin et al., 2018). Kolon geçiş zamanı ile beslenme arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar genellikle posa ve sıvı alımı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Kırk yedi Koreli yetişkin bireyin (erkek,  $n = 23$ ; kadın,  $n = 24$ ) kolon geçiş zamanlarının incelendiği bir çalışmada; bireylerin günlük su tüketimi ile kolon geçiş zamanı (gün) arasında negatif yönlü bir korelasyon saptanmıştır ( $r = -0.257$ ,  $P < 0.05$ ) (Cho, Jo, Song, Oh, & Kim, 2013). Yani su tüketiminin azalmasıyla kolon geçiş hızı yavaşlamaktadır. Yapılan başka bir çalışmada kahve tüketimi ( $P = 0.045$ ) ve osmotik ( $P = 0.001$ ) laksatif kullanımı kolon geçiş zamanının azalması ile ilişkili bulunurken; çay, ve alkol tüketimi arasında bir ilişki görülmemiştir (Bohlin et al., 2018).

Literatür incelendiğinde kolon geçiş zamanı ile sıvı alımı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısının yetersiz olduğu görülmüştür. Bu araştırma, yetişkin bireylerin içecek tüketim alışkanlıkları ile kolonik geçiş zamanları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

Araştırmaya 18-65 yaş aralığında 1439 birey dahil edilmiştir. Bireylerin içecek tüketim alışkanlıkları “Sıvı Tüketim Sıklığı Formu”, Kolon geçiş zamanı “Bristol Dışkı Ölçeği” ile değerlendirilmiştir.

Sıvı tüketim sıklığı formu; su, süt, ayran, kefir, taze meyve suyu, hazır meyve suyu, siyah çay, bitki çayı, kahve, gazlı içecek, soda, enerji içeceği, alkollü içecek olmak üzere 13 içecek çeşidinden oluşmaktadır. Bireylerin bu içecekleri tüketim sıklıkları ve tüketim miktarları sorgulanmıştır.

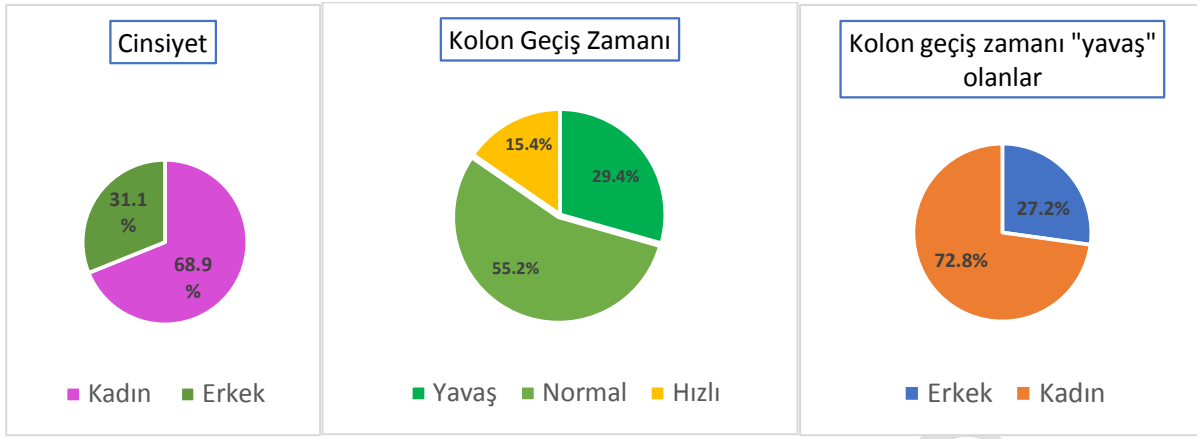
Bristol dışkı ölçeği, kolon geçiş zamanının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Tip 1 dışkının bağırsakta en uzun süre, tip 7 ise en kısa süre kaldığını göstermektedir. Düşük skorlar (1, 2) yavaş geçişi, yüksek skorlar (5-7) hızlı geçişi temsil etmektedir. Normal bir dışkının tip 3 veya tip 4 gibi olması gerekmektedir (Lewis & Heaton, 1997).

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 24.0 programı kullanılmıştır. İçecek tüketim miktarları ve kolon geçiş zamanı verileri normal dağılım göstermediği için Tablo-2’de verilen değerler medyan değerleridir. Bu nedenle kolon geçiş hızlarına göre içecek tüketim miktarları arasındaki farklılığın analizi Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kolon geçiş hızı ile içecek tüketim miktarı arasındaki korelasyonun analizi ise Spearman korelasyon testi yapılmıştır.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yetişkin bireylerin içecek tüketim alışkanlıkları ile kolon geçiş zamanları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yaş ortalaması  $37.5 \pm 11.19$  yıl olan 1439 bireyin dahil edildiği bu araştırma sonucunda bireylerin kolon geçiş zamanlarının içecek tüketim alışkanlıkları ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür.

Araştırmaya katılan bireylerin %68.9’u kadın, %31.1’i erkek’tir. Ayrıca %29.4’ünün yavaş, %55.2’sinin normal, %15.4’ünün hızlı kolon geçiş zamanına sahip olduğu saptanmıştır. Kolon geçiş zamanı yavaş olanların ise %72,8’i kadın, %27,2’si erkek’tir (Şekil 1). Yapılan çalışmalar konstipasyon prevalansının kadınlarda erkeklere göre daha fazla olduğunu göstermektedir (Jung, Kim, & Moon, 2003; Song, Cho, Jo, Oh, & Kim, 2012). Bu etkinin temel nedeninin kadın cinsiyet hormonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada serum progesteron seviyelerinin en yüksek olduğu gebeliğin ikinci ve üçüncü trimesterinde kolon geçiş zamanının anlamlı şekilde arttığı, progesteronun intestinal düz kasların kasılması üzerinde doza bağımlı inhibe edici bir etkisi olduğu bulunmuştur (Jung, Kim, & Moon, 2003). Progesteron ayrıca hücre içi kalsiyum taşınmasını modüle etmesi ve bağırsak uyarıcı bir hormon olan motilin etkisini antagonize etmesinden dolayı da kolon motilitesini azaltarak kolon geçiş zamanını artırabilmektedir.



Şekil 1. Araştırmaya katılan bireylerin genel özellikleri

Kolon geçiş zamanı ile ilişkili bir diğer faktör günlük sıvı tüketimidir (Anti et al., 1998; Ng, Jia, Low, Yeoh, & Gan, 2016). Bu çalışmada günlük toplam sıvı tüketimi medyan değeri kolon geçiş zamanı yavaş olanlarda 2074.4 mL, normal olanlarda 2409.9 mL, hızlı olanlarda 2471.6 mL' dir ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1) ve kolon geçiş hızı ile toplam sıvı tüketimi arasında pozitif yönlü ( $p < 0.05$ ) korelasyon saptanmıştır (Tablo 2). Yapılan başka araştırmalar da bizimkine benzer şekilde günlük sıvı tüketiminin artması ile konstipasyon riskinin azaldığını ve dışkı yumuşaklığının arttığı bulunmuştur (Anti et al., 1998; Ng et al., 2016).

Tablo 13. Kolon geçiş hızı ile içecek tüketim miktarları arasındaki korelasyon

	Bristol dışkı ölçeği	
	r	p
<b>Toplam sıvı</b>	<b>,175**</b>	<b>,000</b>
<b>Su</b>	<b>,218**</b>	<b>,000</b>
Süt	-,026	,323
<b>Ayran</b>	<b>,137**</b>	<b>,000</b>
Kefir	-,049	,061
Taze Meyve Suyu	,007	,804
<b>Hazır Meyve Suyu</b>	<b>-,178**</b>	<b>,000</b>
<b>Siyah Çay</b>	<b>,159**</b>	<b>,000</b>
<b>Bitki Çayı</b>	<b>-,099**</b>	<b>,000</b>
<b>Kahve</b>	<b>,112**</b>	<b>,000</b>
Gazlı İçecek	-,047	,074
<b>Maden suyu</b>	<b>,062*</b>	<b>,019</b>
<b>Enerji İçeceği</b>	<b>-,111**</b>	<b>,000</b>
Alkollü İçecek	,048	,066

Yoğurt tüketiminin, yapısında bulunan canlı bakterilere (Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii sp. Bulgaricus ve Lactobacillus acidophilus) bağlı olarak önemli sağlık yararları sağladığı gösterilmiştir. Bazı insan çalışmaları, canlı bakteri içeren yoğurtların laktoz sindirimini iyileştirdiğini ve laktoz intoleransı semptomlarını ortadan kaldırdığını açıkça göstermiştir (Guarner et al., 2005). Bu çalışmada da ayran tüketimi ile kolon geçiş zamanı arasında pozitif yönlü ( $p < 0.05$ ) korelasyon saptanmıştır (Tablo 1), kolon geçiş zamanı hızlı olanlarda ayran tüketiminin yavaş olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 2). Randomize kontrollü çalışmaların incelendiği bir çalışma sonucunda Lactobacillus veya Bifidobacterium türlerini içeren ürünlerin tüketiminin, konstipasyonlu bireylerde bağırsak geçiş süresini 15 saate kadar azalttığı bulunmuştur (Miller, Ouwehand, & Ibarra, 2017). Bu çalışma sonucunda yoğurttan türetilen bir içecek olan ayran tüketiminin artmasıyla kolon geçiş hızının artması ve kolon geçiş zamanı hızlı olanlarda ayran tüketiminin anlamlı şekilde yüksek olması ayranın yapısında bulunan probiyotik bakterilerin sağlık üzerindeki olumlu etkileri (örn; laktoz intoleransını önleyici) ile ilişkilendirilebilir.

**Tablo 14. Bireylerin kolon geçiş zamanlarına göre içecek tüketim miktarlarının karşılaştırılması**

	Kolon Geçiş Zamanı			İstatistiksel Analiz		
	Yavaş	Normal	Hızlı	P <sub>yavaş-normal</sub>	P <sub>yavaş-hızlı</sub>	P <sub>normal-hızlı</sub>
Su	<b>1131,3</b>	1555,9	<b>1538,2</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,824
Süt	65,6	59,0	60,8	<b>,025</b>	,252	,629
Ayran	<b>58,3</b>	72,3	<b>77,7</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,221
Kefir	10,8	6,5	6,0	<b>,004</b>	,154	,507
Taze Meyve Suyu	19,3	14,0	15,0	,433	,803	,712
Hazır Meyve Suyu	<b>174,6</b>	16,3	<b>17,9</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,785
Siyah ay	<b>429,1</b>	562,4	<b>595,4</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,182
Bitki ayı	<b>75,2</b>	48,3	<b>59,4</b>	<b>,000</b>	<b>,001</b>	,842
Kahve	<b>77,0</b>	84,7	<b>95,2</b>	<b>,000</b>	<b>,000</b>	,207
Gazlı İçecek	40,0	34,7	32,3	,375	,350	,768
Maden suyu	<b>33,1</b>	39,5	<b>40,0</b>	<b>,000</b>	<b>,005</b>	,717
Enerji İeeği	<b>3,1</b>	1,2	<b>0,2</b>	<b>,012</b>	<b>,001</b>	<b>,031</b>
Alkollü İçecek	<b>1,6</b>	3,2	<b>5,2</b>	<b>,001</b>	<b>,033</b>	,464

Kolon geçiş hızı ile kahve tüketimi arasında pozitif yönlü ( $p<0.05$ ) korelasyon olduğu (Tablo 1) ve kolon geçiş zamanı hızlı olanlarda kahve tüketiminin yavaş olanlardan anlamlı Şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 2). Kahvenin kolonik motiliteyi artırıcı etkisi gastrin salınımını artırmasıyla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, kahveye olan kolonik yanıtın bileşiminde bulunan ve opioid reseptörlere bağlanan eksorfinlerden kaynakladığı belirtilmiştir (Brown, Cann, & Read, 1990). Hem beyindeki hem de bağırsak duvarı içindeki opioid reseptörleri, kolonik hareketlilik üzerinde önemli etkilere aracılık etmektedir Yapılan başka bir çalışmada da bu çalışmaya benzer Şekilde kahve tüketimi kolonun motor aktivitesini uyarıcı etki göstermiştir (Brown et al., 1990).

Bu çalışmada ayrıca kolon geçiş hızı ile su ve maden suyu tüketimi arasında pozitif yönlü ( $p<0.05$ ) korelasyon olduğu ve kolon geçiş zamanı hızlı olanlarda su ve maden suyu tüketiminin yavaş olanlardan anlamlı Şekilde yüksek olduğu saptanmıştır. Maden suyunda bulunan magnezyum sülfat gibi magnezyum tuzlarının, ozmotik etkilerinden dolayı intestinal geçiş süresini hızlandırdığı ve daha iyi dışkı tutarlılığı sağladığı belirtilmektedir (Bothe, Coh, & Auinger, 2017). Ratlarda yapılan başka bir çalışmada, magnezyum sülfatın nitrik oksit sentazının uyarılması yoluyla nitrik oksidin salınımını artırarak gastrointestinal motiliteyi artırabileceği grlmştir (Izzo, Gaginella, Mascolo, & Capasso, 1994). Japon kadınları ile ilgili kesitsel bir çalışmada, magnezyum ve sıvı alımının azalmasıyla, fonksiyonel kabızlığın prevalansının arttığı grlmştir (Murakami et al., 2006). Başka bir çalışmada ise magnezyum sülfat ve sodyum sülfat bakımından zengin bir doğal mineralli suyun düzenli olarak tüketimi, fonksiyonel konstipasyonu olan bireylerde barsak motilitesini ve dışkı tutarlılığını anlamlı Şekilde artırmıştır (Bothe et al., 2017).

Hazır meyve suyu, bitki ayı ve enerji ieeği tüketimi ile kolon geçiş hızı arasında negatif yönlü bir korelasyon olduğu ve kolon geçiş zamanı yavaş olanların hazır meyve suyu, bitki ayı ve enerji ieeği tüketim miktarlarının hızlı olanlardan anlamlı Şekilde fazla olduğu grlmştir ( $p<0.05$ ). Ayrıca kolon geçiş zamanı hızlı olanların alkollü içecek tüketim miktarlarının yavaş olanlardan anlamlı Şekilde farklı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

#### 4.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu sonuçlar sıvı alımının kolonik geçiş zamanı ile yakından ilişkili olduğunu ancak her içecek çeşidinin kolonik geçiş zamanı üzerindeki etkisinin farklı olduğunu göstermektedir. Toplam sıvı, su, ayran, siyah çay, kahve ve maden suyu tüketimi konstipasyonlu bireylerin kolon geçiş hızlarını artırıcı; hazır meyve suyu, bitki ayı ve enerji ieeği azaltıcı etki gösterebilir. Alkol tüketiminin kolon geçiş hızını artırıcı etkisi görülmüş olsa da alkolün sağlık üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle böyle bir öneride bulunulamaz. Literartürde bu konu ile ilişkili yapılmış çalışmaların yetersiz olması nedeniyle kesin önerilerin yapılabilmesi için daha fazla çalışma (zellikle randomize kontrollü çalışmalar ) yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Annells, M., & Koch, T. (2003). Constipation and the preached trio: diet, fluid intake, exercise. *International Journal of Nursing Studies*, 40(8), 843–852.
- Anti, M., Lamazza, A., Pignataro, G., Pretaroli, A. R., Armuzzi, A., Pace, V., ... Castelli, A. (1998). Water supplementation enhances the effect of high-fiber diet on stool frequency and laxative consumption in adult patients with functional constipation. *Hepatogastroenterology*, 45, 727–732.
- Bengi, G., Yalçın, M., & Akpınar, H. (2014). Kronik konstipasyona güncel yaklaşım. *Güncel Gastroenteroloji*, 18(2), 181–197.
- Bohlin, J., Dahlin, E., Dreja, J., Roth, B., Ekberg, O., & Ohlsson, B. (2018). Longer colonic transit time is associated with laxative and drug use, lifestyle factors, and symptoms of constipation. *Acta Radiologica Open*, 7(10), 2058460118807232.
- Bothe, G., Coh, A., & Auinger, A. (2017). Efficacy and safety of a natural mineral water rich in magnesium and sulphate for bowel function: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *European Journal of Nutrition*, 56(2), 491–499.
- Brown, S. R., Cann, P. A., & Read, N. W. (1990). Effect of coffee on distal colon function. *Gut*, 31(4), 450–453.
- Cho, K. O., Jo, Y. J., Song, B. K., Oh, J. W., & Kim, Y. S. (2013). Colon transit time according to physical activity and characteristics in South Korean adults. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(4), 550.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, 93(6), 783–786. <https://doi.org/DOI:10.1079/BJN20051428>
- Izzo, A. A., Gaginella, T. S., Mascolo, N., & Capasso, F. (1994). Nitric oxide as a mediator of the laxative action of magnesium sulphate. *British Journal of Pharmacology*, 113(1), 228–232.
- Jung, H.-K., Kim, D.-Y., & Moon, I.-H. (2003). Effects of gender and menstrual cycle on colonic transit time in healthy subjects. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 18(3), 181–186. <https://doi.org/10.3904/kjim.2003.18.3.181>
- Lewis, S. J., & Heaton, K. W. (1997). Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(9), 920–924.
- Miller, L. E., Ouwehand, A. C., & Ibarra, A. (2017). Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Gastroenterology*, 30(6), 629.
- Murakami, K., Sasaki, S., Okubo, H., Takahashi, Y., Hosoi, Y., Itabashi, M., & Group, and the F. in D. C. S. I. I. (2006). Association between dietary fiber, water and magnesium intake and functional constipation among young Japanese women. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 61, 616. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602573>
- Ng, T. K. W., Jia, Y. T., Low, Y. O., Yeoh, L. Z. W., & Gan, C. L. (2016). Dietary fibre and total fluid intakes are inversely associated with risk of constipation in Malaysian adolescents, adults and the elderly. *International E-Journal of Science, Medicine and Education*, 10(1), 17–23.
- Song, B. K., Cho, K. O., Jo, Y., Oh, J. W., & Kim, Y. S. (2012). Colon transit time according to physical activity level in adults. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 18(1), 64–69. <https://doi.org/10.5056/jnm.2012.18.1.64>

## **Salvia huberi ve Salvia hypargeia bitki ekstraktlarının deneysel diyabetik sıçanlarda yara dokusunda CTGF, KGF ve GPx gen ekspresyon seviyelerine etkileri**

Yusuf Özay, İbrahim Bozgeyik

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD, Türkiye

### **Özet**

Diyabetlilerin geciken yara iyileşmesinin nedenlerinden biri büyüme faktörlerinin ve antioksidan enzimlerinin yeterince üretilmemesi veya yıkımındaki artıştır. Önemli büyüme faktörlerinden olan Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF) ve Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF) ile antioksidan enzimi Glutasyon Peroksidaz (GPx) yara iyileşmesinde rol oynadığı bilinen moleküllerdir. Çalışmamızda, diyabetik sıçanlara *S. huberi* ve *S. hypargeia* bitki kremlerinin topikal olarak uygulanmasının yara dokusu oksidatif enzim ve CTGF ve KGF büyüme faktörlerinin seviyeleri üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada Wistar cinsi 84 adet erkek (180–240 g) sıçanlar kullanılmıştır. *S. huberi* ve *S. hypargeia* bitki kremlerinin topikal olarak uygulandığı grupların büyüme faktör düzeyleri ile kontrol arasında anlamlı farklar tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ).

Diyabet yapılmış sıçanlarda yara iyileşme sürecinin sağlıklı olduğunun göstergesi olan ve zamana göre farklılık gösteren CTGF ve KGF büyüme faktörlerinin, *S. huberi* ve *S. hypargeia* bitki kremlerinin topikal olarak uygulandığı gruplarda kontrol gruplara kıyasla daha uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** CTGF, KGF GPx, diyabetik yara iyileşmesi

### **Effects of *Salvia huberi* and *Salvia hypargeia* Plant Extracts on CTGF, KGF and GPx Gene Expression Levels in Wound Tissue of Experimental Diabetic Rats**

### **Abstract**

One of the reasons for delayed wound healing in diabetics is the inadequate production or destruction of growth factors and antioxidant enzymes. Important growth factors, Connective tissue growth factor (CTGF) and Keratinocyte growth factors (KGF), and the antioxidant enzyme (GPx: glutathione peroxidase) are molecules known to play role in wound healing. The aim of this study was to investigate the effects of topical application of *S. huberi* and *S. hypargeia* plant creams on the levels of oxidative enzyme, CTGF and KGF growth factors in diabetic rats depending on time. Healthy male rats of 180-240 g (n:84) were used in the study. Significant differences were found between the levels of control and topically *S. huberi* and *S. hypargeia* plant cream applied group ( $P < 0.05$ ). CTGF and KGF growth factors, which are indicative of the healthy healing process in diabetic rats and differ according to time, were found to be more compatible in topically *S. huberi* and *S. hypargeia* plant creams applied groups compared to control groups.

**Key words:** CTGF, KGF, GPx, diabetic wound healing

### **GİRİŞ**

Diabetes Mellitus (DM), değişik etiyolojilere bağlı ve farklı komplikasyonlara yol açan, heterojen, bir grup karmaşık metabolik bozukluktur (Vincent ve ark., 2004). Diyabetlilerde yara iyileşmesinde metabolik defektler ve mekanik bozukluklar yanısıra, yarada hem anjiyopati, hem de hızlı gelişen aterosklerozise bağlı olarak büyük arter tıkanmaları görülür. Bunun yanı sıra diyabetik nöropatiye bağlı duyu bozuklukları dolayısıyla, yaraya sürekli olarak mekanik bir travma söz konusudur. Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmasının yanı sıra artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette aşırı serbest radikal üretimi lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, genetik mutasyonlara ve proteinlerde yapısal veya işlevsel değişikliklere neden olmaktadır. Diyabetlilerde meydana gelen komplikasyonlar ve metabolik süreçler yara iyileşmesinin gecikme nedenlerindedir (Vincent ve ark., 2004; Memişoğulları, R., 2005).

Büyüme faktörleri hücre içi ve hücreler arası sinyal trafiğinde rol oynayan ve düzenleyen proteinlerdir. Bu proteinler hücrelerin kontrollü olarak büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ederek ve yöneterek

derinin fonksiyonlarını sağlıklı şekilde devam ettirmeyi sağlarlar. Büyüme faktörlerinin hormonlardan farkı sadece lokal olarak salgılandıkları hücreler ve çevre hücrelerde etki gösteriyor olmalarıdır.. Büyüme faktörleri derinin epidermal ve dermal bileşenlerindeki fibroblastlar, keratinositler, mast hücreleri ve melanositler dahil birçok hücre grubu tarafından üretilirler. Aslen hematopoetik sistemin hücreleri olan ancak geçici olarak deride bulunan lenfosit ve makrofajlar da büyüme faktörleri üretirler. büyüme faktörleri doku hasarı ardından gelişen inflamasyon, doku tamiri ve rejenerasyonda önemli role sahiptir. Büyüme faktörleri, hücreler arası iletişimi sağlayan gerçek yara hormonlarıdır( Sundaram H, ve ark.,2009).

Bu araştırma, diyabet yapılmış sıçanların sırtlarında meydana getirilen eksizyon deri yaralanmaları üzerine *S. huberi* ve *S. hypargeia* bitki kremlerinin ACTB, GPX1, CTGF ve KGF genlerinin ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesi amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Deneyleerde (3-4 aylık) Wistar cinsi erkek (180–240 g) sıçanlar kullanılmıştır(Mersin Üniversitesi etik kuruldan izin alınarak yapılmıştır). Sıçanlarda diyabet, tek doz STZ'nin (45mg/kg) serum fizyolojik içerisinde çözüldükten sonra intraperitoneal olarak sıçanlara enjeksiyonu ile yapıldı ve STZ uygulandıktan 72 saat sonra sıçanın kuyruk veninden kan alınır; glukometre ile açlık kan glikoz seviyeleri ölçüldükten sonra kan glikoz seviyeleri 300mg/dl'nin üzerinde olan sıçanlar deneye kabul edilmiştir. Deney grupları insizyon ve eksizyon diyabetik yara yapılmış sıçanların rastgele seçilerek ve kafeslere tek tek konularak oluşturulmuştur. Deneysel hayvanlara 7 ve 14 gün süren bitki extractlarından(*Salvia huberi* ve *Salvia hypargeia*) oluşan merhem uygulanması yapılmıştır.

### Gen Ekspresyon Analizleri

ACTB, GPX1, CTGF ve KGF genlerinin ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesi amacıyla öncelikle dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonları Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit kullanılmıştır ve üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre izolasyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri daha sonraki işlemlere kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. RNA'lar daha sonra RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak üretici firmanın tavsiye ettiği protokollere göre cDNA'ya çevrilmiştir. Gen ekspresyon analizleri RealQ Plus 2x Master Mix Green (Ampliqon) gen ekspresyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar Rotor-Gene Q real-time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve üretici firmanın tavsiye ettiği termal şartlar uygulanmıştır.

KGF- Forward GTG GCA GTT GGA ATT GTG GC

Reverse GAA CAT TTC CCC TCC GCT GT

CTGF- Forward ACC TGT GCC TGC CAT TAC AA

Reverse CTC ACT TCG GTG GGG TGT TT

Beta Actin-Forward CCC GCG AGT ACA ACC TTC T

Reverse CGT CAT CCA TGG CGA ACT

GPX1 Forward GCT CAC CCG CTC TTT ACC TT

Reverse GAT GTC GAT GGT GCG AAA GC

### İstatistiksel analizler

İstatistik incelemede, SPSS for Windows istatistik paket programının 15.0 versiyonu kullanıldı.

Rakamsal değerler, ortalama (X) ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı.

## BULGULAR

Deri dokularından alınan parçalardan yapılan gen ekspresyonu sonuçları tablo 1 de sunulmuştur. Tablo 1 incelendiğinde 7. Gün ve 14. Gün GPX gen ekspresyon sonuçlarında en yüksek oranın kontrol grubuna ait iken en düşük ekspresyon ise *S. hypergeia* grubunun %0.5 lik uygulamasının 14. gününe ait olduğu tespit edilmiştir. GTGF ekspresyon seviyeleri incelendiğinde *S. hypergeia* grubunun %0.5 lik uygulamasının 7. Günün en yüksek seviyede olduğu tespit edilirken en düşük ekspresyon seviye ise *S. hypergeia* grubunun %0.5 lik uygulamasının 14. gününe ait olduğu tespit edilmiştir. Dokuların KGF gen ekspresyon seviyelerine bakıldığında en düşük ekspresyonun %0.5 lik *S. huberi* ve %1 lik *S. hypergeia* bitki ekstraktlarının 7. Gününe ait gruplarda tespit edilirken en yüksek KGF gen ekspresyonu 14. Gün plasebo grubunda tespit edilmiştir.

Tablo 1: Diyabetik yara dokusunda (7. ve 14. Günlerde alınan)GPX, CTGF, KGF gen ekspresyon sonuçları

	7 Gün	14 gün	7 Gün	14 gün	7 Gün	14 gün
N:14	GPX		CTGF		KGF	
Kontrol	1,060±0,46*	1,49±1,3*	0,45±0,01	0,94±0,59	0,97±1,22	0,008±0,001
Plasebo	0,432±0,10	0,297±0,05	0,36±0,27	0,406±0,33	0,102±0,14	1,03±1,04*
SH%0.5	0,501±0,05	0,985±0,81	0,516±0,9	0,251±0,9*	0,002±0,001*	0,20±0,28
SH%1	0,537±0,07	0,602±0,26	0,276±0,07	0,86±0,88	0,33±0,45	0,006±0,001
SHY%0.5	0,714±0,7	0,231±0,1	0,47±0,27	0,24±0,12*	0,05±0,01*	0,07±0,08
SHY%1	0,329±0,1	0,502±0,22	0,41±0,36	0,758±0,48	0,002±0,001*	0,020±0,02

\*ANOVA analysis was performed. P<0.05.

Ölçümler ortalama ± SD olarak verildi. (Kontrol: Diyabetik Kontrol grubu; plasebo grubu; SH%-0.5-1 (w/w) *S. huberi* uygulama grubu; SHY-0.5: 1% (w/w) *S. hypergeia* uygulama grubu)

## TARTIŞMA

Yara iyileşmesinin tüm fazları büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır (Kaya, E.,2005). Yara iyileşmesi için büyüme faktörleri gerekli düzenleyicilerdir ve iyileşme sürecine etkileri kapsamlı olarak araştırılmaktadır (Cox, D. A, ve ark., 1992; Gope, R.,2002; Muangman, P., 2004; Dogan, S. ve ark., 2009).

Oksidatif stres varlığında antioksidan GPx enzim aktivitelerinin arttığı bilinmektedir (Mate's JM. 2000). Steiling ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları yara iyileşmesi çalışmasında, yara dokusunda oksidatif stresle birlikte GPx seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca iyileşme esnasında artan antioksidan enzim ekspresyonunun iyileşme esnasında artan oksidatif strese uyum amacıyla arttığı değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışma ile benzerlik göstermiştir olup yara iyileşmesi süreci geciken ve uzayan kontrol grubunda GPx ekspresyon seviyesi diğer gruplara kıyasla daha yüksek derecede ekspre olmaya devam etmiştir. (Steiling H, ve ark., 1999)

KGF epitilazasyonun gerçekleşmesi için gerekli bir büyüme faktörüdür ve keratinositlerin göçünü ve proliferasyonunu artırır. (Li, J., ve ark 2007). Yapılan çalışmalar yaralanma sürecinin ilk 24 saatin sonunda KGF seviyesi en yüksek seviyeye ulaşır daha sonra azalmaya başlar sonra tekrar 15. Günden itibaren artmaya başladığı rapor edilmiştir (Werner, S., ve ark. 1994; Komi-Kuramochi, A., ve ark., 2005). Bizim çalışmada göstermiştir ki KGF ekspresyon seviyesi kontrol grubunda 7. Günde yüksek seviyeye ulaşmış iken *Salvia* uygulama grupların da bu seviyenin azaldığıdır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, *Salvia huberi* ve *Salvia hypergeia* bitki merhemi uygulanan gruplarda ekspresyon seviyelerinin yara iyileşme süreçlerine uygun şekilde GPX1, CTGF ve KGF genlerinin ekspre olmasına katkı sağlandığı görülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Cox, D. A., Kunz, S., Cerletti, N., McMaster, G. K., Burk, R. R., 1992. Wound healing in aged animals-- effects of locally applied transforming growth factor beta 2 in different model systems, *Exs*, 61:287-295.
- Dogan, S., Demirer, S., Kepenekci, I., Erkek, B., Kiziltay, A., Hasirci, N., Müftüoğlu, S., Nazikoglu, A., Renda, N., Dincer, U., D., Elhan, A., Kuterdem, E., 2009. Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Int Wound J*, 6(2): 107-115.
- Gope, R., 2002. The effect of epidermal growth factor & platelet-derived growth factors on wound healing process. *Indian J. Med. Res.*, 116:201-206 .
- Kaya, E., 2005. Yara iyileşmesi, *Travma* 1.baskı. Ertekin, C., Taviloğlu, K., Güloğlu, R., Kurtoğlu, M., İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 488- 501.
- Vincent, A. M., Russell, J.W., Low, P., Feldman, E. L., 2004 Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25: 612-628 .



- Komi-Kuramochi, A., Kawano, M., Oda, Y., Asada, M., Suzuki, M., Oki, J., Imamura, T. 2005. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during fullthickness skin wound healing in young and aged mice, *J Endocrinol*, 186(2): 273- 286.
- Li, J., Chen, J., Kirsner, P. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, 25, 9-18.
- Mate's JM. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*; 153: 83-104.
- Memişoğulları, R., 2005. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi", *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
- Muangman, P., Muffley, L. A., Anthony, J. P., Spenny, M. L., Underwood, R. A., Olerud, J. E., Gibran, N. S., 2004. Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice", *Wound Repair Regen*, 12(1): 44-52.
- Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. 1999. Different types of ROS-Scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, 247: 484-494.
- Sundaram H, Mehta RC, Norine JA, Kircik L, Cook-Bolden FE, Atkin DH, et al. 2009. Topically applied physiologically balanced growth factors: a new paradigm of skin rejuvenation. *J Drugs Dermatol* 8(5 Suppl Skin Rejuvenation):4- 13.
- Werner, S., Breeden, M., Hübner, G., Greenhalgh, D. G., Longaker, M. T. 1994. Induction of keratinocyte growth factor is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Invest Dermatol*, 103(4): 469– 472.

## Ferro glukonat'ın sitotoksik etkisinin *Allium cepa* testi ile belirlenmesi

Nergis Kaya

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biga Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Teknolojisi Programı, Çanakkale, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: nergiskaya@comu.edu.tr

### Özet

Araştırmamda, olgun siyah zeytinde depolama sırasındaki renk bozulmalarını önlemek için siyah rengin korunmasında kullanılan bir gıda katkı maddesi olan ferro glukonat (E579) ve bitkisel materyal olarak *Allium cepa* L. kullanılmıştır. *A. cepa* kök uçları, farklı konsantrasyonlardaki ferro glukonat çözeltileri (0.016, 0.02, 0.028, 0.032, 0.04, 0.048, 0.06, 0.068, 0.075, 0.85 g/l) ile belirli bir süre muamele edilmiştir. Bu konsantrasyonların kök ucu uzamasına etkisi değerlendirilmiştir, *A. cepa* kök ucu uzunlukları ölçülmüştür. Bu ölçüm sayesinde, kontrolle karşılaştırıldığında kök uzamasını %50 azaltan konsantrasyon olan EC<sub>50</sub> (etkili konsantrasyon) değeri 0.068 g/l olarak belirlenmiştir. Ardından yeniden oluşturulan test sisteminde *A. cepa* L. kök uçları EC<sub>50</sub>/2 (0.034 g/l), EC<sub>50</sub> (0.068 g/l), 2XEC<sub>50</sub> (0.136 g/l) dozları ile 24, 48, 72 saat süresince muamele edilmiştir. Belirlenen sürelerin sonunda kök uçları kesilerek mitotik preparat hazırlama yöntemine göre ışık mikroskopunda gözlem için hazırlanmıştır. Işık mikroskopundaki incelemelerde her lamda kontrol ve muamele grupları için en az 1000'er hücre sayılmıştır. Kontrol gruplarında da, her bir muamele süresi ve doz kombinasyonu için de en az 5000 hücre sayımı yapılmıştır. İnterfaz, profaz, metafaz, anafaz ve telofazdaki hücreler ışık mikroskobu ile 1000X objektifte gözlenerek kök uçları değerlendirilmiştir. Sitotoksisite, mitotik indeks (MI) belirlenerek değerlendirilmiştir. MI=Bölünen hücre sayısı/Toplam hücre sayısıX100 formülü ile hesaplanmıştır. Sitotoksisite üzerine zaman ve doz'un birlikte etkisini incelemek amacıyla tekrarlanan ölçümlü ANOVA'dan yararlanılmıştır ve TUKEY çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Dozlar arasındaki farklılık muamele süresine göre değişmektedir. Mitotik indeks bakımından, tüm muamele sürelerinin sonunda kontrol dozlarının ortalaması EC<sub>50</sub>/2, EC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>X2 dozlarından önemli derecede yüksek olduğu ve doz artışıyla birlikte azaldığı belirlenmiştir. EC<sub>50</sub>X2 dozunun 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucunda, istatistiki bakımdan muamele süresi artışına bağlı olarak mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında ferro glukonatın *A. cepa* kök uçlarında mitoz bölünmeyi azalttığı saptanmıştır. Bu şekilde ferro glukonatın sitotoksik etkisinin bulunduğu; muamele süresine ve doz artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı ve mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Allium cepa* testi, ferro glukonat, sitotoksisite

### Abstract

In my research, it was used *Allium cepa* L as plant material and ferrous gluconate (E579) which is a food additive used to preserve black color to prevent color degradation during storage in mature black olives. *A. cepa* roots were treated with ferrous gluconate of different concentrations (0.016, 0.02, 0.028, 0.032, 0.04, 0.048, 0.06, 0.068, 0.075, 0.85 g / l) for a certain period of time. *A. cepa* root lengths were measured. Thanks to this measurement, the EC<sub>50</sub> value was determined as 0.068 g/l. And then, *A. cepa* L. roots were treated with EC<sub>50</sub> / 2 (0.034 g/l), EC<sub>50</sub> (0.068 g/l), 2XEC<sub>50</sub> (0.136 g/l) for 24, 48, 72 hours. At the end of the determined periods, the root ends were cut and prepared for observation in the light microscope. For the control groups, each treatment period and dose combination, at least 5000 cell counts were made. Interphase, prophase, metaphase, anaphase and telophase cells were observed by light microscopy. Mitotic index was used in the determination of cytotoxicity. Mitotic index is calculated by MI = divided cell number / total cell number X 100 formula. In order to examine the effect of time and dose together, repeated measurement ANOVA was used and TUKEY multiple comparison test was used. It was determined that the difference between doses varied according to the treatment duration. In terms of mitotic index, it was stated that mean of control doses at the end of all treatment duration were significantly higher than the EC<sub>50</sub>/2, EC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>X2 doses and decreased with the increasing dose. After 24, 48 and 72 hours treatment of EC<sub>50</sub>X2 dose, it was determined that mitotic index decreased statistically due to increase in treatment

duration. Compared to the control group, it was found that ferrous gluconate reduced mitotic division at the root tips of *A. cepa*. In this way, it was established that ferrous gluconate can be cytotoxic. In addition this, In this way, it was determined that the cytotoxic effect of ferrous gluconate increased and mitotic index decreased due to increasing of treatment duration and dose.

**Keywords:** Allium cepa test, ferrous gluconate, cytotoxicity

## GİRİŞ

İnsanlar yüzyıllardır yiyeceklerin ömrünü uzatmak için besinleri işlemektedirler (Türkoğlu, 2009). Gıdanın üretildiği yerden tüketileceği çok uzak yerlere kadar bozulmadan ulaştırılabilmesi ancak katkı maddelerinin kullanımı ile mümkün olabilmektedir (Altuğ, 2001). 20. yüzyılda gıda üretiminin artması ile katkı maddelerinin kullanımında da önemli artışlar gözlenmiştir (Altuğ, 2001). Her yıl artan dünya nüfusu karşısında yeni yiyecek kaynakları bulmak ve bunları bozulmadan uzun bir süre korumak gerekmektedir (Rencüzoğulları ve ark., 2001; Kayraldız ve Topaktaş, 2007). Gıda katkı maddeleri, çeşitli amaçlar için kullanılan kimyasal madde grupları içerisinde en çok dikkati çeken gruptur. Bu maddeler genel anlamda “gıdaların özelliklerini istenilen biçimde etkilemek amacıyla kullanılan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler arasında görünüm, lezzet, doku, besleyici değer ve depolama ömrü sayılabilir [Altuğ ve ark., 2000]. Gıda katkı maddeleri; yiyeceklerin hazırlanması sırasında besinlerin mikrobiyolojik bozulmasını önlemek ve dayanıklılığını arttırmak, tadını, yapısını ya da besleyici değerini koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma amacıyla besinlere eklenmiş maddelerdir (Arslan, 2004). Önceleri bu amaçla doğal katkı maddeleri kullanılmakla birlikte son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile birlikte, üretimi hızlandıran ve maliyeti düşüren yapay katkı maddeleri de kullanılmaya başlanmıştır [Gürsoy, 2001]. Gıda katkı maddeleri gelişigüzel ve tüzük dışı kullanıldığında, tüketiciler arasında alerjik ve toksik reaksiyonların görülmesine neden olabilmektedir (Arslan, 2004). Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek miktarda kullanılsalar bile, bu maddelerin zaman içerisinde vücutta birikerek dokularda tahribata neden olabileceği, dolayısıyla insan sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit edebileceği göz önünde bulundurulması gereken önemli bir konudur. İşte bu risk nedeniyle gıda katkı maddeleri de dâhil olmak üzere çeşitli maddelerin toksik etkileri *in vivo* testlerle araştırılmaktadır. Siyah zeytinin elde edilen yüzey rengi kalıcı değildir, oksidasyondan sonra ve paketlenmiş ürünün ömrü boyunca aşamalı olarak kaybolur. Bu bozulmayı önlemek için demir tuzları (ferro glukonat, ferro sülfat, ferro laktat) kullanılmaktadır (Cruess, 1962). Bunlardan ferro glukonat suda iyi çözünen bir gıda katkı maddesidir (Hurrell, 1997). Ferro glukonat (E579) gıda katkı maddesi, demir ve glukozdan oluşur. Bu gıda katkı maddesi olgun siyah zeytinde depolama sırasındaki renk bozulmalarını önlemek için koyulaştırma adımından sonra siyah rengin korunmasında kullanılmaktadır (Garcia ve ark., 1986; Anonymous, 1995). Çevresel kirleticilerin ve farklı kimyasal maddelerin neden olduğu muhtemel toksisitenin değerlendirilmesinde bitki test sistemleri yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak bitki köklerinin meristematik yapısı nedeniyle sitotoksitenin belirlenmesi için uygundur (Fiskeşjö, 1985; Ma ve ark., 1996). Yüksek bitkiler hayvanlarla karşılaştırıldığında çevresel maddelerin sitotoksitesinin tespit edilmesinde analizlerinin basit olması, hassas olmaları ve kolay elde edilebilir olmaları, güvenilir, düşük maliyetli olmaları (Grant, 1992; Özkara ve ark., 2014) ve en önemlisi diğer test sistemleriyle iyi korelasyon gösterdiği için (Fiskeşjö, 1985) kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerle yapılan testler yüksek duyarlılığa sahiptir (Grant, 1978). Allium cepa testi, birçok araştırmacı tarafından çevresel kirliliğin biyoindikatörü olarak kullanılmaktadır (Bagatini ve ark., 2009; Leme ve Marin-Morales, 2009). Allium cepa testi, sitotoksitesi araştırılan madde ile doğrudan etkileşim içinde büyüyen ve ökaryotların DNA'sında muhtemel hasar oluşmasını öngörebilecek *in vivo* bir model olduğu için önemlidir. Bu nedenle, veriler tüm hayvan ve bitki biyoçeşitliliği için doğru şekilde değerlendirilebilmektedir. Numunenin bir hücre döngüsü üzerindeki toksik etkileri ve değişimleri tanımlanmaya çalışılarak sabit mitotik bölünme fazında kalması gereklidir ve Allium cepa testi bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (Tedesco ve Laughinghouse, 2012). Allium cepa test sistemi diğer test sistemleri ile karşılaştırıldığında memelilerin testleri ile yüksek duyarlılık ve iyi korelasyon göstermektedir, alglerin ve insan lenfositlerinin test sistemleri ile aynı duyarlılığı olduğu belirtilmektedir (Fiskeşjö, 1985). Allium testi kimyasallar, kirleticiler ve kontaminantlar için hızlı bir tarama prosedürü olup bitki test sistemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan güvenilir bir test sistemidir. Allium testinde gözlenebilen makroskobik ve mikroskobik etkiler arasında iyi bir korelasyon vardır (Amer ve Ali, 1974). Allium testi kimyasallar, kirleticiler ve kontaminantlar için hızlı bir tarama prosedürü olup bitki test sistemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan güvenilir bir test sistemidir. Allium testinde gözlenebilen makroskobik ve mikroskobik etkiler arasında iyi bir korelasyon vardır. Allium testi kimyasallar, kirleticiler ve kontaminantlar için hızlı bir tarama prosedürü olup bitki test sistemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan güvenilir bir test sistemidir. Mitotik indeks (MI) yaşayan tüm organizmalar için sitotoksitenin belirlenebilmesi için bir ölçüt olarak kabul

edilmektedir (Amer and Aly, 1992). Sitotoksik seviye mitotik indeks oranındaki değişmelerle belirlenebilmektedir (Linnainmaa ve ark., 1978; Smaka-Kincl ve ark., 1996). Azalmış mitotik indeks, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir (Gökalp Muranlı, 2006). Mitotik indeks yüzdesi aşağıdaki formülle ifade edilmektedir.

MI (%)=mitoza girmiş hücre sayısı / toplam hücre sayısı ×100

Mitotik indeksi belirlemek için kullanılacak olan konsantrasyonların seçiminde öncelikle kontrole göre kök uzunluğunun %50 azalmasına neden olan konsantrasyon (EC<sub>50</sub>) değeri belirlenmelidir. (Chauhan ve ark., 1999; Seth ve ark., 2007). Mitotik indeks belirleme çalışmalarında genellikle en yaygın kullanılan bitki *Allium cepa*'dır ve *Allium* testi olarak bilinmektedir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde mitotik indeks (MI) göz önünde bulundurulmaktadır. Sitotoksik maddeler mitoz bölünme üzerindeki etkilerini mikrotübül oluşumunu inhibe ederek gösterirler (Lazareve ve ark.,2003; Amer ve Ali, 1974).

Çeşitli kimyasalların sitotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan test yöntemlerinden *Allium cepa* kök ucu testi oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Tamamlanan araştırmamda, ferro glukonat gıda katkı maddesinin *A. cepa* L. (2n=16) türünün kök ucu hücrelerinin mitoz bölünme döngüsünde meydana getirdiği sitotoksitenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle EC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir. Bu amaçla, *A. cepa* L. kök uçları belirlenen konsantrasyon ve sürede ferro glukonat ile muamele edilerek EC<sub>50</sub> değeri 0,068 g/l olarak belirlenmiştir. Daha sonra ferro glukonat EC<sub>50</sub>/2 (0,034 g/l), EC<sub>50</sub> (0,068 g/l), 2XEC<sub>50</sub> (0,136 g/l) konsantrasyonlarında 24, 48, 72 saat süresince kök uçlarına uygulanmıştır. Sitotoksitenin belirlenmesinde, toplam hücre sayısı ve mitoz bölünmedeki hücre sayısı belirlenerek mitotik indeks hesaplanmıştır. Bilindiği üzere, çeşitli amaçlarla gıdalarda kullanılan gıda katkı maddeleri belirli bir konsantrasyonun üzerinde kullanıldığında canlı organizmalar üzerinde toksik etki oluşturmaktadır. Yapılan literatür taramalarında, herhangi bir bitki ve hayvan test sisteminde ferro glukonatın meydana getirebileceği sitotoksite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu yönü ile tamamlanan araştırmamın özgün nitelikte olduğu düşünülmektedir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Araştırmamda bitki materyali olarak *Allium cepa* L. kullanılmıştır. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan ferro glukonat (E 579) Cesa Kimya San. Tic. Ltd. Şti.'den temin edilmiştir.

### Yöntem

#### EC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi ve Kök Uçlarına Muamele Edilmesi

Öncelikle ferro glukonat gıda katkı maddesinin suda çözünmesiyle hazırlanan farklı konsantrasyonları (0.16, 0.20, 0.30, 0.35, 0.40, 0.50, 0.60, 0.70 g/l) ile *Allium cepa* L. kök uçları muamele edilmiştir. Her konsantrasyon için 5 soğan kullanılmıştır. Kök ucu uzunlukları ölçülmüştür. Bu ölçüm, kontrolle karşılaştırıldığında kök uzamasını %50 azaltan konsantrasyon (Fiskeşjo, 1993) olan EC<sub>50</sub> değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu şekilde EC<sub>50</sub> (etkili konsantrasyon) (0,068 g/l) belirlenmiştir. Daha sonra soğanlar saf su ile doldurulan test tüplerine yerleştirilerek oda sıcaklığında (20±2°C) bırakılmıştır. *Allium cepa* L. kökleri 5 günde 1,5-2 cm'e ulaştığında ferro glukonatın EC<sub>50</sub>/2 (0,034 g/l), EC<sub>50</sub> (0,068 g/l), 2XEC<sub>50</sub> (0,136 g/l) konsantrasyonları ile 24, 48, 72 saat süreyle muamele edilmiştir. Her bir konsantrasyon, muamele süresi ve kontrol grubu için 10 soğan kullanılmıştır.

#### Preparatların Hazırlanması

Kök uçları muamele süresinin sonunda kesilmiştir ve kullanımdan önce taze olarak hazırlanan etanol:glasiyal asetik asit (3:1) içeren farmer fiksatifine konularak karanlıkta +4°C'ye yerleştirilmiştir. Kök uçları saf su ile yıkanmıştır ve Souguir ve ark. (2008) tarafından ifade edildiği şekilde 10 dk., 60 °C'de 1N HCl ile hidrolize edilmiştir. Örnekler %2 asetokarmin (w/v) ile ezme preparat hazırlanarak boyanmıştır. Lamaların hazırlanmasında, her lam için 1 kök ucu kullanılmıştır. Kontrol ve muamele grupları için, her lamda en az 1000'er hücre sayılmıştır. Kontrol ve muamele grupları için, en az 5 lam (en az 5000 hücre) hazırlanmıştır. İnterfaz, profaz, metafaz, anafaz ve telofazdaki hücreler ışık mikroskobu ile 1000X objektifte gözlenerek kök uçları değerlendirilmiştir.

## Sitotoksitenin Belirlenmesi

Sitotoksitenin, mitotik indeks (MI) belirlenerek değerlendirilmiştir.  $MI = \frac{\text{Bölünen hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100$  formülü ile hesaplanmıştır. Mitotik indeks genellikle 100 hücredeki mitoz sayısı olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, ışık mikroskopundaki incelemelerde her lamda kontrol ve muamele grupları için en az 1000'er hücre sayılmıştır. 1000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücreler ve geçirdikleri bölünme evreleri tespit edilerek Mitotik indeksleri (MI) hesaplanmıştır.

## İstatistiksel Analiz

Sitotoksitenin özellikleri üzerine zaman ve doz'un etkisini incelemek amacıyla tekrarlanan ölçümlü ANOVA'dan yararlanılmıştır ve TUKEY testi kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

EC<sub>50/2</sub>, EC<sub>50</sub> ve EC<sub>50X2</sub> dozlarındaki ferro glukonatın 24, 48 ve 72 saat *A. cepa* kök uçlarına uygulanmasından sonra mitotik fazlar (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) verilmiştir. Ayrıca % mitotik indeks ortalamaları ve standard hatalarıyla birlikte verilerek istatistiksel çalışma yapılmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Ferro glukonatın farklı sürelerde ve dozlarda uygulanmasıyla *A. cepa* kök uçlarındaki mitotik fazlar, % mitotik indeks (ortalama±standart hata)

Muamele süresi(saat)	Doz (g/l)	Mitotik fazlar (%)				Mitotik indeks % (ortalama±std. hata)
		Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz	
24	Kontrol	45,86	21,19	17,35	14,12	16,57±1,03Aa
	EC <sub>50/2</sub>	49,59	23,40	12,20	10,02	12,138±0,83Ba
	EC <sub>50</sub>	53,30	22,23	12,45	10,81	9,097±0,139Ca
	EC <sub>50X2</sub>	52,58	26,22	16,28	8,11	8,107±0,346Da
48	Kontrol	39,90	22,20	19,72	17,23	17,051±0,602Aa
	EC <sub>50/2</sub>	47,33	29,14	12,81	10,40	6,474±0,377Bb
	EC <sub>50</sub>	44,90	29,92	14,85	14,51	5,916±0,28Bb
	EC <sub>50X2</sub>	43,14	28,07	16,61	11,86	5,527±0,132Bb
72	Kontrol	46,83	19,64	17,54	16,43	15,876±0,472Aa
	EC <sub>50/2</sub>	44,30	30,11	15,22	11,57	4,9042±0,0676Bb
	EC <sub>50</sub>	49,96	28,65	13,53	13,18	4,469±0,613Bb
	EC <sub>50X2</sub>	26,88	27,64	29,87	15,69	3,325±0,312Bc

Not 1. Aynı sürede farklı büyük harflerle gösterilen dozlar arasındaki farklılık önemlidir.

Not 2. Aynı dozda farklı küçük harflerle gösterilen muamele süreleri arasındaki farklılık önemlidir.

Dozlar arasındaki farklılık muamele süresine göre değişmektedir. Mitotik indeks bakımından, 24, 48 ve 72 saat muamele süresi sonunda kontrol dozlarının ortalaması EC<sub>50/2</sub>, EC<sub>50</sub>, EC<sub>50X2</sub> dozlarından önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ferro glukonat 24 saat uygulandığında, kontrol grubunda mitotik indeksin en fazla olduğu ve doz artışıyla birlikte azaldığı belirlenmiştir. 48 ve 72 saat uygulandığında ise, kontrol grubunda mitotik indeksin en yüksek olduğu saptanmıştır fakat diğer dozlar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Mitotik indeks bakımından ortalamalar EC<sub>50</sub>, EC<sub>50X2</sub> dozlarında en düşük olarak bulunmuştur. EC<sub>50/2</sub> ve EC<sub>50</sub> dozlarının 24 saat muamelesi sonucunda mitotik indeksin istatistiksel olarak 48 ve 72 saat muameleye göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. EC<sub>50/2</sub> ve EC<sub>50</sub> dozlarının 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda muamele süresi artışına bağlı olarak mitotik indekste istatistiksel olarak önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. EC<sub>50X2</sub> dozunun 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucunda, istatistiki bakımdan muamele süresi artışına bağlı olarak mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir. Bu şekilde ferro glukonatın sitotoksik etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Muamele süresine ve doz artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı, mitotik indeksin ise muamele süresi ve doz artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında ferro glukonatın *A. cepa* kök uçlarında mitoz bölünmeyi azalttığı saptanmıştır (Tablo 1).

Kumar ve Singh (2017), orange G ve brilliant blue gıda katkı maddeleri ile kök uçlarını muamele ettiğinde; Oliveira ve ark. (2017) sodyum sakkarin ve sodyum siklamat tatlandırıcılarının kök ucu hücrelerinde muamele süresine (48,72, 168 saat) bağlı olarak; Nunes ve ark. (2017) ise sentetik tatlandırıcılardan passion fruit ve vanilyanın; Lerda (2017), tartrazin kök ucu hücrelerinde uygulanan konsantrasyon ve artan uygulama süresine bağlı olarak mitotik indeksi azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Böylece belirtilen gıda katkı maddelerinin sitotoksik etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Sales ve ark. (2016), 2 yapay sentetik gıda tatlandırıcısının (kurabiye ve tutti-frutti aroması) dozlarının ve bu tatlandırıcıların kombine edilen dozlarının *A. cepa* kök ucuna uygulandığında kurabiye aromasının ve kombine dozların, sitotoksik olduğu; tutti-frutti aromasının sitotoksik etkisinin bulunmadığı saptanmıştır. Tamamlanan araştırmamda ise bu ferro glukonatın sitotoksik etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Moura ve ark. (2016), 2 farklı sentetik gıda katkı maddesinin tek ve kombine olarak 24 ve 48 saat süresince uygulandığında hücre bölünme oranlarını düşürdüğü saptanmıştır. Bu nedenle her 2 gıda katkı maddesinin de sitotoksik olduğu tespit edilmiştir. Sunset yellow ve brilliant blue gıda renklendiricilerinin (Kuş ve Eroğlu, 2015), Ponceau 4R gıda boyasının (Marques ve ark., 2015b) sitotoksik etkisinin olduğunu belirlemiştir. Marques ve ark. (2015a), gıda tatlandırıcılarının (Strawberry, Condensed Milk ve Chocolate) 24 ve 48 saat muamele süreleri ile kök uçlarını muamele etmiştir ve bu tatlandırıcıların sitotoksik etkisinin olduğunu belirtmiştir. Sunset yellow azo boyasının (Dwivedi ve Kumar, 2015); benzoat ve borik asit gıda koruyucularının (Kumar ve Pandey, 2015); butile hidroksitoluen, bütillenmiş hidroksianisol, sorbik asit, propil galat ve sodyum nitrat gibi gıda koruyucuları (Pandey ve ark., 2014) ile kök uçları muamele edildiğinde uygulanan doz konsantrasyonu arttıkça mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir. Tartrazin ve sunset yellow'un (Dwivedi ve Kumar, 2017); monosodyum glutamatın (MSG) (Adeyemo ve Farinmade, 2013); sunset yellow, bordeaux, tartrazine yellow gıda boyalarının (Gomes ve Oliveira, 2013); monosodyum glutamat, monopotasyum glutamat, kalsiyum glutamat, monoamonyum glutamat, magnezyum diglutamat tat arttırıcılarının (Türkoğlu, 2013); potasyum metabisülfid ve potasyum nitrat (Gömürgen, 2005) kök ucu hücre bölünmesi üzerinde inhibe edici etkisinin olduğunu ve mitotik indeks değerlerinde azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Bu şekilde bu kimyasalların sitotoksik etkisinin bulunduğu ispatlanmıştır. Türkoğlu (2009), monosodyum fosfat, disodyum fosfat ve trisodyum fosfatın; sodyum propiyonat, kalsiyum propiyonat, potasyum propiyonatın (Türkoğlu, 2008); sodyum benzoat, borik asit, sitrik asit, potasyum sitrat, sodyum sitratın (Türkoğlu, 2007) farklı konsantrasyonlar ve farklı muamele süreleri ile kök uçlarına uygulandığında mitotik indeks değerinin artan konsantrasyon ve artan muamele süresi ile azaldığı bildirilmiştir. Yani sitotoksik etkilerinin olduğu ve böylece bu gıda katkı maddelerinin hücre bölünmesini inhibe edici etkisinin olduğu saptanmıştır. Belirtilen bu çalışmalarla paralel olarak, ferro glukonatın farklı dozlarının farklı sürelerde uygulanmasıyla doz ve muamele süresinin artışına bağlı olarak mitotik indeksin azaldığı belirlenmiştir.

## SONUÇ

Çalışmamın sonucunda ferro glukonat belirli doz ve sürelerin üzerinde maruz edildiğinde canlılarda sitotoksikiteye neden olabileceği saptanmıştır. Bu etkisini mitoz bölünmeyi inhibe ederek göstermektedir. *Allium cepa* testi ile belirlenen sitotoksik etki tüm canlılara genellenebilmektedir. Bu nedenle ferro glukonatın gıdalarda kullanımında belirli doz ve muamele süreleri üzerinde insanlarda toksik etkisinin olabileceğine dikkat edilmelidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince FBA-2018-1443 nolu projeden desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

Adeyemo O.A., Farinmade A.E 2013. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. *African Journal of Biotechnology*, 12 (13), 1459-1466.

Altuğ T., 2001. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım, İzmir, 286 sayfa.

- Altuğ T., Boyacıoğlu D., Kurtcan Ü., Demirağ, K., “Gıda Katkı Maddeleri Analiz Yöntemleri”, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları”, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 1-2 (2000).
- Amer S.M., Ali E.M 1974. Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia*, 39, 633-643, 1974.
- Amer S.M., Aly F.A. 1992. Cytogenetic Effects of Pesticides. IV. Cytogenetic Effects of The Insecticides Gardona and Dursban. *Mutation Research*, 279 (3), 165-170.
- Anonymous. 1995. Code of Federal Regulations. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, Washington, DC.
- Arslan M 2004. Borik Asit’in insan periferal lenfositlerinde in vitro kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1-62.
- Bagatini M.D., Fachinnetto, J.M., Silva, A.C.F. & Tedesco, S.B. 2009. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(2B), 632-636, ISSN: 0102695X
- Chauhan L.K.S., Saxena P.N., Gupta S.K. 1999. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. *Environmental Experimental Botany*, 42, 181–189.
- Cruess W.V. Experiments on color fixation with iron salts, in *41 Annual Technical Report of California Olive Association*, Sacramento, CA, pp. 1-13, 1962.
- Dwivedi H., Kumar G 2017. Genomic distortion induced by food dyes on meristematic cells of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Ajwain). *Chromosome Botany*, 12(3): 46-51.
- Dwivedi K., Kumar G 2015. Genetic Damage Induced by a Food Coloring Dye (Sunset Yellow) on Meristematic Cells of *Brassica campestris* L. *Journal of Environmental and Public Health*, v. 2015, 1-5.
- Fiskesjö G 1993. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. *Environ Toxic Water* 8(3), 291-298.
- Fiskesjö G 1985. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring, *Hereditas*, 102, pp. 99-112.
- Garcia P., Brenes M., Garrido A 1986. Use of ferrous lactate in the elaboration of ripe olives. *Grasas Aceites*, 37:33-38.
- Gomes K.M.S., Oliveira M.V.G.A 2013. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Trazazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Food Sci. Technol.*, Campinas, 33(1): 218-223.
- Gökalp Muranlı F.D 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron’un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Gömürgen A.N 2005. Cytological Effect of the Potassium Metabisulphite and Potassium Nitrate Food Preservative on Root Tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70 (2): 119–128.
- Grant W.F 1978. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. *Environmental Health Perspectives*, 27, 37-43.
- Grant W.F., 1992. Cytogenetics Studies of Agricultural Chemicals in Plants in Genetic Toxicology an Agricultural Perspective. Plenum Press, New York, 335–378.
- Gürsoy, S 2001. Besinlerde Katkı Maddelerinin Kullanımı ve Sitrik Asit Toksikitesi”, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 1-4.
- Hurrell R.F 1997. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 55(6), 210–222.

- Kayraldız A. and Topaktaş M 2007. The in vivo genotoxic effects of sodium metabisulfite in bone marrow cells of rats. *Russian journal of genetics*, 43(8):905- 909.
- Kumar G., Pandey A 2015. Genotoxic and mito-depressive effects of food preservatives on root meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chromosome Botany*, 10: 51-60.
- Kumar G., Singh S 2017. Genotoxic effects of Food Dyes on mitotic chromosomal entity in root meristems of Cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.). *IJCRGG*, 10 (13): 81-89.
- Kuş E., Eroğlu H.E 2015. Genotoxic and cytotoxic effects of Sunset Yellow and Brilliant Blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 28(1):227-30.
- Leme D.M., Marin-Morales M.A 2009. Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research*, 682, 71–81, ISSN 0027-5107.
- Lerda D 2017. The Effects of Tartrazine in *Allium Cepa* L. *J. Food Nutr.*, 3: 101, 1-5.
- Linnainmaa K., Meretoja T., Sorsa M., Vainio H. 1978. Cytogenetic Effects of Styrene and Styrene Oxide. *Mutation Research*, 58: 277–286.
- Ma T.H., Xu C., Liao S., McConnell H., Jeong B.S., Won C.D. 1996. In Situ Monitoring with the Tradescantia Bioassays on the Genotoxicity of Gaseous Emissions from a Closed Landfill Site and an Incinerator. *Mutation Research*, 359:39–52.
- Marques G.S., Silva S.O., 2015b. Cytotoxic and genotoxic potential of liquid synthetic food flavorings evaluated alone and in combination. *Food Sci. Technol*, Campinas, 35 (1): 183-188.
- Marques G.S., Sousa J.J.A., Peron A.P., 2015a. Action of Ponceau 4R (E-124) food dye on root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Acta Scientiarum. Biological Science*, 37 (1): 101-106.
- Mouraa A.G., Santana G.M., Ferreirab P.M.P, Sousaa J.M.C, Peron A.P., 2016. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allim cepa* L root meristems. *Braz. J. Biol.*, 76 (2): 439-443.
- Nunes R. D. M., Sales I. M. S., Silva S. I. O., Sousa J. M. C., Peron A. P., 2017. Antiproliferative and genotoxic effects of nature identical and artificial synthetic food additives of aroma and flavor. *Braz. J. Biol.*, 77 (1): 150-154.
- Oliveira V.A., Oliveira V.M., Oliveira T.W.N., Damasceno A.N.C., Silva C.E.O., Medeiros S.R.A., Soares B.M., Silva F.C.C., Aguiar R.P.S., Islam M.T., MeloCavalcante A.A.C., Peron A.P., Sousa J.M.C 2017. Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of two artificial sweeteners by using eukaryotic test systems. *African Journal of Biotechnology*, 16 (11): 547-551.
- Özkarar, A., Akyıl, D., Eren, Y., Erdoğmuş, S.F 2014. Potential Cytotoxic Effect of Anilofos by Using *Allium cepa* Assay. *Cytotechnology*, 67 (5): 783-91.
- Pandey H., Vikas Kumar V., Roy B.K 2014. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. *Toxicol. Rep.*, 1: 300-308.
- Rencuzogulları E., Kayraldız A., İla H.B., Çakmak T., Topaktaş M 2001. The cytogenetic effects of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L. *Turk J. Biol.*, 25:361-370.
- Sales I.M.S., Oliveira J.D. , Santos F.K.S., Feitoza L.L., Sousa J.M.C., Peron A.P 2016. Toxicity at the cellular level of artificial synthetic flavorings. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 38 (3): 297-303.
- Seth C.S., Chaturvedi P.K., Misra V 2007. Toxic Effect of Arsenate and Cadmium Alone and in Combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in Response to Its Accumulation. *Environmental Toxicology*, 22: 539–549.
- Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M., Toman M.J 1996. The Evaluation of Waste, Surface and Ground Water Quality using the Allium Test Procedure. *Mutation Research*, 368: 171-179.



- Souguir, D., Ferjani, E., Ledoigt, G. and Goupil, P 2008. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma* 233:203-207.
- Tedesco S.B Laughinghouse H.D., 2012. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*, 137-156.
- Türkoğlu Ş 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626 (1-2): 4-14.
- Türkoğlu Ş 2008. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (6): 2035-2041.
- Türkoğlu Ş 2013. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Toxicology and Industrial Health*, 31 (9):792–801.
- Türkoğlu, Ş. 2009. Genotoxic Effects of mono-, di-, and Trisodium Phosphate on Mitotic Activity, DNA Content, and Nuclear Volume in *Allium cepa* L. *Caryologia*, 62 (3): 171–179.

## Balıkesir ili ve çevresinde yetiştirilen *Nerium oleander* ve hibritlerinin DNA barkodlaması yoluyla filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi

Esma GÜL\*, Fatih ALBAYRAK, Taner ÖZCAN

Balıkesir Üniversitesi, Necatibey Eğitim Fakültesi, MFAE, Biyoloji Eğitimi, Balıkesir, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: esmagul1995.eg@gmail.com

### Özet

*Nerium oleander* L. türünün Güneydoğu Asya orijinli olduğu düşünülmekte ve Türkiye’de doğal olarak yayılış göstermektedir. Türkiye’de ismi “zakkum” olarak bilinmektedir. Kendiliğinden yetiştiği yerler genelde kuru dere yataklarıdır. Türkiye’nin Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde sıkça görülmektedir. Bitkinin tamamı zehirli olmakla birlikte içerisindeki etken maddelerden dolayı kanser tedavisinde ilaç olarak ve sinek kovucu olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, Bursa, Balıkesir ve İstanbul illerinde süs bitkisi olarak kullanılan ve 15 farklı bölgeden toplanmış olan bazı *N.oleander* bireylerinden DNA izolasyon kitleri yoluyla DNA’larını elde edip kloroplast genomuna ait *trnL-F* ve *rpl32* dizilerini çoğaltıp karşılaştırmaktır. Çalışma DNA barkodlama yöntemi aşamaları kullanılarak yürütülmüştür. 15 farklı popülasyona ait bu bireylerden petali 5 parçalı olan pembe ve beyaz çiçekli bireyler atasal, gül şeklinde petali olan pembe ve beyaz çiçekli bireyler de meyveleri bulunmaması sebebiyle hibrit olarak kabul edilmiştir. *Rpl32* DNA bölgesi *trnL-F* bölgesine göre daha bilgi verici olmuştur. *Rpl32* bölgesine ait DNA dizileri hizalanıp karmaşık bölgeler kesildikten sonra 920 nükleotit elde edilmiştir ve hibrit bireylere özgü herhangi bir polimorfik bölge bulunamamıştır. Fakat çalışılan tüm bireyler dikkate alındığında, 10 nükleotitlik insersiyon-delesyon bölgesine ve 4 adet tek nükleotitlik değişim bölgeleri bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışma öncesinde farklı çiçek formlarının veya renklerinin gruplar oluşturacağı tahmin edilmesine rağmen, kloroplast genomu verilerine göre bitkilerin çiçek formlarından ziyade çiçek renklerinin akrabalık açısından yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Yakın dikimi yapılmış bireylerin farklı soy hatlarına sahip olduğu ve atasal karakterde olan ağaçların aynı alanda olan hibritlerle yakın ilişkide olmadığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** DNA barkodlama, *trnL-F*, *rpl32*, hibrit, *Nerium oleander*

### Determination of the phylogenetic relationships of *Nerium oleander* (L.) and its hybridscultivating in and aroundBalıkesirprovincebasedon DNA barcoding

### Abstract

*Nerium oleander* L. is considered to be originated from Southeast Asian and species naturally occurring in Turkey. Its name is known as “zakkum” in Turkey. Self-growing areas are generally dry riverbeds. It is frequently observed in Marmara, Aegean and Mediterranean regions of Turkey. Although the whole plant is poisonous, it is used as a drug in the treatment of cancer and as a flyrepellent due to the active ingredients. The aim of this study was to obtain DNAs from some *N.oleander* individuals which were collected from 15 different regions and used as ornamental plants in Bursa, Balıkesir and Istanbul provinces and amplifying and comparing *trnL-F* and *rpl32* sequences of chloroplast genome. The study was carried out using DNA barcoding methods. These individuals belonging to 15 different populations, the petals with 5 pieces of pink and white flowers were accepted as ancestral, and the petals of pink and white flowers with roses structure were accepted as hybrids due to lack of their fruits. The *rpl32* DNA region was more informative than the *trnL-F* region. 920 nucleotides were obtained after the DNA alignment and cutting the ambiguous sequences of the *rpl32* data, and non-specific polymorphic regions belonging to hybrid individuals were found. However, considering all studied individuals, 10 nucleotide insertion-deletion sites and 4 single nucleotide transition sites were found. As a result, although before the study it was predicted that different flower forms or colors would form groups together, according to the chloroplast genome data it was found that the floral colors of specimens were similar rather than flower forms in terms of relationship. It has been seen that the individuals planted closely have different lineages and that the putative ancestral trees are not in close relationship with the hybrids in same area.

**Keywords:** DNA barcoding, *trnL-F*, *rpl32*, hybrid, *Neriumoleander*

## GİRİŞ

Anavatanı Güneydoğu Asya olduğu tahmin edilen *Nerium oleander* L. Çin'den Ortadoğu ve Akdeniz çevrelerine kadar yetiştirilmektedir. Kendiliğinden yetiştiği yerler genelde kuru dere yataklarıdır. Türkiye'de ise Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde sıkça görülmektedir. İklimi uygun bölgelerde parklarda, bahçelerde, yol kenarlarında süs bitkisi olarak bulunmaktadır. (www.azbitki.com). Bitkinin tamamı zehirli olmakla birlikte içerisindeki etken maddelerden dolayı kanser tedavisi ve sinek kovucu olarak kullanılmaktadır.

Morfolojik olarak pembe çiçekli, kışın yapraklarını dökmeyen, 6 metreye kadar boyolanabilen bir ağaççıktır. Çoğunlukla birden fazla gövdelidir. Yaprakları 10-15 cm uzunlukta ve 2-3 cm genişlikte, mızrak biçiminde, derimsi, üst yüzü koyu, alt yüzü ise açık yeşil renktedir (www.agaclar.org).

Bu çalışma ile ilk kez *N.oleander*'in farklı çiçekli formlarının DNA dizilerini karşılaştırmak amaçlanmıştır. Gen Bankası ve diğer literatür yayınları incelendiğinde *N.oleander* daha çok kimyasal açıdan çalışılmıştır. DNA'sının kullanıldığı sınırlı sayıda yayın vardır. Bu yayınlarda da hibrit bireylerden ya da farklı formlardan bahsedilmemektedir. Gen Bankasında yapılan detaylı taramada *N. oleander*'in sadece 1 tane ITS dizisine, 4 dizi trnL-F bölgesine, 2 dizi de psbM-psbD bölgesine ait dizi bulunmuştur. Bu yayınların hiçbirinde farklı formlardan bahsedilmemiştir. Bu açıdan bu çalışma Gen Bankası için de yeni veriler içermiştir.

## MATERYAL VE METOT

### 1.Bitkilerin Toplanması

Balıkesir, Bursa ve İstanbul illerininmümkün olduğunca farklı 15 bölgesinden farklı çiçek formlarındaki bireyler toplanmıştır. Toplanan bireyler silika jel kullanılarak izolasyona kadar nemi alınmak suretiyle muhafaza edilmiştir.

### 2.DNA İzolasyonu

*Nerium oleander*'in15 farklı bölgeden toplanmış örneklerinin DNA izolasyonları için ticaribitki DNA izolasyon kitleri kullanılmıştır. DNA izolasyonları yapılırken üreticinin talimatlarına uyulmuş veya ufak modifikasyonlarla izolasyona devam edilmiştir. Elde edilen tüm 2. elüsyon izolatları % 1'lik agaroz jelde yürütülüp, verdikleri bantlar kontrol edilmiştir.Bu işlemde sonra PZR gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemlerde 2. elüsyon izolatları kullanılmıştır. DNA konsantrasyonları 25 ng/ µl olacak şekilde seyreltmeler hazırlanmıştır. İzolasyon işlemleri ve sonraki işlemler Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

### 3.PZR İşlemleri ve DNA Dizileme

PZR reaksiyonu bileşenlerinin miktarları şu şekilde düzenlenmiştir: ddH<sub>2</sub>O: 13,75 µl, PZR tamponu: 5, 0 µl, Q-solution (Aktivite arttırıcı): 2,5 µl, ileri primer: 0,5 µl, geri primer: 0,5 µl, dNTP: 0,5 µl, Taq Polimeraz: 0,25 µl, kalıp DNA: 2,0 µl. Toplam hacim her tüp için 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 1'de verilen primer setleri bu çalışmada kullanılmış olan iki primer setidir.trnL-F ve rpL-32bölgesi kloroplast genomuna ait bir bölgedir ve seksiyon/altseksiyon bazında ayırım yapılması için oldukça uygun bir bölge olduğu literatür çalışmalarından ve daha önceki çalışmalarımızdan tespit edilmiştir. Bu çalışmada rpL-32 ve trnL-c-trnF-f primer setleri PZR işlemleri için kullanılmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.**PZR'de kullanılması öngörülen primerler ve özellikleri

	Primer	Primer dizisi	Kaynak
1	trnL-c	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	(Taberlet ve ark., 1991)
	trnF-f	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	(Taberlet ve ark., 1991)
2	rpL32-f	5'-CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C-3'	(Shaw ve ark., 2007)
	trnL <sup>(UAG)</sup>	5'-CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3'	(Shaw ve ark., 2007)

Bu çalışmada, PZR programı olarak (Shaw ve ark, 2007) (SHAW07) termal döngü cihazı programı ve tüm PZR işlemleri için Techne Prime termal döngü cihazı kullanılmıştır.

- 80 °C'de 5 dakika (ön denatürasyon)
- 95 °C'de 60 saniye (denatürasyon)
- 50 °C'de 60 saniye (yapışma)
- (Saniyede 0.3 °C atlanarak sıcaklık 65 °C'ye çıkacaktır)
- 65 °C'de 4 dakika (uzama) (Denatürasyon, yapışma ve uzama 30 döngü şeklinde tekrarlanır)
- 65 °C'de 5 dakika (son yapışma)

Uygulanan PZR programından istenilen bantlar elde edilmiştir. PZR reaksiyonundan sonra elde edilen ürünler %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. PZR ürünleri saflaştırılmadan direkt dizilenmesi yoluna gidilmiştir. Dizileme işlemleri hizmet alımı yoluyla yapılmıştır ve PZR örnekleri Türkiye'deki bir DNA dizileme şirketine gönderilmiştir.

#### 4.DNA Dizi Analizinin Değerlendirilmesi

Hizmet alımı ile temin edilen istenilen bölgelere ait DNA dizileri ilk olarak Sequencher programı kullanılarak gözden geçirilmiş ve hatalı dizilenmiş nükleotitler kontrol edilerek düzeltilmiştir. İşlenmiş farklı türlere ait DNA dizileri daha sonra internet tabanlı Clustal W (Thompson ve ark., 1994) programı yardımıyla alt alta getirilerek hizalanmıştır ve bu hizalama sonucunda uç bölgelerden fazlalık olan diziler çıkarılmıştır. MEGA 6.0 (Tamura ve ark., 2013) programı veya bazı internet siteleri vasıtasıyla bu işlenmiş ve hizalanmış diziler nexus formatına çevrilmiştir.

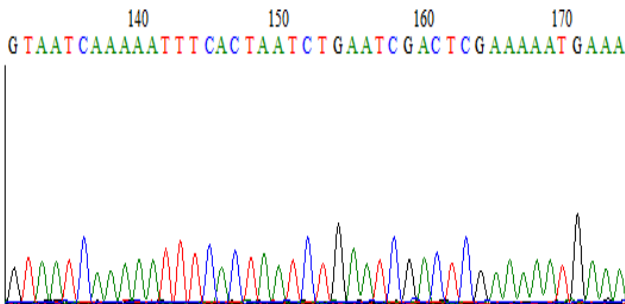
#### 5.Filogenetik Ağaçların Elde Edilmesi

Dizi hizalaması yapıldıktan sonra hizalanan diziler PAUP\* programı (Swofford, 2002) ile incelenmiştir. Ağaç oluşturmada maksimum tutarlılık (MP) metodu kullanılarak konsensus ağaçları oluşturulmuştur. Maksimum tutarlılık ağaçları için karakterlerin hepsi sırasız ve eşit ağırlıklı olarak ayarlanmıştır. Hüristik MP analizleri 1000 replikasyon üzerinden yapılmış ve takson eklenmesi her adımda rastgele olarak seçilip TBR dal atlanması algoritması uygulanmıştır. Bootstrap değerleri TBR dal atlanması ve her adımda basit takson ekleme özellikleri ile birlikte 100'de üzerinden hesaplanmıştır. Ayrıca SplitsTree 4.14 programı kullanılarak Neighbour-Net splits ağacı rpl32 verilerine göre elde edilmiştir (Huson ve Bryant, 2006).

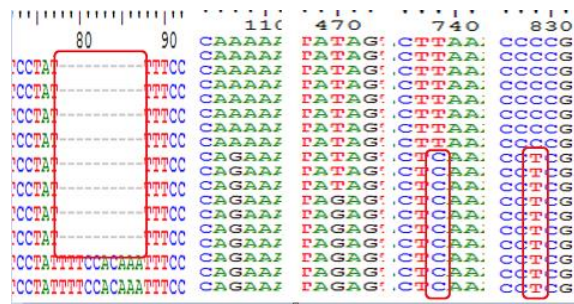
#### BULGULAR VE TARTIŞMA

Dizileme firmasından elimize ulaşan ham DNA dizileri Sequencher programı yardımıyla analiz edilmiştir. Bu analizden sonra Bioedit programı kullanılarak diziler alt alta hizalanmıştır. 5' ve 3' uçlarındaki primer bölgeleri kesilmiştir. Böylelikle Şekil 1b'de verilen anlamlı DNA dizileri elde edilmiştir. Buna göre; 10 nükleotitlik insersiyon-delesyon bölgesi, 4 tane polimorfik bölge tespit edilmiştir.

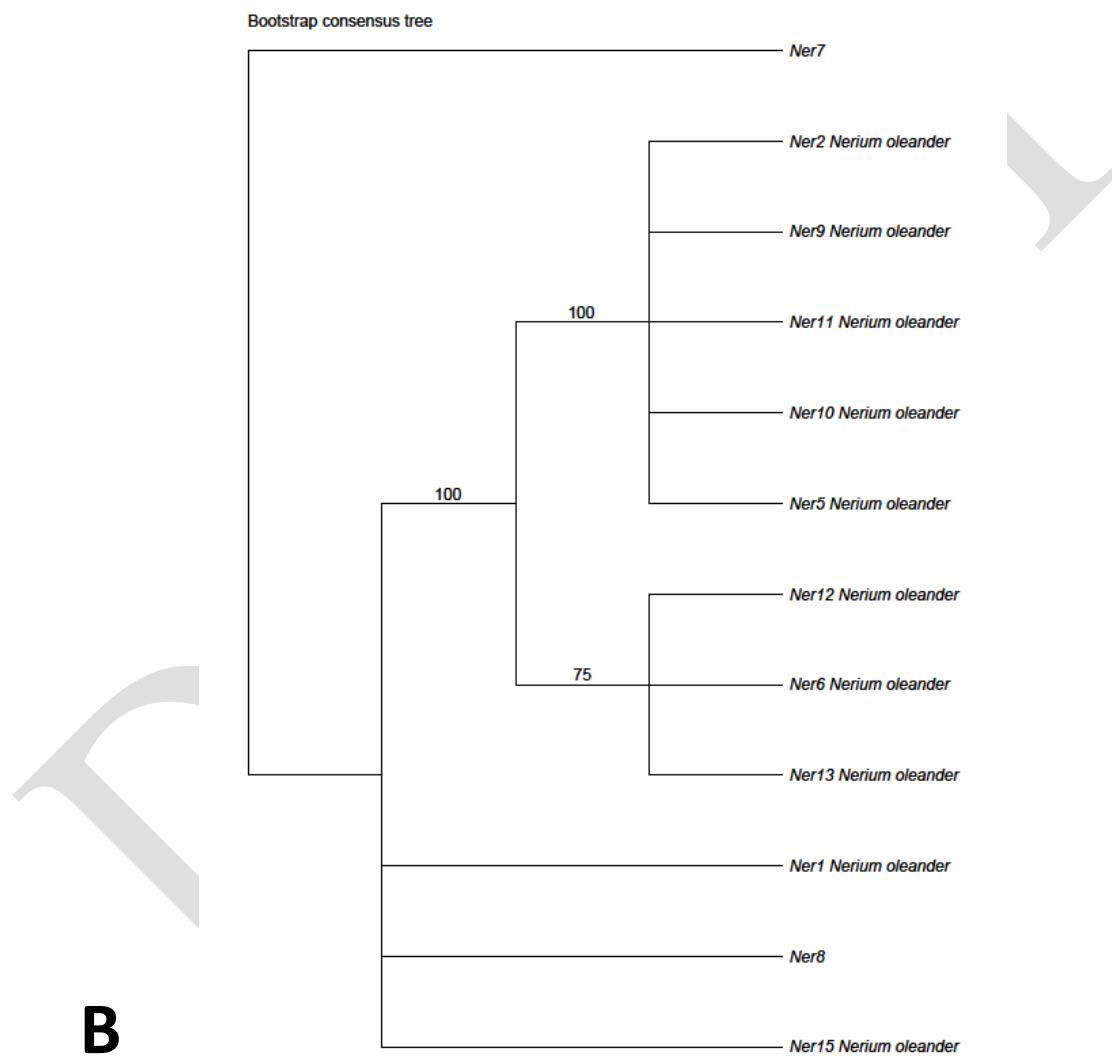
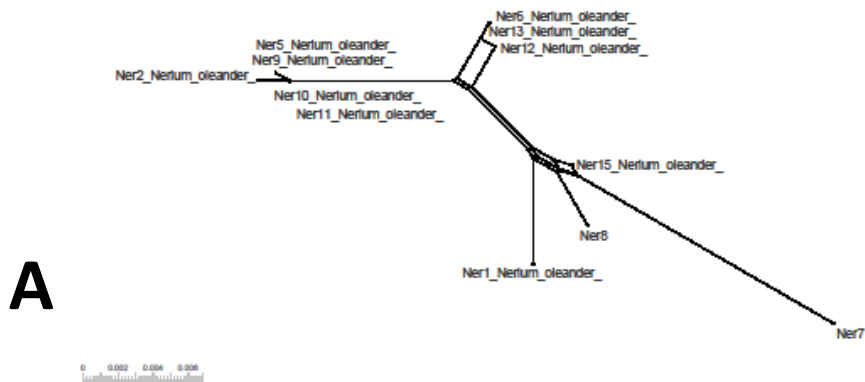
Şekil 1a. DNA Kladogram görüntüsü

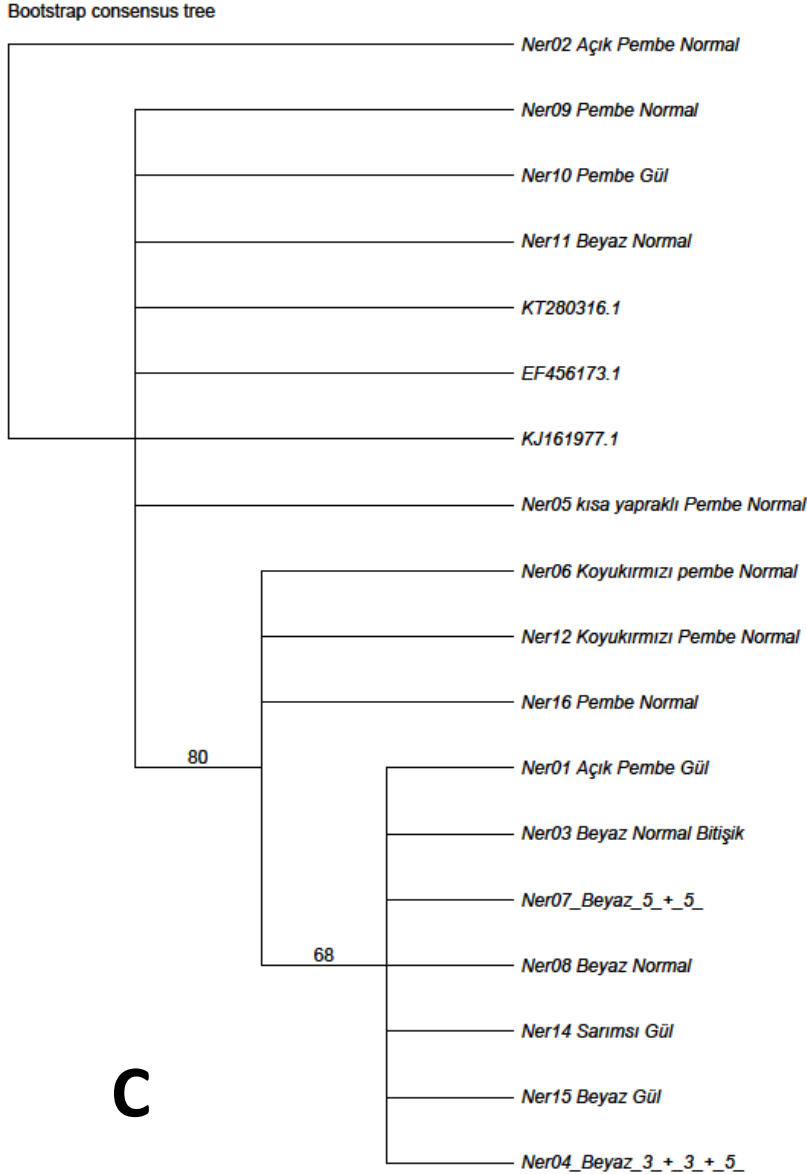


Şekil 1b. Hizalanmış DNA dizileri örneği



Şekil 2. A- rpl32 dizilerine göre oluşturulmuş SplitsTree Neighbour Net Diagramı, B-rpl32 dizilerine göre oluşturulmuş Maximum Parsimony Bootstrap ağacı, C-trmL-F dizilerine göre oluşturulmuş Maximum Parsimony Bootstrap ağacı





C

## SONUÇ

*Nerium oleander*'in *trnL-F* ve *rpl32* DNA dizileri standart boyutlarda diziletilmiştir ve bu DNA dizilerinin kontrolü Gen Bankası'ndaki diğer DNA dizileriyle tutarlılık açısından karşılaştırılmıştır. Projede farklı çiçek formlarının veya renklerinin gruplar oluşturacağı tahmin edilmiştir. Fakat kloroplast genomu verilerine göre; bitkilerin çiçek formlarından ziyade çiçek renklerinin akrabalık açısından yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Yakın dikimi yapılmış ağaçların farklı soy hatlarına sahip olduğu ve atasal karakterde olan ağaçların hibritlerle yakın ilişkide olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla hibritlerle atasal karakterde olup bu çalışmada kullanılan bireylerin muhtemelen farklı kökenlere sahip olduğu söylenebilmektedir.

## TEŞEKKÜR

2209-A kodlu projemizi destekleyen TÜBİTAK'a içtenlikle teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

Huson, D.H. & Bryant, D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254–267.

Shaw, A.E, Reid, S.M., Ebert, K., Hutchings, G.H., Ferris, N.P., King, D.P. 2007. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouthdisease. *J. Virol. Methods*, 143 (2007), pp. 81-85

Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to chosenoncodingregions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *AmericanJournal of Botany* 94: 275–288.

Swofford, D.L. 2002. PAUP\* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and othermethods)SinauerAssociates, Sunderland, Massachusetts.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of threenon-codingregions of chloroplast DNAPlantMol. Biol., 17,pp. 1105-1109

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. MEGA6: MolecularEvolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiplesequencealignmentthroughsequenceweighting, position-specificgappenalties and weightmatrixchoice. *NucleicAcidsRes.*, 22, 4673-4680.

[www.azbitki.com](http://www.azbitki.com)

[www.agaclar.org](http://www.agaclar.org)

## Synthesis and Characterization of 1,4-dilauroylamidanthraquinone as a Novel Phase Change Material for Some Thermal Energy Storage Applications

Derya Kahraman Döğüşcü\*, Cemil Alkan

\*Gaziosmanpaşa University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Tokat, Turkey

\*Corresponding author e-mail: derya.kahraman@gop.edu.tr

### Abstract

This paper deals with the synthesis, characterization, thermal properties and thermal reliability of 1,4-lauroylamidanthraquinone as a novel solid–liquid PCM for thermal energy storage (TES). 1,4-Dilauroyllamidanthraquinone was synthesized by using lauroyl chloride and 1,4-diamino anthraquinone without any catalyst under reflux with toluene at 70 °C. The reaction yield was found above 90%. Synthesized compound was characterized structurally by fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) techniques. Thermophysical properties of the PCM were investigated by using differential scanning calorimetry (DSC) technique. DSC was exploited for determination of phase change temperature, enthalpy, total enthalpy and specific heat (C<sub>p</sub>) values of the PCM. Phase change temperatures and enthalpies were slightly lower than those of pristine fatty acid and DSC analyses pointed out that the phase change temperature for heating period was 41 °C with phase change enthalpy of 51.01 Jg<sup>-1</sup> as it was 35 °C for cooling with phase change enthalpy of -48.8 Jg<sup>-1</sup>. Morphology and thermal endurance limit of the 1,4-dilauroylamidanthraquinone was also investigated using polarised optical microscopy (POM) and thermogravimetric analysis (TGA) techniques respectively. POM revealed a different morphology for the produced material as compared to lauric acid as TGA measurements indicated that 1,4-dilauroylamidanthraquinone degraded in two steps at 221 and 368 °C. The first degradation temperature is quite above from the possible working temperature ranges. Based on the results, it was concluded that the synthesized novel PCM had considerable potential with satisfactory thermal properties, thermal reliability and stability for TES applications.

**Keywords:** lauric acid; thermal energy storage; phase change material

### INTRODUCTION

The continuous increase in fuel prices, population and industrialization and decrease in the level of available energy are the main reasons for the efforts to benefit from available renewable energy sources effectively (Sharma et al., 2009). The energy scientists concentrated mainly in search of new renewable sources, efficient use of available energy source materials, and clean energy (Mao et al., 2018; Tao and He, 2018). Behind the economical and environmentally friendly use of energy materials, energy is conserved most efficiently as thermal energy which can be validated for waste heat recovery, solar heating cooling, thermal comfort, etc. (Lin et al., 2018). Also thermal energy storage (TES) is not only eliminates the problem of variable and intermittent character of renewable energy sources, but also reduce internal temperature fluctuations and increases comfort (Behzadi and Farid, 2014).

Thermal energy can be stored in different forms such as sensible, latent, chemical reaction or combination of them (Zalba et al., 2003). TES materials using phase change materials (PCMs) are the most efficient and useful way to store energy due to little or no volume change in case of phase change and isothermal working (Parameshwaran et al., 2012; Sari et al., 2018; Yuan et al., 2016; Zeinelabdein et al., 2018).

PCMs have very large energy densities compared to sensible heat storage as they had about 5 times lower energy density than chemical reaction energy. However, efficient cost and lower complexity make PCMs more practical than chemical reaction energy (Fernandez et al., 2010; Liu et al., 2016; Pardo et al., 2014). PCMs can be classified to two main groups: inorganic and organic. Despite the superior properties of inorganic PCMs, salt hydrates, such as high melting enthalpy, high thermal conductivity and low price, the handicaps like non-reversible phase transformation, high supercooling behavior, corrosion and phase separation severely restrict their availability in TES systems (Kenisarin and Mahkamov, 2016; Wang et al., 2019). Therefore, organic PCMs with better chemical and thermal resistance are more preferred in TES systems. Lots of organic PCMs have been studied as PCMs Furthermore the attempts for new materials are still popular to have improved



thermal conductivity, specific heat capacity, service life, corrosivity, and flammability prior to use in TES systems (Baetens et al., 2010; Zhou et al., 2012).

Carboxylic esters have been studied hardly due to stability and decreasing corrosion. The chain length increase increased the crystallinity and phase change temperature and enthalpy. Ester based PCMs are generally synthesized from alcohols and carboxylic acids by simple experimental procedures or fatty alcohols and carboxylic acids. Fisher esterification is the most suitable way due to environmentally friendly character. Amides are alternatives serving metal chelating property and solid-solid phase change as ureas (Alkan et al., 2011; Canik and Alkan, 2010; Alkan et al., 2011). In this study, an amide compound was synthesized with a similar method to show the bulky group effect of bridging element.

There is limited information of amides for their thermal properties to be validated as PCMs. The studies in the literature are about the effect of bridging element and side chain length which resulted as similar to fatty esters. In this study, diaminoanthraquinone was reacted to acyl chloride of lauric acid. It was expected that the bulky group will distort the crystallinity drastically and decrease phase change temperatures and enthalpies.

## MATERIALS AND METHODS

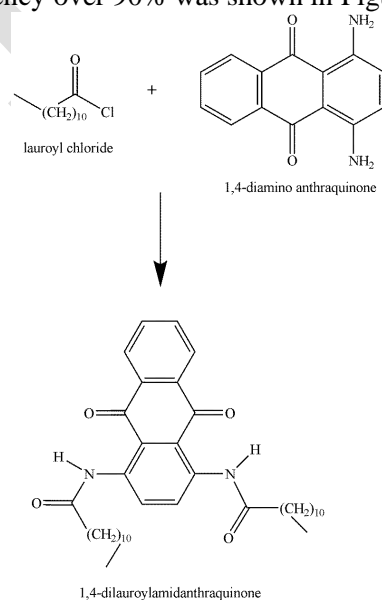
### 1.1. Materials

Lauric acid (Merck), thionyl chloride (Merck,99%), and 1,4-diamidanthraquinone (Aldrich) were used as received for the synthesis of 1,4-dilauroylamidanthraquinone. THF (Merck, 99.8%) and toluene (Carlo Erba, 99.8%) were solvents and used as received too. N,N-dimethyl formamide (DMF) (Merck, 99.8%) was used as a catalyst and used without any further purification.

### 1.2. Synthesis

Synthesis of 1,4-dilauroylamidanthraquinone was performed by condensation reaction of lauroyl chloride and 1,4-diamidanthraquinone without using any catalyst in toluene solvent. Lauroyl chloride was synthesized using lauric acid and thionyl chloride. It was preferred instead of lauric acid due to its exterior reactivity. Lauric acid and thionyl chloride with 2/1 stoichiometric ratio was interacted in tetrahydrofurane solution with DMF as a catalyst at 85 °C for 8 hours in a reflux system. The reaction was continued until the end of hydrogen chloride evolution. Then unreacted thionyl chloride was removed by heating the mixture to 90 °C for 1 hour in fume hood. Produced acyl chloride was characterised with common methods (Alkan et al., 2012).

Stoichiometric quantities of the lauroyl chloride and 1,4-diamidanthraquinone were placed in a synthesis balloon, and the reaction was performed under reflux at 70 °C. The product was precipitated by pouring the reaction mixture into excess methanol. It was filtered and dried at room temperature. A schematic representation of the reaction with efficiency over 90% was shown in Figure 1.



**Figure 1.** The synthetic scheme of the 1,4-dilauroylamidanthraquinone

### 1.3. Characterization

#### Chemical Characterizations

The chemical characterization of novel PCM were performed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy techniques. For the FT-IR analyses, Jasco FT-IR-4700 with ATR accessory was used between 4000 and 400 cm<sup>-1</sup>. The resolution of the spectra and number of scan were adjusted as 4 cm<sup>-1</sup> and 16, respectively. AVANCE III 400 MHz, Bruker model NMR was employed as another structural characterization method. The <sup>1</sup>HNMR analyses were realized using CDCl<sub>3</sub> solvent and tetramethylsilane as an internal reference standard.

#### Thermal Characterizations

Thermal properties such as phase change enthalpy, melting and solidification temperatures, total enthalpy, and specific heat capacity (*C<sub>p</sub>*) of the PCM was analyzed with Netzsch DSC214 Polyma model differential scanning calorimetry (DSC) instrument. The instrument was calibrated with bismuth, indium, zinc, tin, and cesium chloride internal standards for the measurements as with sapphire internal standard for *C<sub>p</sub>* measurements. The DSC measurements were performed at a heating-cooling rate of 5°C min<sup>-1</sup> in temperature range of 0 °C to 100 °C under inert N<sub>2</sub> atmosphere at a flow rate of 60 mL/min. *C<sub>p</sub>* values of fatty acid and the PCM were determined between -20 °C and 100 °C and 5 °C min<sup>-1</sup> heating-cooling rate was applied. Thermal stability, weight loss temperatures and decomposition behavior of the novel PCMs were detected with Setaram TG-DTA/DSC model TGA instrument. The measurements were performed at a scanning rate of 10 °C/min in a static air atmosphere and instrument was calibrated using calcium oxalate standard from 35 to 500 °C.

#### Morphology Analyses

Fatty acid and synthesized PCM were monitored for crystalline morphology investigation with Leica DM EP model polarized optical microscope (POM).

## RESULTS and DISCUSSION

### 2.1. The structural characterization of the novel PCM

The PCM compound was characterized by FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy measurements to confirm the chemical structure of 1,4-dilauroylamidanthraquinone. Figure 2 indicated FT-IR spectra of lauric acid and lauroyl chloride. According to Figure 2; the -OH vibration band of lauric acid which became invisible in the lauroyl chloride spectrum was observed in the range of 3100–3300 cm<sup>-1</sup>. This peak proved that the hydroxyl groups of fatty acid had converted to chloride group. Also the peaks at around 2842-2910 cm<sup>-1</sup> and 2852-2920 cm<sup>-1</sup> were assigned to -CH<sub>2</sub> stretching and bending vibration peaks and the peaks at around 1600 cm<sup>-1</sup> and 1793 cm<sup>-1</sup> were assigned to carbonyl stretching peaks of lauric acid and lauroyl chloride, respectively.

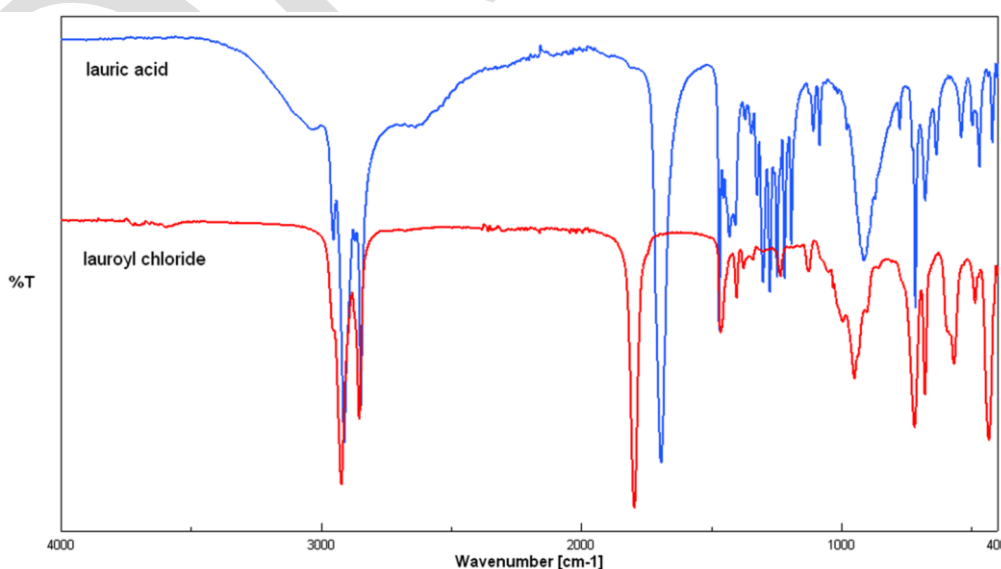
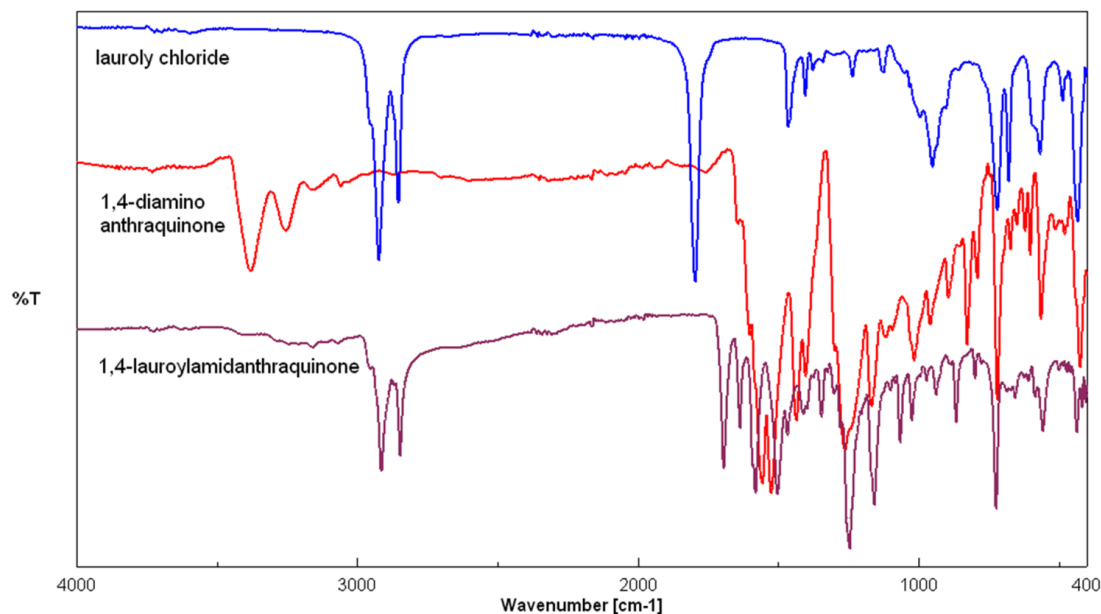


Figure 2. FT-IR spectra of lauric acid and lauroyl chloride

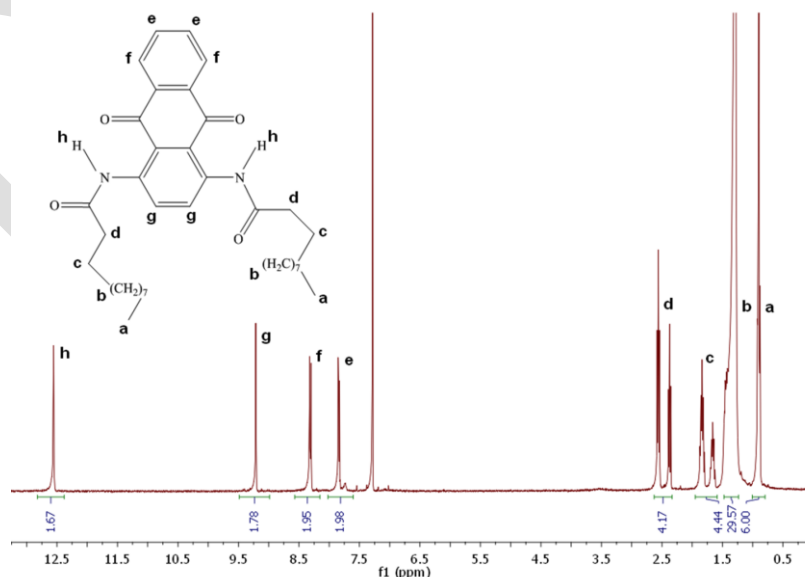
Figure 3 showed FT-IR spectra of precursors and synthesized PCM. The -NH<sub>2</sub> stretching peaks of 1,4-diaminoanthraquinone were seen at 3254 and 3380 cm<sup>-1</sup> and these peaks were not observed after synthesis.

These peaks proved that the primer amine groups of 1,4-diaminoanthraquinone had converted to seconder amine groups, and reaction was completed. The carbonyl stretching peaks of 1,4-diaminoanthraquinone, lauroyl chloride and 1,4-dilauroylamidanthraquinone observed at 1521-1554, 1793 and 1690  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, also  $-\text{CH}_2$  stretching and bending vibration peaks of the lauroyl chloride and 1,4-dilauroylamidanthraquinone were seen at 2852-2920  $\text{cm}^{-1}$  and 2847-2911  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.



**Figure 3.** FT-IR spectra of lauroyl chloride, 1,4-diaminoanthraquinone and, 1,4-dilauroylamidanthraquinone

The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of the novel PCM were given in Figure 4 with synthesized PCM's chemical structure. The presented peaks were assigned to the protons ( $\text{CDCl}_3$ , ppm) of  $-\text{CH}_3$  at about  $\delta=0.9$  (t,  $J=6.7$  Hz, 6H),  $-(\text{CH}_2)_7-$  at about  $\delta=1.40-1.23$  (m, 28H), labeled with c at about  $\delta=1.95-1.59$  (m, 4H), labeled with d at about  $\delta=2.47$  (dt,  $J=74.7, 7.5$  Hz, 4H), labeled with e at about  $\delta=8.02-7.60$  (m, 2H), labeled with f at about  $\delta=8.57-8.15$  (m, 2H), labeled with g at about  $\delta=9.21$  (s, 2H), and labeled with h at about  $\delta=12.56$  (s, 2H) for 1,4-dilauroylamidanthraquinone.



**Figure 4.**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of 1,4-dilauroylamidanthraquinone

## 2.2. Thermal characterization of the novel PCM

DSC thermogram of the pure lauric acid and the novel PCM were given in Figure 5 and the data from DSC measurements were tabulated in Table 1. As shown in Figure 5, lauric acid melted and crystallized at 42  $^{\circ}\text{C}$

without supercooling behavior. The enthalpy of heating and cooling were 230.7 and 203.2 Jg<sup>-1</sup> respectively for lauric acid. The melting and solidification temperatures of 1,4-dilauroylamidanthraquinone were 41 and 35 °C respectively. The phase change temperature and enthalpy values of the novel PCMs were slightly lower than those of precursor fatty acid, which was consistent with the literature for fatty acid. On the other hand, synthesized novel PCM was having enthalpy above 50 Jg<sup>-1</sup> which was sufficiently acceptable for a TES material for solar applications.

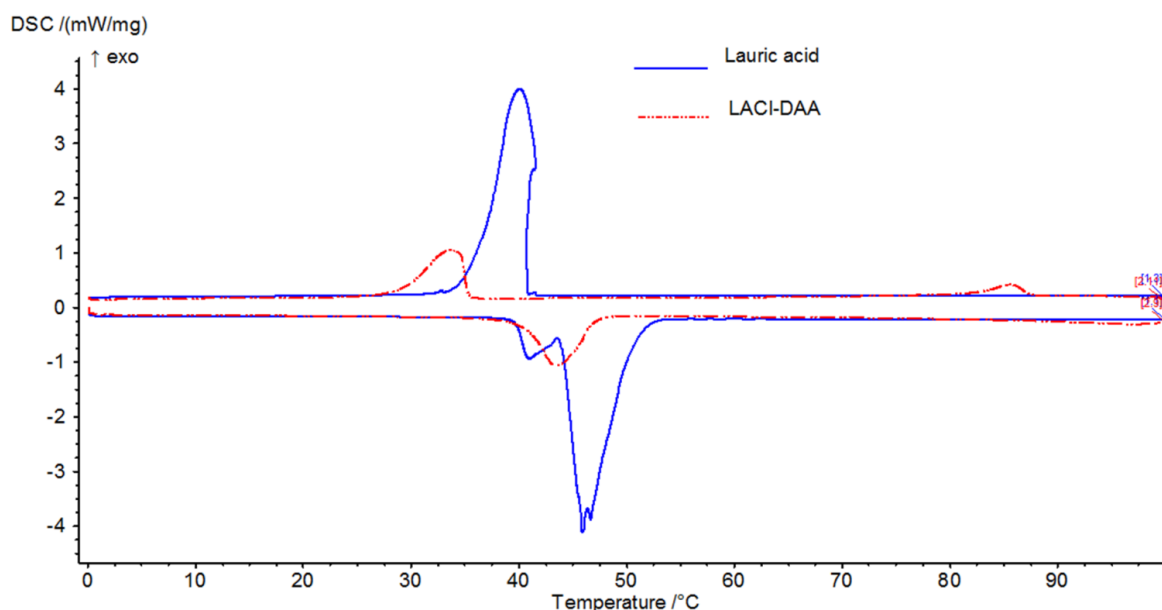


Figure 5. DSC curves of lauric acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone

Table 1. Thermal energy storage characteristics of lauric acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone

Materials	Phase change temperature (heating; °C)	Phase change enthalpy (heating; Jg <sup>-1</sup> )	Phase change temperature (cooling; °C)	Phase change enthalpy (cooling; Jg <sup>-1</sup> )
Lauric acid	42	230.7	42	-230.2
1,4-dilauroylamidanthraquinone	41	51.1	35	-48.8

Specific heat values of fatty acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone were recorded with a special technique as shown in Figure 6 to show sensible heat capacity. Cp is well known to be infinite during phase changes. The incomplete curve is due to the heat of heating ramp. Cp values of precursor fatty acid and novel PCM were tabulated in Table 2. In literature, most of researcher focused on phase change temperature and latent heat capacity of PCMs. The specific heat has a direct effect on thermal energy storage when latent heat storage capacity is calculated. It contributes to the total amount of heat as sensibly stored heat.

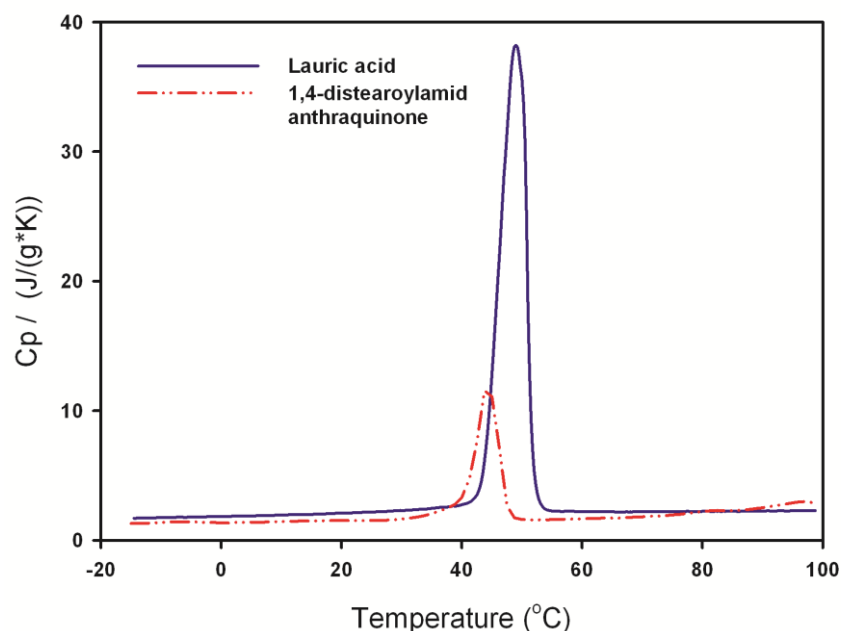


Figure 6. Cp versus temperature curves of lauric acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone

Table 2. Cp values of lauric acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone

	Temperature (°C)	Lauric acid	1,4-dilauroylamidanthraquinone
<b>Cp (J/(g*K))</b>	(-15 °C)	1.70	1.29
	(0 °C)	1.84	1.33
	(20 °C)	2.10	1.52
	before solid-liquid phase change temperature	(41 °C)	(40 °C)
	(60 °C)	2.23	1.66
	(80 °C)	2.24	2.23
	(100 °C)	2.29	2.83

### 2.3. Thermal endurance of the the novel PCM

TGA data is important to determine the maximum temperature at which material can withstand without chemical decomposition. The first decomposition temperatures are important for utilization of PCMs because the first of the degradations is boiling for organic compounds.

TGA curve of 1,4-dilauroylamidanthraquinone was shown in Figure 7 as TGA data was tabulated in Table 3. 1,4-dilauroylamidanthraquinone had two decomposition steps starting at onset decomposition temperatures of 273 and 345 °C. Weight lost of first degradation step was found as 40.53% as weight lost of second degradation step was 40.52%. Consequently, these materials can easily with stand ambient temperatures for several applications.

Table 4. Thermal endurance limit of 1,4-dilauroylamidanthraquinone

Materials	1 <sup>st</sup> Degradation Temperature (°C)	Weight loss [%]	DTG <sub>max</sub> (°C)	2 <sup>nd</sup> Degradation temperature (°C)	Weight loss [%]	DTG <sub>max</sub> (°C)
1,4-dilauroylamidanthraquinone	273.86-345.93	40.53	318.33	345.93-454.56	40.52	427.76

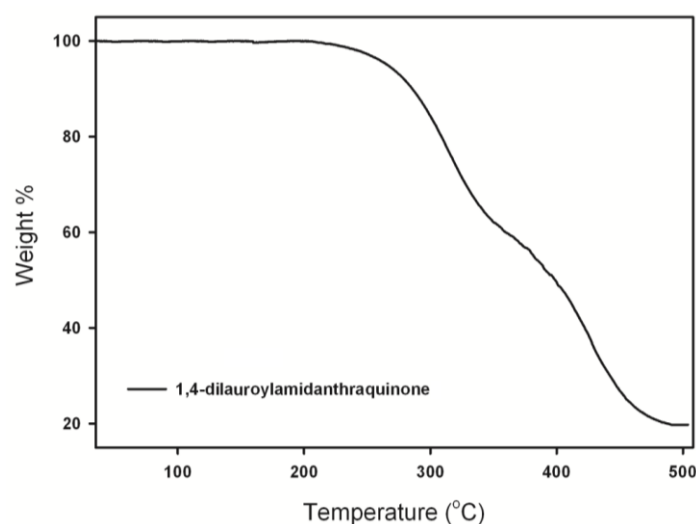


Figure 7. TGA curves of 1,4-dilauroylamidanthraquinone

#### 2.4. POM investigation of the novel PCM

Figure 7 shows the POM images of pristine lauric acid and 1,4-dilauroylamidanthraquinone below phase transition temperatures. It can be followed up that both fatty acid and produced PCM had slightly different phase appearances.

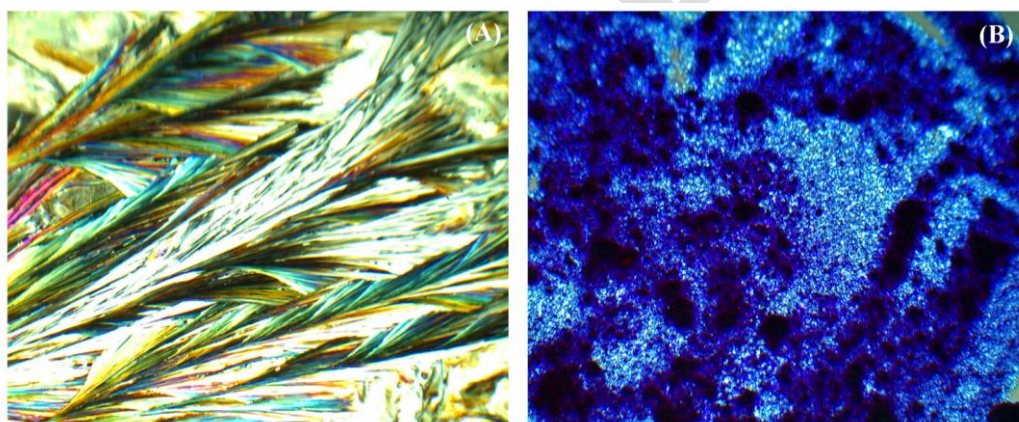


Figure 7. POM Images of lauric acid (A) and 1,4-dilauroylamidanthraquinone (B)

#### CONCLUSION

1,4-dilauroylamidanthraquinone was synthesized as a novel PCM from 1,4-diamidanthraquinone and lauric acid chloride and characterized by using FTIR and NMR spectroscopy techniques structurally. DSC analysis showed that synthesized PCM can be used as novel PCM due to its suitable phase change temperatures, LHTES capacity for thermal energy storage applications. Besides 1,4-dilauroylamidanthraquinone was found stable up to extreme temperature compared to ambient according to the TGA measurements.

Latent heat energy storage capacity of 1,4-dilauroylamidanthraquinone was found lower than pristine fatty acid. It was attributed to distorted crystallinity in the structure due to anthraquinone groups. It is traditional to PCM produced from fatty acids or alcohols. Diaminoanthraquinone is a considerably bulky group disrupting crystallinity and decreasing melting temperature and enthalpy huge. 1,4-dilauroylamidanthraquinone had phase change temperatures of 41 °C and 35 °C for melting and solidification respectively.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Gaziosmanpaşa University Polymer Research Laboratory for the materials and facilities.

## REFERENCES

- Alkan C., Canik G., Dünya H., Sarı A., 2011. Synthesis and thermal energy storage properties of ethylene dilauroyl, dimyristoyl, and dipalmitoyl amides as novel solid–liquid phase change materials. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 95: 1203–1207.
- Alkan C., Ensari ÖF., Kahraman, D., 2012. Poly(2-alkyloxyethylacrylate) and poly(2-alkyloxyethylacrylate-co- methylacrylate) comblike polymers as novel phase-change materials for thermal energy storage. *J. Appl. Polym. Sci.*, 126(2): 631-640.
- Alkan C., Tek Y., Kahraman D., 2011. Preparation and characterization of a series of thiourea derivatives as phase change materials for thermal energy storage. *Turk. J. Chem.*, 35: 769-762.
- Baetens R., Jelle BP., Gustavsen A., 2010. Phase change materials for building applications: A state-of-the-art review. *Energy Build.*, 42: 1361–1368.
- Behzadi S., Farid, MM., 2014. Long term thermal stability of organic PCMs. *Appl. Energy*, 122: 11–16.
- Canik G., Alkan C., 2010. Hexamethylene dilauroyl, dimyristoyl, and dipalmytoyl amides as phase change materials for thermal energy storage. *Sol. Energy*, 84: 666–672.
- Fernandez A.I., Martínez M., Segarra, M., Martorell, I., Cabeza, LF., 2010. Selection of materials with potential in sensible thermal energy storage. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 94: 1723–1729.
- Kenisarin M., Mahkamov K., 2016. Salt hydrates as latent heat storage materials: Thermophysical properties and costs. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 145: 255–286.
- Lin Y., Jia Y., Alva G., Fang G., 2018. Review on thermal conductivity enhancement, thermal properties and applications of phase change materials in thermal energy storage. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 82: 2730–2742.
- Liu M., Steven Tay NH., Bell S., Belusko M., Jacob R., Will G., Saman W., Bruno F., 2016. Review on concentrating solar power plants and new developments in high temperature thermal energy storage technologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 53: 1411–1432.
- Mao Q., Chen H., Zhao Y., Wu H., 2018. A novel heat transfer model of a phase change material using in solar power plant. *Appl. Therm. Eng.*, 129: 557–563.
- Parameshwaran R., Kalaiselvam S., Harikrishnan S., Elayaperumal A., 2012. Sustainable thermal energy storage technologies for buildings: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 16, 2394–2433.
- Pardo P., Deydier A., Anxionnaz-Minvielle Z., Rougé S., Cabassud M., Cognet P., 2014. A review on high temperature thermochemical heat energy storage. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 32, 591–610.
- Sarı A., Bicer A., Karaipekli A., Al-Sulaiman F.A., 2018. Preparation, characterization and thermal regulation performance of cement based-composite phase change material. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 174, 523–529.
- Sharma A., Tyagi VV., Chen CR., Buddhi D., 2009. Review on thermal energy storage with phase change materials and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 13: 318–345.
- Tao YB., He YL., 2018. A review of phase change material and performance enhancement method for latent heat storage system. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 93: 245–259.
- Wang Q., Wang J., Chen Y., Zhao CY., 2019. Experimental investigation of barium hydroxide octahydrate as latent heat storage materials. *Sol. Energy*, 177: 99–107.
- Yuan Y., Cao X., Xiang B., Du Y., 2016. Effect of installation angle of fins on melting characteristics of annular unit for latent heat thermal energy storage. *Sol. Energy*, 136: 365–378.
- Zalba B., Marín JM., Cabeza LF., Mehling H., 2003. Review on thermal energy storage with phase change: materials, heat transfer analysis and applications. *Appl. Therm. Eng.*, 23: 251–283.
- Zeinelabdein R., Omer S., Gan G., 2018. Critical review of latent heat storage systems for free cooling in buildings. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 82: 2843–2868.
- Zhou D., Zhao CY., Tian Y., 2012. Review on thermal energy storage with phase change materials (PCMs) in building applications. *Appl. Energy*, 92: 593–605.

## By-catch characteristics and fecundity of the invasive swimming crab *Charybdis longicollis* in Turkey, the Eastern Mediterranean

Fikret Öndes<sup>1</sup>, Uğur Özden<sup>2</sup>, Erhan Irmak<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>İzmir Katip Çelebi University, Faculty of Fisheries, Department of Fisheries and Fish Processing Technology, İzmir, Turkey

<sup>2</sup>İzmir Katip Çelebi University, Faculty of Fisheries, Department of Basic Sciences, İzmir, Turkey

\*Corresponding author e-mail: [irmakerhan@yahoo.com](mailto:irmakerhan@yahoo.com)

### Abstract

This study aimed to assess information on by-catch per unit effort of *C. longicollis* in trawl fishery, its morphometric characteristics, size-weight relationship, and fecundity. To determine the size-weight relationship and fecundity, male and female specimens were collected from commercial trawls in Taşucu Bay (Mediterranean Sea). In the laboratory, the following somatic parts of crabs were measured by calliper: carapace width (CW), carapace length (CL), abdomen width (AW), and cheliped length (CheL). Results showed that the highest mean by-catch per unit effort of *C. longicollis* was estimated as 21±1 kg/tow in spring in trawl fishery. Berried females varied in size from 24 to 37 mm CW and fecundity increased with increased crab size ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.57$ ). Crabs that included parasite ranged from 25 and 42 mm in CW and there was no significant relationship between the weight of parasite and CW ( $p > 0.05$ ). The CW-weight relationship for the overall population (both females and males) was:  $W = 0.0006CW^{2.749}$ ,  $R^2 = 0.96$ . In *C. longicollis*, cheliped symmetry was seen for the population with right chelipeds being equal in size to left chelipeds. Moreover, cheliped length in males showed a strong, positive relationship with CW. Similarly, in males there was a positive relationship between AW and CW. In conclusion, this study provided the first detailed information on fecundity of *C. longicollis* in Turkish waters.

**Keywords:** Crab, fishery, size-weight relationship, parasite, egg number, Mediterranean Sea

### INTRODUCTION

*Charybdis longicollis*, swimming crab, found in the Red Sea, the Persian Gulf and Madagascar (Galil and Innocenti, 1999). In addition, it is an invasive species from the Red Sea that invaded the Mediterranean Sea (Innocenti et al., 2017). *C. longicollis* was first recorded in the Mediterranean (Mersin Bay) in 1954 (Holthuis, 1961). Then, this species was reported from Israel (Lewinsohn and Holthuis, 1964), Lebanon (Shiber, 1981), Egypt (Ramadan and Dowidar, 1976), Cyprus (Lewinsohn and Holthuis, 1986), Greece (Galil and Kevrekidis, 2002), and Syria (Hasan and Noel, 2008). Individuals of *C. longicollis* prefer to live in muddy and sandy habitats at 8-90 m depths (Innocenti and Galil, 2011).

Previous studies on *C. longicollis* were related to the population structure (Galil and Innocenti, 1999), agonistic behavior (Innocenti et al., 2003), feeding ecology (Stasolla et al., 2015), epibiont prevalence (Innocenti and Galil, 2011), interactions with parasite (Innocenti et al., 2009, 2017; Özcan and Katağan, 2016). Nevertheless, there has been no comprehensive study on the reproductive ecology characteristics (e.g. mating, maturity, fecundity). This species was also reported as non-target species in trawl fishery (Gökçe et al., 2016).

In particular, many studies focussed on behaviour of *C. longicollis* parasitized by *Heterosaccus dollfusi* (Innocenti et al., 1998; 2009; 2017). It was reported that the parasite causes sterilization and prevents moulting thus influences the growth of crabs (Innocenti and Galil, 2011). In addition, a positive relationship between size of host and total wet weight of externea was noted by Galil and Innocenti (1999).

The present study aimed to assess information on by-catch per unit effort of *C. longicollis* in trawl fishery, its morphometric characteristics, size-weight relationship, and fecundity.

### MATERIALS AND METHODS

Samples were collected by commercial trawl boats between December 2014 and September 2015 in Taşucu Bay (Mediterranean Sea). A total of 32 tows, including 3 depth contours (0-20 m, 20-50 m, 50-100 m) were evaluated. Habitat of sampling areas were mainly consist of sand and mud. The location of each haul was recorded using a GPS system and tow duration, speed of boat were noted. Body size (carapace width) of crabs



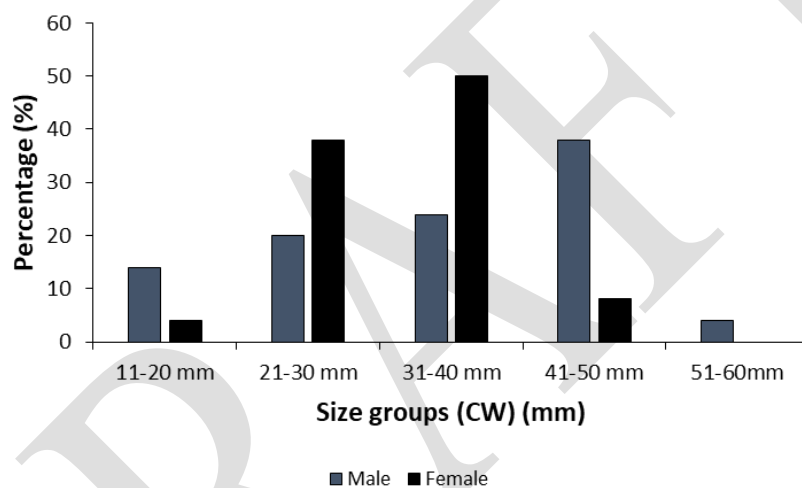
were measured using callipers on-board. Additionally, to estimate by-catch per unit effort, total crab number were recorded for each tows. Similarly, the ratio of crabs that have loss their appendages and infected by parasite were determined on-board. For fecundity analysis sub-samples were collected.

In the laboratory, the following body parts were measured using vernier calipers (to the nearest 0.1 mm): carapace width (CW); carapace length (CL); right cheliped propodus length (RChL); and abdomen width (AW). Regarding the fecundity, the method in Tallack (2002) was used and the wet weight of each egg mass was determined for each female.

The data were tested for normality and homogeneity of variance using a Kolmogorov-Smirnov K-S test and Levene's test respectively. Then, accordingly parametric or non-parametric analyses were performed. All statistical analyses were undertaken using the statistical software SPSS (version 20.0).

## RESULTS

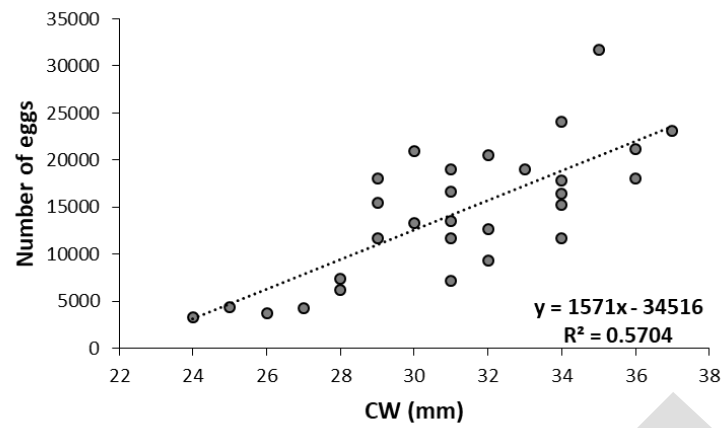
Results showed that BPUE of *C. longicollis* ranged between 0 and 21 kg/tow in the trawl fishery. The mean CW of female crabs was  $31 \pm 6$ , whereas the average CW of males was  $35 \pm 12$ . Figure 1 showed that size distribution of male and female crabs. Regarding the damage status, 21% of all crabs had missing legs.



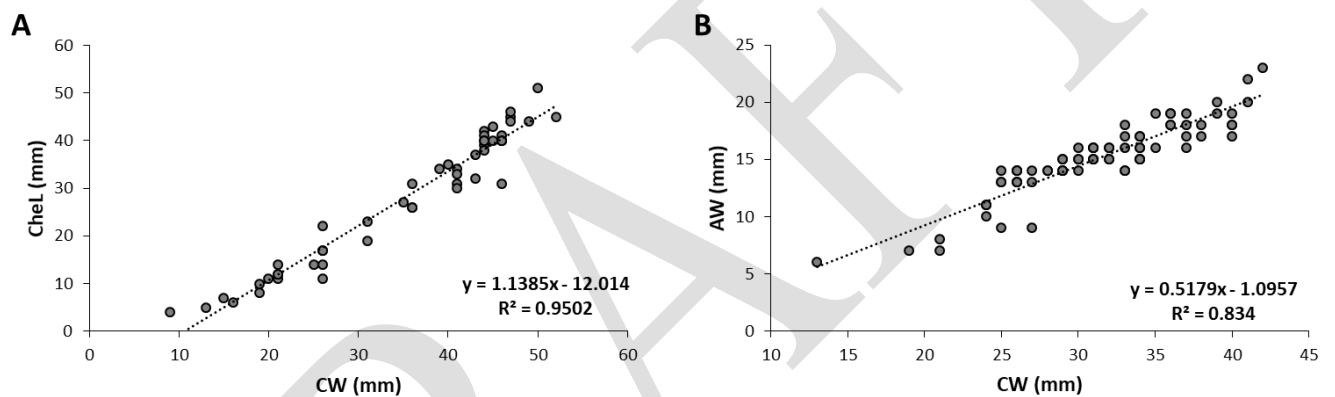
**Figure 1.** Size distribution of lesser crab (*C. longicollis*) sampled from the Taşucu Bay, eastern Mediterranean (males = grey, females = black).

The mean fecundity was  $14\,402 \pm 6\,938$  eggs per ovigerous female. Berried females varied in size from 24 to 37 mm CW and fecundity increased with increased crab size ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 0.57$ ) (Figure 2). Concerning the secondary sexual characters, there was a significant relationship between CW and CheL for males (Figure 3a) and the significant relationship between CW and AW of females were determined (Figure 3b). Moreover, cheliped symmetry was seen for the population with right chelipeds being equal in size to left chelipeds. The CW-weight relationship for the overall population (both females and males) was:  $W = 0.0006CW^{2.749}$ ,  $R^2 = 0.96$  (Figure 4).

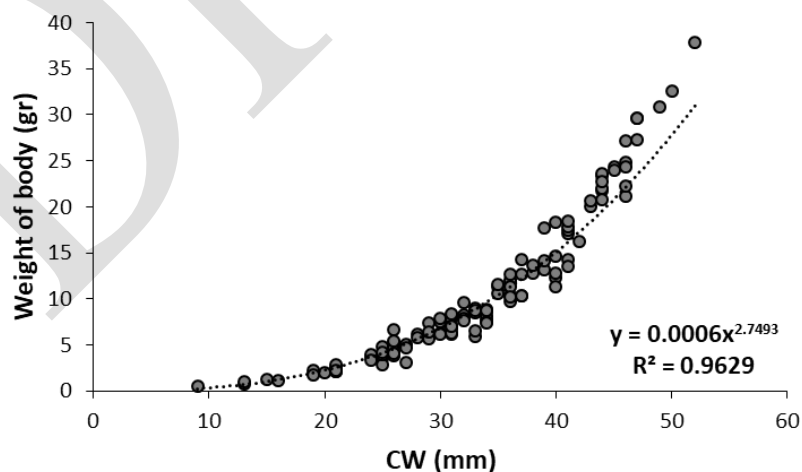
Results revealed that 42% of female crabs were infected with *Heterosaccus dollfusi*. Crabs that included parasite ranged from 25 and 42 mm in CW and there was no significant relationship between the weight of parasite and CW ( $p > 0.05$ ).



**Figure 2.** The relationship between number of eggs and carapace width (CW) for lesser crab (*C. longicollis*) sampled from the Taşucu Bay, eastern Mediterranean.



**Figure 3.** a) The relationship between cheliped length (ChelL) and carapace width (CW) for male lesser crab (*C. longicollis*), b) the relationship between abdomen width (AW) and carapace width (CW) for female individuals of lesser crab (*C. longicollis*).



**Figure 4.** The size- weight relationship of lesser crab (*C. longicollis*) sampled from the Taşucu Bay, eastern Mediterranean.

## DISCUSSION

The present study provided first information on fecundity of *C. longicollis* in Mediterranean. Like many crab species, fecundity showed an increase with increasing body size (Juanes and Smith, 1995; Tallack, 2002; Öndes, 2015). However, life cycle of this crab species has not well documented; in particular the egg and juvenile development have not investigated yet.

The present study noted significant relationships between CW and secondary sexual characters (AW for females and CheL for males). Öndes (2015) found similar relationships for other decapod species *Cancer pagurus*. Furthermore, our results revealed the cheliped symmetry. Similarly, Tallack (2002) found the symmetry for left and right chelipeds of other crab species. Both the present study and numerous studies have indicated that there was a positive relationship between body size and body weight of crabs (Atar and Seçer, 2003; Öndes, 2015; Aydın, 2018).

Our study demonstrated that 42% of females had infected with parasite. Innocenti et al. (2009) noted that the prevalence of infection in Palmahim waters (Israel) was 63%, whilst 19% was in Antalya, Turkey. Similarly, Özcan and Katağan (2016) reported 47.6% of females had parasite around İskenderun Bay. On the other hand, Galil and Innocenti (1999) noticed that infection showed a seasonal difference; infected crabs were common in spring than fall. More importantly, growth and reproduction of infected crabs are influenced (Innocenti and Galil, 2011).

Although *C. longicollis* is not target species, it is determined as by-catch species in trawl fishery (Özbilgin et al., 2013; Gökçe et al., 2016). According to the present study, BPUE of *C. longicollis* showed a difference in tows. In particular, probably depending on seasons and fishing depth, this species represented with about 9% of total biomass (Özbilgin et al., 2013).

## CONCLUSION

In summary, there was a strong relationship between the egg number and body size of *C. longicollis*. Similarly, strong relationships between body size and the secondary sexual characters (e.g. AW, CheL), which have been used to estimate the size at maturity of aquatic animals (Hartnoll, 1974; Öndes, 2015), were found. The present study provided information on BPUE of *C. longicollis* in trawl fishery. However, more data on this invasive species should be collected monthly during the fishing season for long term monitoring. Interaction between this invasive crab and native species which share the same habitat should be investigated in further research.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to trawl fishers for making the study possible.

## REFERENCES

- Atar, H.H. and Secer, S. 2003. Width length-weight relationships of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1986) population living in Beymelek lagoon lake. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 27: 443-447
- Aydın, M., 2018. Length-Weight Relationships and Condition Factors of Five Crab Species (Decapoda) in the Black Sea. Pakistan journal of zoology 50(4).
- Galil B.S., Innocenti G., 1999. Notes on the population structure of the portunid crab *Charybdis longicollis* Leene, parasitized by the rhizocephalan *Heterosaccus dollfusi* Boschma, off the Mediterranean coast of Israel. - Bulletin of Marine Science, 64: 451-463.
- Galil BS & Kevrekidis K., 2002. Exotic decapods and a stomatopod off Rhodes Island (Greece) and the Eastern Mediterranean Transient. Crustaceana 75(7): 925-930.
- Gökçe G, İsmet S, Eryaşar AR (2016). Catch composition of trawl fisheries in Mersin Bay with emphasis on biodiversity. Turk J Zool 40: 522-533.
- Hartnoll, R.G., 1974. Variation in Growth Pattern Between Some Secondary Sexual Characters in Crabs (Decapoda Brachyura). Crustaceana 27, 131-136.
- Hasan H. & Noel P.Y., 2008. The marine decapod Crustacea of the area of Lattakia, Syria. Crustaceana, 81/5: 513-536.

- Holthuis, L. B., 1961. Report on a collection of crustacea decapoda and stomatopoda from Turkey and the Balkans. Zoologische Verhandelingen, 47: 1-67.
- Innocenti G., Vannini M., Galil B.S., 1998. Notes on the behaviour of the portunid crab *Charybdis longicollis* Leene parasitized by the rhizocephalan *Heterosaccus dollfusi* Boschma. - Journal of Natural History, 32: 1577-1585.
- Innocenti G., Pinter N. and Galil B.S., 2003. Observations on the agonistic behavior of the swimming crab *Charybdis longicollis* Leene infected by the rhizocephalan barnacle *Heterosaccus dollfusi* Boschma. Canad. J. Zool., 81:173-176.
- Innocenti, G., Galil, B.S., Yokeş, M.B., Diamant, A., Goren, M. (2009) Here and there: A preliminary note on the prevalence of an alien Rhizocephalan parasite at the southern and northern limits of its introduced range. Journal of Parasitology 95(6): 1387-1390.
- Innocenti G., and Galil B. S.. 2011. Observations on parasite and epibiont prevalence in the Levantine population of the Erythrean alien portunid *Charybdis longicollis* Leene. Monog. Mus. Reg. Sc. Nat. Torino 40: 387-396.
- Innocenti G, Goren M, Stern N, et al (2017) Going down together: invasive host, *Charybdis longicollis* (Leene, 1938) (Decapoda: Brachyura: Portunidae) and invasive parasite, *Heterosaccus dollfusi* Boschma, 1960 (Cirripedia: Rhizocephala: Sacculinidae) on the upper slope off the Mediterranean coast of Israel. Mar Biol Res 13:229–236.
- Juanes, F., Smith, L.D., 1995. The ecological consequences of limb loss and damage in Decapod Crustaceans: a review and prospectus. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 193, 197-223.
- Lewinsohn, C., and Holthuis, L.B. 1964. New records of decapod Crustacea from the Mediterranean coast of Israel and the eastern Mediterranean. Zool. Meded. 40: 45–63.
- Lewinsohn, C.H. & Holthuis, L.B., 1986. The Crustacea Decapoda of Cyprus. Zoologische Verhandelingen, Leiden, 230: 1-64.
- Öndes, F., 2015. Fisheries ecology of the brown crab (*Cancer pagurus* L.) in the Isle of Man. Ph.D Thesis, School of Ocean Sciences, Bangor University, United Kingdom, 232 pp.
- Özbilgin H, Gökçe G, Özbilgin Y, Eryaşar AR, Kalacık E, Bozaoğlu AS (2013). Mersin Körfezi Trol Balıkçılığında Tür ve Boy Seçiciliğini Arttırmaya Yönelik Araştırmalar. Proje No: 109O684.
- Özcan, T., Katağan, T., 2016. Prevalence of the *Heterosaccus dollfusi* Boschma, 1960 (Rhizocephala:Sacculinidae) on the *Charybdis longicollis* Leene, 1938 (Brachyura: Portunidae) from the Iskenderun Bay, Turkey. J. Black Sea/Mediterranean Environment, 22(2):128-136.
- Ramadan, S.E. & Dowidar, N.M., 1976. Brachyura (Decapoda Crustacea) from the Mediterranean waters of Egypt. Thalassia Jugoslavica, 8: 127–139.
- Shiber, J. G., 1981. Brachyurans from Lebanese waters. Bull. Mar. Sci., 31(4): 864-875.
- Stasolla, G., Innocenti, G., Galil, B., 2015. On the diet of the invasive crab *Charybdis longicollis* Leene, 1938 (Brachyura: Portunidae) in the eastern Mediterranean Sea, Israel Journal of Ecology & Evolution, 61(3-4):130-134.
- Tallack, S.M.L., 2002. The biology and exploitation of three crab species in the Shetland Islands, Scotland. Ph.D. thesis, the UHI Millennium Institute, 390 pp.

## Synthesis and Characterization of 3-Stearoyloxyethyl Amine as a Novel Phase Change Material for Some Thermal Energy Storage Applications

Cemil Alkan\*, Derya Kahraman Döğüşcü

Gaziosmanpaşa University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Tokat, Turkey

\*Corresponding author e-mail: cemil.alkan@gop.edu.tr

### Abstract

3-stearoyloxyethyl amine as a novel PCM was synthesized and structurally and thermally for performance and reliability. The novel PCM was achieved via the reaction between acyl chloride of stearic acid and triethanol amine without using any catalyst but with considerably high yield. Synthesized PCM was characterized structurally by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with an attenuated total reflection (ATR) accessory and proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) techniques. Thermophysical properties including melting and freezing temperature, phase change enthalpy, total enthalpy, specific heat capacity and degradation temperature were determined by using a differential scanning calorimeter (DSC) and a thermogravimetric analyzer (TGA). Phase change temperatures and enthalpy of melting and crystallisation of the PCM were found slightly lower than the precursor, which is attributed to the bulky connection of the crystallizing side groups. TGA measurements indicated that 3-stearoyloxyethyl amine was stable up to 200 °C, which was sufficiently higher as compared to the possible working temperatures. Crystal morphology of the PCM was examined by polarized optic microscopy (POM) analysis. All of the consequences pointed out that synthesized high chain dicarboxylic acid amines could be validated as a solid-liquid PCM for solar thermal applications.

**Keywords:** lauric acid; thermal energy storage; phase change material

### INTRODUCTION

Renewable energy sources should be used more effectively because of rising green gas emissions and fuel prices and decreasing natural energy resources. For this reason, thermal energy storage (TES) materials are very interested to be improved for effective utilization (Zhang et al., 2018; Abokersh et al., 2018). Solar energy, cooling or heating of buildings, industrial waste heat systems and geothermal energy are very important TES applications (Huang et al., 2017; Akeiber et al., 2016; Xu et al., 2015; Kalnæsa et al., 2015). Isothermally working and lower volume change vapor pressure are the advantages of using phase change materials (PCMs) (Akeiber et al., 2016; Xu et al., 2015; Kalnæsa et al., 2015). High heat storage capacity per unit size is another advantage.

PCMs are classified in four groups: solid-solid, solid-liquid, solid-gas, and liquid-gas (Biçer and Sarı, 2012). Solid-liquid PCMs have high heat storage capacity and uses of solid-liquid PCMs in TES systems have been proven to be economic. TES capacity and engineering profile are validation characteristics of the materials. The design of TES systems determines the performance and deposition in spite of the fact that they are not adequate for the whole solution. Therefore, PCM selection is important in the heat deposition properties and sustainability (Aydın, 2012).

PCMs are characterized with their melting and solidification temperatures and phase change enthalpy values (Mehling and Cabeza, 2008). Congruent phase change, high rate of nucleation to avoid super-cooling during phase change and high specific heat values are the other important factors (Sharma et al., 2009; Baetens et al., 2010). Chemical stability, non flammable, non explosive, non toxic and non corrosiveness are sometimes requisites for the applications (Zhou et al., 2012).

PCMs and their mixtures as eutectics have been used for lots of TES applications (Mazman et al., 2009; Zhou et al., 2015). Among inorganic PCMs, hydrated salts have some exterior properties for TES systems because of their comparatively high thermal conductivity, high latent heat capacity, and reasonable price compared to organic PCMs. But, phase segregation, corrosiveness and high supercooling should be solved for direct utilization. For this reasons, organic PCMs are preferred for chemical and thermal stability, good thermal reliability and non corrosiveness.

Fatty acid esters are the most popular due to their high volumetric storage density, insignificant supercooling gradient, excellent thermal reliability after accelerated thermal cyclings. They are mostly produced by a simple experimental procedure (Aydın, 2012; Aydın and Okutan, 2011a; Aydın and Okutan, 2011b; Aydın, 2013; Wi et al., 2015; Cabus et al., 2013; Sarı et al., 2012; Sarı et al., 2011). Fatty acid esters works in different temperature according to the crystalline ranges. They are stable even after 1000 thermal cycle.

Amides and ureas are the other materials synthesized as novel PCMs for TES applications due to their functionality. Behind their novelty, amides are suitable for metal incorporations and their PCMs are sometimes solid-solid. Materials produced in this work are three dentate amides produced from stearic acid and triethylamine through condensation reaction helped through acylation of stearic acid.

## MATERIALS AND METHODS

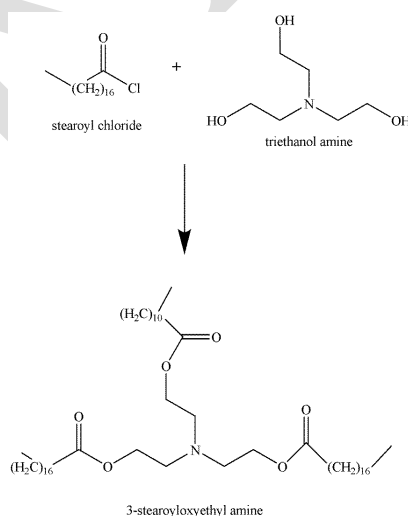
### Materials

3-stearoyloxyethyl amine was synthesized using stearic acid (Merck), thionyl chloride (Merck, 99%), and triethanol amine (Tekkim, 99%). All of the synthesis chemicals were used as received without further purification. THF (Merck, 99.8%) and toluene (Carlo Erba, 99.8%) were solvents and N,N-dimethyl formamide (DMF) (Merck, 99.8) was a catalyst for acylation.

### Synthesis

Synthesis of 3-stearoyloxyethyl amine was performed by condensation reaction of stearyl chloride and triethanol amine without using any catalyst in toluene solvent. Stearoyl chloride was synthesized using stearic acid and thionyl chloride, stearyl chloride was preferred instead of stearic acid due to the low reactivity of fatty acids. Stearic acid and thionyl chloride with 2/1 feed ratios were synthesized in tetrahydrofurane solution with DMF as a catalyst at 85 °C for 8 hours in a reflux system. The reaction was continued until the hydrogen chloride gas is exhausted. After the hydrogen gas output is terminated, the unreacted thionyl chloride was removed by heating the mixture to 90 °C for 1 hour in fume hood and the acyl chloride was obtained (Alkan et al., 2012).

Stoichiometric quantities of the stearyl chloride and triethanol amine were placed in a balloon, and the reaction was performed under reflux at 70 °C. The product was precipitated by pouring the reaction mixture into excess methanol. It was filtered and dried at room temperature. A schematic representation of the reaction with efficiency over 90% was shown in Figure 1.



**Figure 1.** The synthetic scheme of the 3-stearoyloxyethyl amine

### Characterization

#### Chemical Characterizations

The chemical characterization of the novel PCM was performed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy techniques. For the FT-IR analyses, Jasco FT-IR-4700 with ATR accessory was used between 4000 and 400 cm<sup>-1</sup>. The resolution of the spectra and number of scan were adjusted as 4 cm<sup>-1</sup> and 16, respectively. AVANCE III 400 MHz, Bruker model NMR

was employed as another structural characterization method. The <sup>1</sup>H-NMR analyses were realized using CDCl<sub>3</sub> solvent and tetramethylsilane as an internal reference standard.

#### Thermal Characterizations

Thermal properties such as phase change enthalpy, melting and solidification temperature, total enthalpy, and specific heat capacity ( $C_p$ ) of PCM was analyzed with Netzsch DSC214 Polyma model differential scanning calorimetry (DSC) instrument. The instrument was calibrated with bismuth, indium, zinc, tin, and cesium chloride internal standards for the measurements as with sapphire internal standard for  $C_p$  measurements. The DSC measurements were performed at a heating-cooling rate of 5 °C min<sup>-1</sup> in temperature range of 0 °C to 100 °C under inert N<sub>2</sub> atmosphere at a flow rate of 60 mL/min.  $C_p$  values of fatty acid and PCM were determined between -20 °C and 100 °C and 5 °C min<sup>-1</sup> heating-cooling rate was applied. Thermal stability, weight loss temperatures and decomposition behavior of the novel PCMs were detected with Setaram TG-DTA/DSC model TGA instrument. The measurements were performed at a scanning rate of 10 °C/min in a static air atmosphere and instrument was calibrated using calcium oxalate standard from 35 to 500 °C.

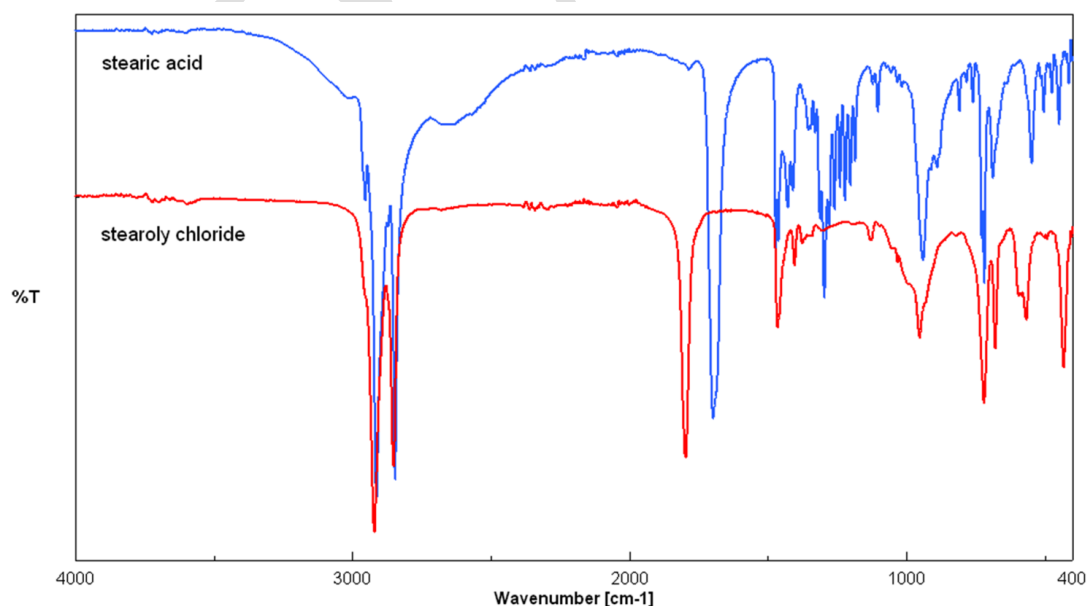
#### Morphology Analyses

Fatty acid and synthesized PCM were monitored for crystalline morphology investigation with Leica DM EP model (Germany, 2010) polarize optical microscope (POM).

## RESULTS and DISCUSSION

### The structural characterization of the novel PCM

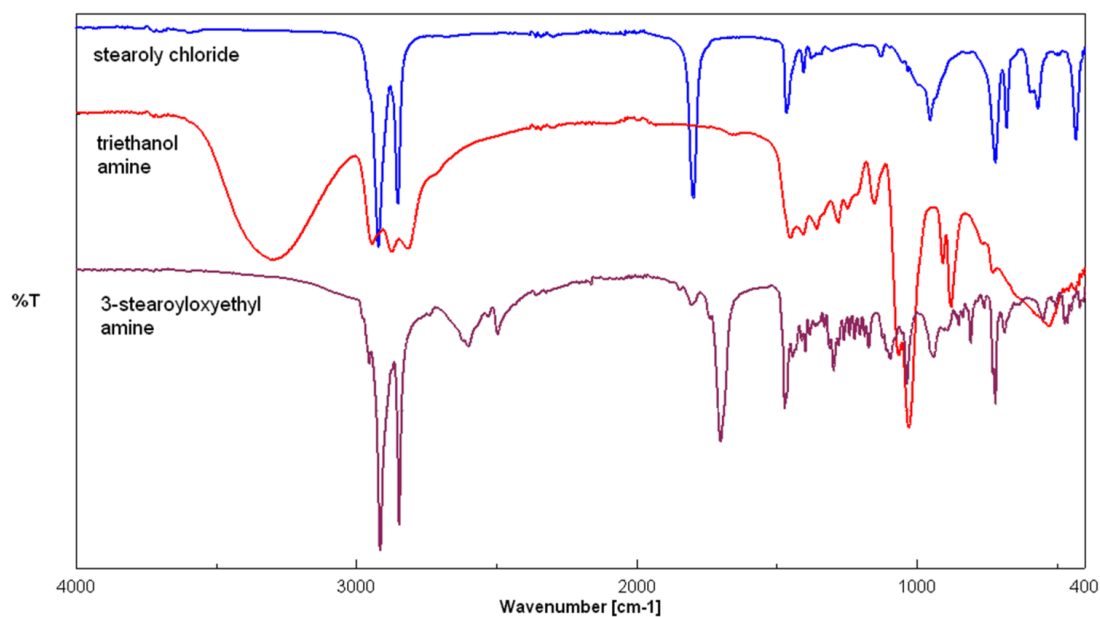
The PCM compound was characterized by FT-IR and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy measurements to confirm the chemical structure of 3-stearoyloxyethyl amine. Figure 2 indicated FT-IR spectra of stearic acid and stearoyl chloride. According to Figure 2; the -OH vibration band of stearic acid which became invisible in the staroyl chloride was observed in the range of 3100–3300 cm<sup>-1</sup>. This peak proved that the hydroxyl groups of fatty acid had converted to chloride group. Also the peaks at around 2844-2911 cm<sup>-1</sup> and 2850-2917 cm<sup>-1</sup> were assigned to -CH<sub>2</sub> stretching and bending vibration peaks and the peaks at around the 1695 cm<sup>-1</sup> and 1793 cm<sup>-1</sup> were assigned to carbonyl stretching peaks of stearic acid and stearoyl chloride, respectively.



**Figure 2.** FT-IR spectra of stearic acid and stearoyl chloride

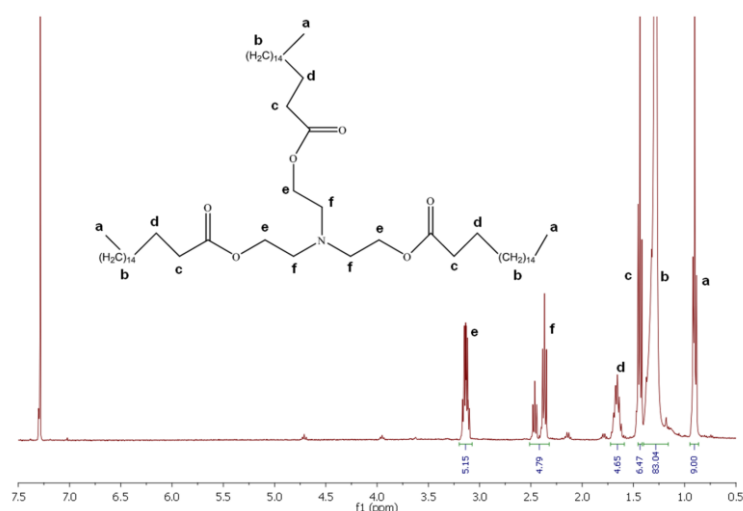
Figure 3 showed FT-IR spectra of precursors and synthesized PCM. The -OH stretching peaks of triethanol amine were seen at 1050 cm<sup>-1</sup> and between 3000 and 3500 cm<sup>-1</sup> and these peaks were not observed after synthesis. This peaks proved that the alcohols of triethanol amine had converted to amid groups, and reaction was completed. Also -C-O stretching peaks of triethanol amine and peak of 3-stearoyloxyethyl amine were seen at 1026 and 1033 cm<sup>-1</sup>, respectively. The carbonyl stretching peaks of stearoyl chloride and 3-

stearoyloxyethyl amine were observed at 1793 and 1698  $\text{cm}^{-1}$ , respectively,  $-\text{CH}_2$  stretching and bending vibration peaks of the stearoyl chloride, triethanol amine and 3-stearoyloxyethyl amine were seen at 2850-2917  $\text{cm}^{-1}$ , 2815-2944  $\text{cm}^{-1}$  and 2840-2914  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.



**Figure 3.** FT-IR spectra of stearoyl chloride, triethanolamine and, 3-stearoyloxyethyl amine

The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of novel PCM was given in Figure 4 with synthesized PCM's chemical structure. The presented peaks were assigned to the protons of ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $-\text{CH}_3$  at about  $\delta=0.9$  (t,  $J=6.7$  Hz, 9H),  $-(\text{CH}_2)_{14}$  at about  $\delta=1.40$ -1.16 (m, 84H), labeled with c at about  $\delta=1.44$  (t,  $J=7.3$  Hz, 6H), labeled with d at about  $\delta=1.72$ -1.59 (m, 6H), labeled with e at about  $\delta=3.13$  (qd,  $J=7.3$  and 4.9 Hz, 6H), labeled with f at about  $\delta=2.51$ -2.32 (m, 6H), for 3-stearoyloxyethyl amine.



**Figure 4.**  $^1\text{H-NMR}$  spectra of 3-stearoyloxyethyl amine

#### Thermal characterization of the novel PCM

DSC thermogram of the pure stearic acid and the novel PCM were given in Figure 5-6 and the data from DSC measurements were tabulated in Table 1. As shown in the Figure 5, stearic acid melted and crystallized at 70  $^\circ\text{C}$  and crystallized at 68  $^\circ\text{C}$ . The enthalpy of heating and cooling were 232.1 and 233.2  $\text{Jg}^{-1}$  respectively for stearic acid. The melting and solidification temperatures of 3-stearoyloxyethyl amine were 61 and 59  $^\circ\text{C}$  respectively.



The solid-solid phase transition was also observed in the synthesized pcm as well as the solid-liquid phase transition. The phase change temperature and enthalpy values of novel PCM were considerably lower than those of precursor fatty acid, which was consistent with the literature for such materials. On the other hand, synthesized novel PCM was having melting and solidification solid-liquid enthalpies above 82.55 Jg<sup>-1</sup> which was sufficiently considerable for a TES material for some applications especially in solid-solid phase transition case.

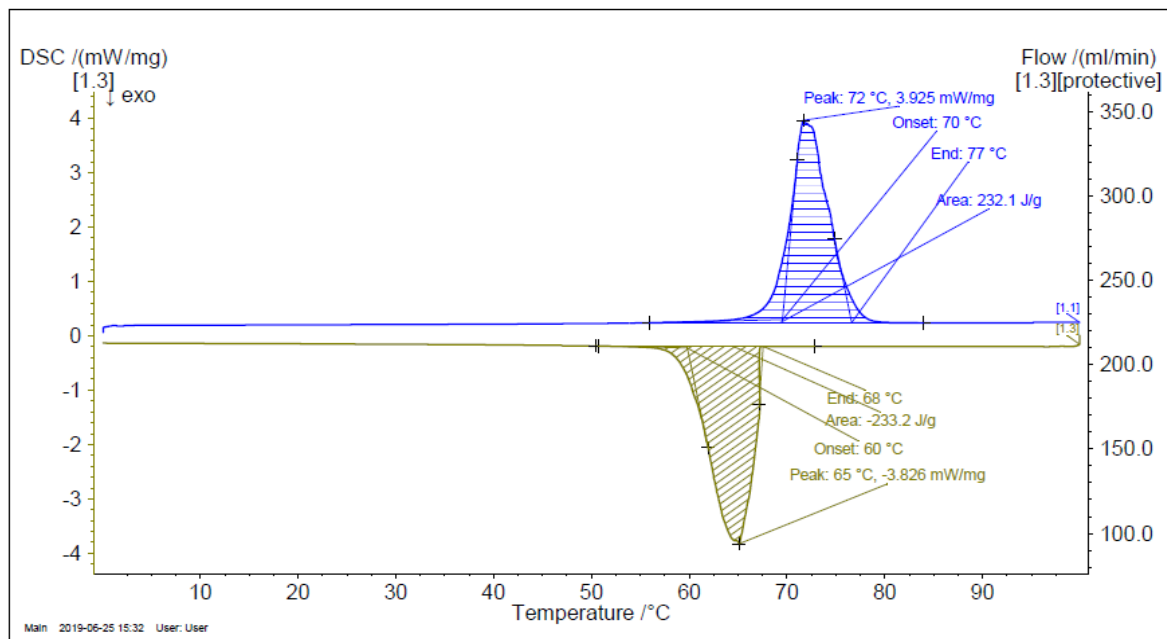


Figure 5. DSC curves of stearic acid

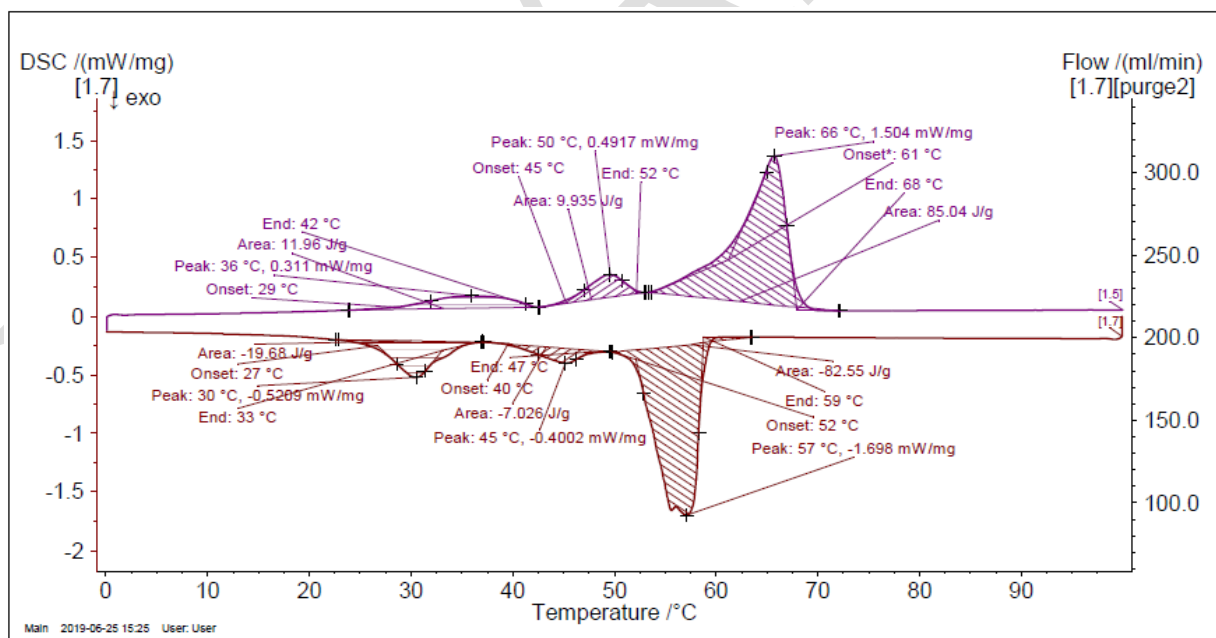


Figure 6. DSC curves of 3-stearoyloxyethyl amine

Table 1. Thermal energy storage characteristics of stearic acid and 3-stearoyloxyethyl amine

Materials	Phase change temperature (heating; °C)	Phase change enthalpy (heating; Jg <sup>-1</sup> )	Phase change temperature (cooling; °C)	Phase change enthalpy (cooling; Jg <sup>-1</sup> )
Stearic acid	70.0	232.1	68.0	-233.2
3-stearoyloxyethyl amine	61.9	85.0	59.0	-82.6

Specific heat values of fatty acid and 3-stearoyloxyethyl amine were recorded to show the sensible heat storage capacity in Figure 7-8. Cp is not measured in phase change because it is infinite there. Cp values of precursor fatty acid and novel PCM were tabulated in Table 2. In spite of the fact that, the specific heat has a direct effect on thermal energy storage when latent heat storage capacity is calculated, most of the researchers focused of only phase change temperature and latent heat capacity.

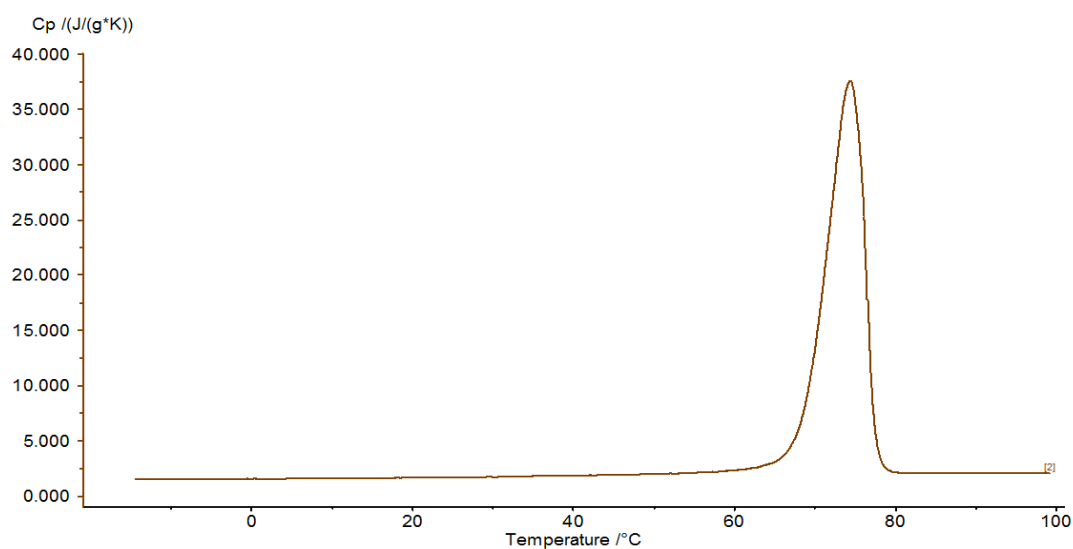


Figure 7. Cp versus temperature curves of stearic acid

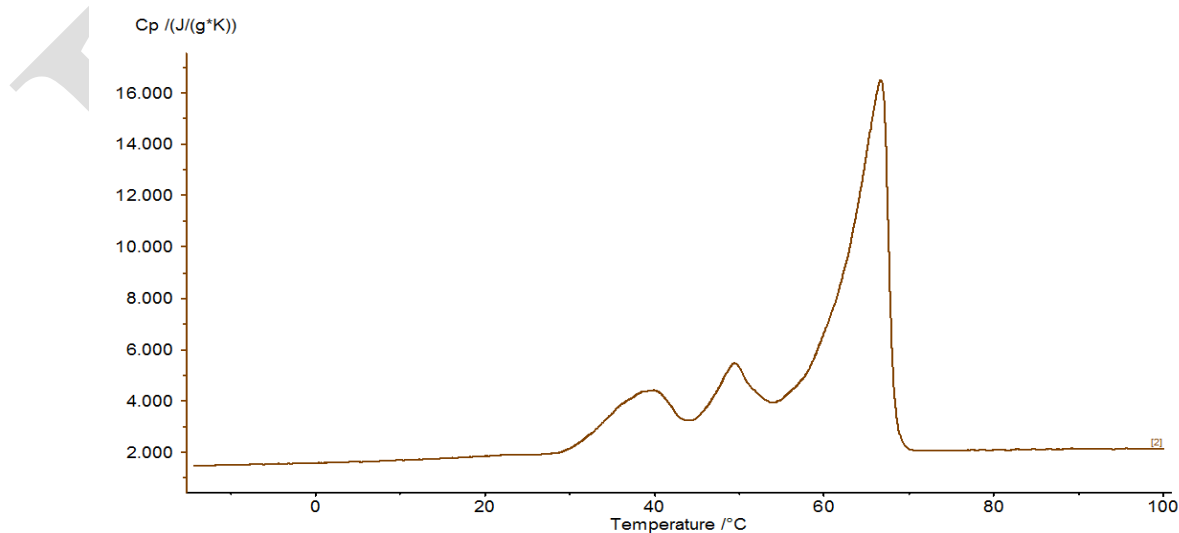


Figure 8. Cp versus temperature curves of 3-stearoyloxyethyl amine

Table 2. Cp values of stearic acid and 3-stearoyloxyethyl amine

	Temperature (°C)	Stearic acid	3-stearoyloxyethyl amine
Cp (J/(g*K))	(-15 °C)	1.50	1.46
	(0 °C)	1.53	1.58
	(20 °C)	1.65	1.85
	(70 °C)	13.63	2.11
	(85 °C)	2.08	2.11
	(100 °C)	2.07	2.14
	(-15 °C)	1.50	1.46

### Thermal endurance of the the novel PCM

TGA data determines the limit for thermal endurance. The onset decomposition temperatures are accepted as the starting point of degradation and in general, the first one is boiling in such organic compounds. TGA curve of 3-stearoyloxyethyl amine was shown in Table 3. 3-stearoyloxyethyl amine had two decomposition steps starting at onset decomposition temperatures 218 and 330 °C. Weight lost of first degradation step was 71.28% as weight lost of second degradation step was 20.30%. Consequently, these materials can easily with stand ambient temperatures for common TES applications.

Table 4. Thermal endurance limit of 3-stearoyloxyethyl amine

Materials	1 <sup>st</sup> Degradation Temperature (°C)	Weight loss [%]	DTG <sub>max</sub> (°C)	2 <sup>nd</sup> Degradation Temperature (°C)	Weight loss [%]	DTG <sub>max</sub> (°C)
3-stearoyloxyethyl amine	218-330	71.28	298	330-458	20.30	398

### POM investigation of the novel PCM

Figure 7 shows the POM images of pristine fatty acid and 3-stearoyloxyethyl amine below phase transition temperatures. It can be followed up that both fatty acid and produced PCM had different phase appearances.

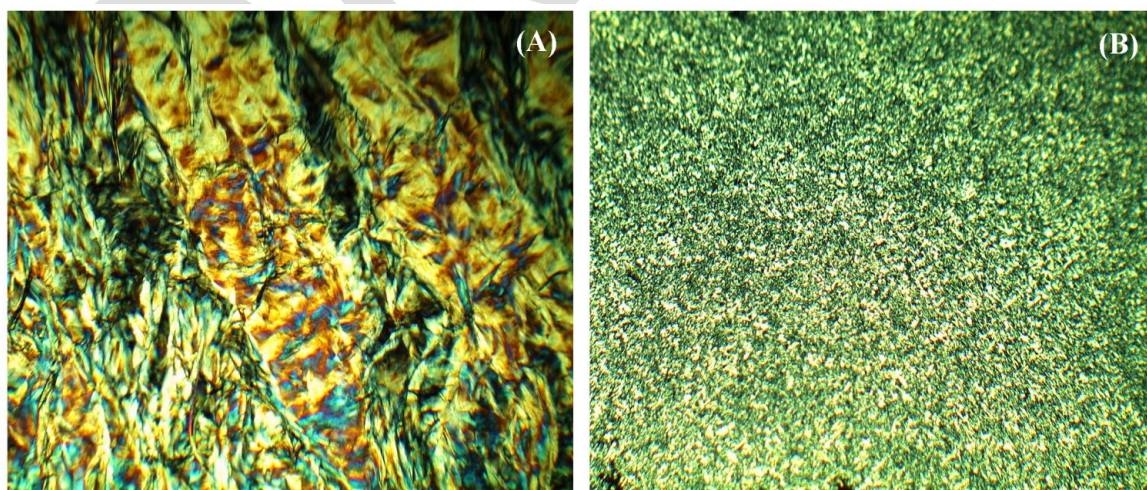


Figure 7. POM Images of stearic acid (A) and 3-stearoyloxyethyl amine (B)

## CONCLUSION

3-stearoyloxyethyl amide was synthesized as novel PCM from of triethanol amine and fatty alcohol chloride and characterized by using FTIR and NMR spectroscopy techniques structurally. DSC analysis showed that synthesized PCM can be used as a novel PCM due to its suitable phase change temperatures for LHTES applications. Besides 3-stearoyloxyethyl amine was found stable up to extreme temperatures when compared to ambient according to the TGA measurements.

Latent heat energy storage capacity of 3-stearoyloxyethyl amine was found considerably lower than pristine fatty acid. It was attributed to distorted crystallinity in the structure. It is traditional to PCMs produced from fatty acids or alcohols. However 3-stearoyloxyethyl amide is a solid solid PCM and could be further improved. It can also be used for structure property relationships. Besides, synthesized PCM is odorless, noncorrosive and stable.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Gaziosmanpaşa University Polymer Research Laboratory for the materials and facilities.

## REFERENCES

- Abokersh MH., Osman M., El-Baz O., El-Morsi M., Sharaf O., 2018. Review of the phase change material (PCM) usage for solar domestic water heating systems (SDWHS). *International Energy Storage*, 42(2): 329–357.
- Akeiber H., Nejat P., Majid MZA., Wahid MA., Jomehzadeh F., Famileh IZ., Calautit JK., Hughes BR., Zaki SA., 2016. A review on phase change material (PCM) for sustainable passive cooling in building envelopes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 60: 1470-1479.
- Alkan C., Ensari ÖF., Kahraman, D., 2012. Poly(2-alkyloxyethylacrylate) and poly(2-alkyloxyethylacrylate-co- methylacrylate) comblike polymers as novel phase-change materials for thermal energy storage. *J. Appl. Polym. Sci.*, 126(2): 631-640.
- Aydın AA., 2012. Diesters of high-chain dicarboxylic acids with 1-tetradecanol as novel organic phase change materials for thermal energy storage. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 104: 102–108.
- Aydın AA., 2013. High-chain fatty acid esters of 1-octadecanol as novel organic phase change materials and mathematical correlations for estimating the thermal properties of higher fatty acid esters' homologous serie. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 113: 44–51.
- Aydın AA., Okutan H., 2011a. High-chain fatty acid esters of myristyl alcohol with even carbon number: Novel organic phase change materials for thermal energy storage-1. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 95: 2752–2762.
- Aydın AA., Okutan H., 2011b. High-chain fatty acid esters of myristyl alcohol with even carbon number: Novel organic phase change materials for thermal energy storage-2. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 95: 2417–2423.
- Baetens R., Jelle BP., Gustavse A., 2010. Phase change materials for building applications: A state-of-the-art review. *Energy and Buildings*, 42(9): 1361-1368.
- Biçer A., Sarı A., 2012. Synthesis and thermal energy storage properties of xylitol pentastearate and xylitol pentapalmitate as novel solid-liquid PCMs. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 102: 125–130.
- Cabus S., Bogaerts K., Mechelen JV., Smet M., Goderis B., 2013. Monotropic Polymorphism in Ester-Based Phase Change Materials from Fatty Acids and 1,4-Butanediol. *Crystal Growth Desing*, 13(8): 3438-3446.
- Huang X., Alva G., Jia Y., Fang G., 2017. Morphological characterization and applications of phase change materials in thermal energy storage: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72: 128-145.
- Kalnæsa SE., Jelle BP., 2015. Phase change materials and products for building applications: A state-of-the-art review and future research opportunities. *Energy and Buildings*, 94: 150-176.
- Mazman M., Cabeza LF., Mehling H., Nogues M., Evliya H., Paksoy H.Ö., 2009. Utilization of phase change materials in solar domestic hot water systems. *Renewable Energy*, 34: 1639–1643.
- Mehling H., Cabeza LF., 2008. *Heat and Cold Storage With PCM: an up to Date Introduction Into Basics And Applications*, Springer, Berlin, Germany.

- Sarı A., Biçer A., 2012. Thermal energy storage properties and thermal reliability of some fatty acid esters/building material composites as novel form-stable PCMs. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 101: 114–122
- Sarı A., Biçer A., Lafcı Ö., Ceylan M., 2011. Galactitol hexa stearate and galactitol hexa palmitate as novel solid-liquid phase change materials for thermal energy storage. *Solar Energy*, 85: 2061–2071.
- Sharma A., Tyagi VV., Chen CR., Buddhi D., 2009. Review on thermal energy storage with phase change materials and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 318–345.
- Wi S., Seo J., Jeong SG., Chang SJ., Kang Y., Kim S., 2015. Thermal properties of shape-stabilized phase change materials using fatty acid ester and exfoliated graphite nanoplatelets for saving energy in buildings. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 143: 168–1731.
- Xu B., Li P., Chan C., 2015. Application of phase change materials for thermal energy storage in concentrated solar thermal power plants: A review to recent developments. *Applied Energy*, 160: 286-307.
- Zhang N., Yuan Y., Cao X., Du Y., Zhang Z., Gui Y., 2018. Latent Heat Thermal Energy Storage Systems with Solid–Liquid Phase Change Materials: A Review. *Advanced Engineering Materials*, 20(6): 1-30.
- Zhou D., Zhao CY., Tian Y., 2012. Review on thermal energy storage with phase change materials (PCMs) in building applications. *Applied Energy*, 92: 593-605.
- Zhou Z., Zhang Z., Zuo J., Huang K., Zhang L., 2015. Phase change materials for solar thermal energy storage in residential buildings in cold climate. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 48: 692-703,

## Biochemical calculation methods to determine enzyme activity

Ahmed Menshaz\*, Ergin Murat Altuner

Kastamonu University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Kastamonu, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: menshaz@gmail.com

### Abstract

Enzymes are catalysts, they accelerate chemical reactions in cells, causing reactions to be completed thousands of times, even if they are not millions of times faster than enzymes. The rate at which different enzymes convert substrates into product may vary due to environmental conditions such as pH and temperature of the environment. Enzyme tests not only measure how fast an enzyme works, but also measure the appearance of the product or the degradation of the substrate. Most often, the concentrations of products and substrates can be measured in a spectrophotometer by using coloured products and coloured substrates in enzyme tests. In a continuous analysis, cuvettes with an enzyme reaction mix are placed in the spectrophotometer and a change in the absorption of a product or substrate is measured over time, where reaction takes place in the cuvette.

**Keywords:** Enzymes, inhibitors, activity.

### INTRODUCTION

A typical cell contains about 3000 various types of enzyme molecules with many copies of each type. The transformation of compounds for cellular energy, the basis of cell proliferation and synthesis of specific compounds that secreted for extracellular reactions or can be used in the cell are some of these biochemical activities. In a cell, chemical reactions occur in a narrow range of pH and temperatures. As the enzymes usually reduce the activation energy of a reaction through various mechanisms, this could be happened. Although the catalytic activity of enzymes in yeasts has been used for centuries, the pure (crystal) acquisition of the first enzyme did not take place until 1926. This was done by James B. Sumner (1946), who won the Nobel Prize for his work on the enzyme urease extracted from Jack bean (Holum, 1968).

Biological catalysts that mean that the subject matter is derived from or produced from some living organisms are said to be enzymes. "Catalyst" refers to a substance, which is capable of increasing the rate of reaction and which is not destroyed or altered by the chemical reaction it accelerates (Castagnetto et al., 2002).

In general, catalysts are particular to the type of chemical reaction they can catalyse in nature. Enzymes are also very particular in nature as a subcategory of catalysts. Each enzyme can only affect the catalysis of highly selected chemical reactions and only with highly selected substances. Enzymes are defined as a "key" that can "unlock" complex compounds. An enzyme as a key should have a specific structure or a multidimensional shape that fits a specific portion of the "substrate", where a substrate is a modified substance or compound. When these two components are assembled, some chemical bonds within the substrate molecule change as a lock is released and, like the key in this diagram, the enzyme is free to perform its task once again (Bisswanger, 2002).

### CHEMICAL NATURE OF ENZYMES

They are high molecular weight compounds, whose molecular weight is ranging from 10,000 to 2,000,000 daltons, consisting of amino acid chains connected to peptide bonds.

Except some RNA's, all enzymes are proteins and as all proteins are not enzymes, protein enzymes can be divided into two types:

Simple Protein Enzymes: They only consist of protein, eg amylase, urease, etc.

Complex (conjugated) Protein Enzymes: They only consist of protein and non-protein part. There is a protein part called apoenzyme and a non-protein portion called a cofactor, which may be a prosthetic or a coenzyme group (Holum, 1968).

## FEATURES OF ENZYMES

Their specificity according to their catalyzed reactions is one of the properties of enzymes that make them as important as research and diagnostic tools. While most of the enzymes will be specific for functional group or a particular chemical bond type only a few enzymes exhibit absolute specificity by catalyzing a particular reaction (Thomas and Gillham, 1989).

There are four different types of specificity in general:

- Absolute specificity - only one reaction will be catalyzed.
- Group specificity - the enzyme will only be effective on molecules with specific functional groups such as methyl, phosphate and amino groups.
- Binding specificity - the enzyme acts on a molecular structure.
- Stereochemical specificity - the enzyme acts on an optical isomer or a specific steric.

## HOW DOES ENZYMES WORK?

The two molecules must collide with each other to react. They must collide with the correct orientation and adequate energy. Adequate energy means that they have enough energy to overcome the barrier of energy in front of the reaction between them. This is the activation energy line (Radger, 2007).

So there are two enzyme action models

- Lock-and-key: The active form of the enzyme is complementary to the substrate. The substrate likewise fits in this catalytic region to lock and key in which the key fits only with its lock.
- Induced fit. This is a more flexible model, where the catalytic field is not completely formed. The catalytic field of the enzyme is not complementary to the substrate.

Substrate binding to the enzyme makes changes in the catalytic region more suitable for the substrate (Bennett and Frieden, 1969).

## MECHANISM OF ENZYME CATALYSIS

By reducing the activation energy of the substance when it is resting, enzymes increase the rate of reaction. The greater the free activation energy, the slower the reaction rate.

The reaction is releases energy (heat) and spontaneous if the free energy of the reaction is  $\Delta G > 0$  (Thomas and Gillham, 1989).

There are five kinds of catalytic mechanisms

1. Acid-base catalysis
2. Covalent catalysis
3. Metal ion catalysis
4. Proximity and orientation effects
5. Optionally connecting the transition state

## CLASSIFICATION OF ENZYMES

Enzymes are subdivided into six (6) main classes (Holum, 1968):

1. Oxidoreductases: Oxidation and reduction reactions, for example, dehydrogenases, oxidases, peroxidases, oxygenases.
2. Transfers: Transfer functional groups, e.g.. aminotransferases, e.g phosphate or amino groups,
3. Hydrolyses: Catalyze the hydrolysis of the substrate, eg. Protease, maltase, lipase.
4. Lyases: Add or remove water, CO<sub>2</sub> or ammonia elements to form a double bond, eg. decarboxylase.
5. Isomerases: Catalyzes the rearrangement of atoms in a molecule to give the isomer; glucose for fructose
6. Ligases: Combine 2 molecules, eg. Synthetase and carboxylases.

## ENZYMES AND COFACTOR

The cofactor is a non-protein substance that should be present for the normal operation of an enzyme. For example, some metal ions function as cofactors by helping to attract electrons from the substrate molecule in some way. Thus, it facilitates the progression of the reaction. Before their catalytic activities are applied, many enzymes require the presence of other compounds (cofactors). All these active complexes are called holoenzymes (Ibers and Holm, 1980).

## FACTORS AFFECTING ENZYME ACTIVITY

In fact, in enzyme analysis, the basic enzyme kinetic theory is important to select a method for enzyme analysis and to understand both the basic enzymatic mechanism. The conditions chosen to measure the enzyme activity are not the same as those chosen to measure the substrate concentration. Various factors affect the rate of progress of enzymatic reactions - substrate concentration, pH enzyme concentration, temperature, the presence of any activator or inhibitor (Henson and Chedrese, 2004).

### Concentration of Enzyme

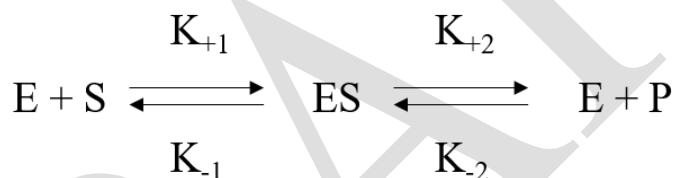
In order to examine the effect of increasing enzyme concentration on the rate of reaction, the substrate must be present in excess, i.e. the reaction should be independent of the concentration of the substrate. Any changes in the amount of the product produced within a given period of time will depend on the level of the existing enzyme.

The enzyme amount in a reaction is measured by the activity it catalyzes. The relationship between concentration and activity is affected by many factors, such as pH, temperature, etc. An enzyme experiment should be designed to be proportional to the amount of enzyme present in order to be the only limiting factor in the concentration of the enzyme. Only when the reaction reaches zero, it is satisfied (Nelson and Cox, 2008).

### Concentration of Substrate

The substrate concentration guide allows the reaction rate to increase to the maximum. After this point, increases in substrate concentration do not increase the rate.

When this maximum speed is reached, it is theoretically that all available enzymes are converted to the enzyme substrate complex ES. In the graph, this point is determined as  $V_{max}$  (Henson and Chedrese, 2004).



The substrate concentration at 1 / 2 of the maximum speed is defined as the constant of Michaelis constant  $K_m$ .

Constant  $K_m$  can be defined as

$$K_m = \frac{K_{+1} + K_{+2}}{K_{-1}}$$

The speed constants from the reaction is  $K_{+1}$ ,  $K_{-1}$  and  $K_{+2}$ . In order to calculate reaction rate in terms of substrate and constant concentration, Michaelis has developed the following expression.

$$V_1 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

where :

$V_1$  = speed at any time

$[S]$  = concentrations of substrate at this time

$V_{max}$  = highest speed in this test condition

The  $K_m$  = Michaelis constant indicates the specific enzyme under investigation.



For many of the commonly used enzymes, Michaelis constants have been determined. The  $K_m$  size explains us a few things about a specific enzyme.

In order to be saturated, a small  $K_m$  shows that the enzyme needs only a small amount of substrate. Therefore, the maximum speed is achieved at relatively low concentrations of substrate.

In order to reach a maximum reaction rate, a large  $K_m$  shows the need for high concentrations of substrate.

Although not true for all enzymes, the substrate with the lowest  $K_m$  value that the enzyme acts as a catalyst is considered to be the natural substrate of the enzyme (Radger, 2007).

## EFFECTS OF INHIBITORS ON ENZYME ACTIVITY

Enzyme inhibitors are substances that change the catalytic effect of the enzyme and thus slow down or stop the catalysis in some cases. The three common types of enzyme inhibition are - competitive, non-competitive and substrate inhibition.

### 1. Competitive Inhibitors

When both substrate and substrate-like substances are binded to the enzyme, competitive inhibition occurs.

### 2. Non-competitive inhibitors

Non-competitive inhibitors are considered substances that alter the enzyme in such a way that it does not accept the substrate when binded to the enzyme.

### 3. Surface inhibition.

When an excess of substrate is present, substrate inhibition sometimes occurs.

## Feedback Inhibition (Allosteric Effectors)

The activity of some enzymes is controlled by specific molecules that bind to a particular regulatory (or allosteric) region on the enzyme, unlike the active site. Different molecules can either activate or inhibit the enzyme that controls the speed. A few enzymes can only do this, and these are usually at the beginning of a long biochemical pathway. They are usually inhibited by the product of the pathway and are activated by the substrate of the pathway so that they can only open the way when necessary. This process is called as feedback inhibition (Lima-Filo et al., 2004).

## TEMPERATURE EFFECTS

The speed of an enzyme catalyzed reaction increases with increasing temperature as like most chemical reactions. The activity of most enzymes will increase from 50% to 100% with the ten degree Celsius increase in temperature. Minor changes in the reaction temperature, such as 1 or 2 degrees, can vary between 10% and 20% in the results. This is a complex condition, when it comes to enzymatic reactions as the many enzymes are adversely affected by high temperatures. The reaction rate increases to a maximum with temperature, then drops suddenly with increasing temperature. Since most animal enzymes are rapidly denatured at temperatures above 40 ° C, most enzyme determinations are performed slightly below this temperature (Lima-Filo et al., 2004).

## pH EFFECT

Enzymes have the optimum pH at which they work most rapidly. For enzymes, this is about 7-8 (normal body pH), but a few enzymes, such as gastric proteases (pepsin), may work in an optimum pH of 1 in the stomach (Bisswanger, 2002).

## SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY

For Example / Dehydrogenase (DH):

Dehydrogenases are an important enzyme group that can be rapidly analyzed by UV spectrophotometry. These enzymes use  $NAD^+$  or  $NADP^+$  as coenzyme decreasing during dehydrogenation. Alcohol dehydrogenase (ADH) is a typical example that catalyses the reaction.



At 340 nm, reduced  $NAD^+$  (NADH) exhibits strong UV absorption, while the oxidized form shows virtually no absorption at this wavelength. Therefore, if one starts with enzyme, ethanol and  $NAD^+$  mixture in the

buffer, the reaction continues until equilibrium occurs. By measuring the increase in the absorption of the solution at 340 nm while NAD is being formed, the reaction can be followed.

This reaction sequence utilizes absorbance change at 340 nm to monitor (a) the reduction rate of NAD<sup>+</sup> with ethanol and (b) the NADH concentration when the reaction reaches equilibrium. The equilibrium constant for the reaction can thus be determined. The reversible reaction can also be showed by the effect of the change in the concentration of products on the equilibrium concentration of NADH (Pfeiffer, 1954).

## CONCLUSION

Enzymes are proteins that produce hundreds of enzymes to accelerate the speed of almost all reactions occurring in biological systems, including those involved in degradation, chemical and synthesis transfers, which reduces the amount of activation energy required to achieve a reaction for the progression of each cell. In doing so, they are responsible for making all the molecular changes related to their life processes.

## REFERENCES

- Bennett, T. P., and Frieden, E. (1969). Modern Topics in Biochemistry, pg. 43-45, Macmillan, London.
- Berg, Jeremy M., John L. Tymoczko, and Lubert Stryer.(2007). Biochemistry. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company.
- Bisswanger H.(2002) Enzyme Kinetics, Principles and Methods, Wiley-Vch.
- Castagnetto J, Honnessy S, Roberts V, Getzoff E, Tainer J, and Pique M.(2002). The Metalloprotein Database and Browser at the Scripps Research Insitute. Nucleic Acid 205. 30:p 379 .
- Holum, J. (1968).: Elements of General and Biological Chemistry, 2nd ed., 377, Wiley, NY.
- Henson MC, Chedrese PJ (2004). Endocrine Disruption by Cadmium; a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction, Exp. Biol. Med., 299:p 383 .
- Harrow, B., and Mazur, A. (1958).: Textbook of Biochemistry, 109, Saunders, Philadelphia.
- Ibers J and Holm R.(1980) Modeling Coordination sites in metallobimolecules. Science 209:p 223 .
- Lima-Filo, G., Aranjó, U. Alixo, S. and Morenos .(2004). Anew in vitro enzymatic method to evaluate the protective effect of phytic Acid aguist copper ion pak. Jul Nutr. 3(2)p 118 .
- Martinek, R. (1969).: Practical Clinical Enzymology: J. Am. Med. Tech., 31, 162.
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger.(2008): Principles of Biochemistry. 5th edition. New York, NY, USA: W. H. Freeman.
- Pfeiffer, J. (1954). Enzymes, the Physics and Chemistry of Life, pg 171-173, Simon and Schuster, NY.
- Radger , S ,(2007) . Toxic heavy metals and Modern livery , Environ . 98 , 1-11 .
- Tainer J, Roberts V and Getzoff E.(1992) . Protein. Metal-binding sites. Curropin, Biotechno. 3: 378-387.
- Thomas .J ,and Gillham . B, Wills,(1989) . Biochemical Basic of Medicine ,2nd ed ,Wright p157.

## Fabrication of polyethylene glycol-grafted polyacrylonitrile solid-solid phase change nanofibers

M.Selda Tözüm<sup>1\*</sup>, Sena Demirbağ Genç<sup>1</sup>, Sennur Alay Aksoy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Uşak University, Engineering Faculty, Department of Textile Engineering, Uşak, Turkey.

<sup>2</sup> Süleyman Demirel University, Engineering Faculty, Department of Textile Engineering, Isparta, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [selda.tozum@usak.edu.tr](mailto:selda.tozum@usak.edu.tr)

### Abstract

In this study, it was aimed to produce latent heat storing polyacrylonitrile nanofiber to be used as solid-solid phase change material. Nowadays, phase change materials, which storage and release large capacity latent heat during their phase change from one physical state to another, have attracted extensive interest. The solid-liquid PCMs have been encapsulated in a shell structure to overcome their some disadvantage such as the leakage, subcooling, low thermal conductivity, reactivity toward the outside environment, and flammability. Recently, the electrospinning technique has been utilized to encapsulate PCMs in a supporting polymer matrix in order to produce shape-stable phase change nanofibers (Noyan et al, 2018; Chen et al, 2013). Electrospinning technique can be used to electrospin shape-stable nanofibers from the solid-liquid PCM grafted polymer. In this study, poly acrylonitrile (PAN) nanofibers were produced by a needle electrospinning method. Polyethylene glycol (PEG) polymers with different molecular weight were grafted on PAN nanofibers using glutaraldehyde cross-linker. Thermal properties of the nanofibers such as melting and crystallizing temperatures and enthalpies were investigated by DSC (differential scanning calorimetry) analysis. DSC measurements showed that the enthalpy values of the nanofibers increased with the increase of PEG 1000 or PEG 2000 content. The highest melting enthalpy ( $\Delta H_m$ ) and crystallization enthalpy ( $\Delta H_c$ ) of the PAN/PEG1000 nanofibers are 57.32 J/g and -67.72 J/g, respectively, while those of the PAN/PEG2000 nanofibers are 127.4 J/g and -125.7 J/g, respectively. The chemical structure of the nanofibers was analyzed using Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. Scanning electron microscope (SEM) analysis was performed to investigate morphology of the nanofibers. The SEM results indicated that the nanofibers were cylindrical and had a smooth external surface

**Keywords:** nanofibers, phase change materials (PCMs), latent heat, polyethylene glycol, polyacrylonitrile

### INTRODUCTION

Phase change materials (PCMs) have attracted extensive interest because of their capability of storing and releasing large amounts of latent heat during their phase change from one physical state to another. The most important group of PCMs is organic materials such as paraffin waxes or n-alkanes, polyethylene glycol, fatty acids (Sarier and Önder, 2012). In this study, polyethylene glycol polymers were used as phase change materials and grafted on polyacrylonitrile nanofiber produced by electrospinning method to fabricate solid-solid phase change nanofibers. Electrospinning technique have been used to fabricate the phase change-composite fibers having unique advantages such as ultrafine size, huge surface-to-volume ratio, excellent thermal performances, being lightweight, and allowing direct use in various composites (Cai et al, 2012; Shao-Xing, et al, 2015; Noyan et al, 2018). In the literature, there are studies on the production of phase-changing nanofibers containing PEG polymer. Chen et al (2013), fabricated ultrafine phase change fibers (PCFs) with core-sheath structure based on polyethylene glycol/cellulose acetate (PEG/CA) blends via coaxial electrospinning (Chen et al, 2013). Dang et al (2015), fabricated poly(ethylene glycol)-loaded poly(vinylidene fluoride) (PVDF) nanofibers via single nozzle and coaxial electrospinning. They claimed that PEGs-loaded core/shell nanofibers had better thermal stability (Dang et al, 2015). Sarier et al (2016) produced PEG-graft-PAN copolymer thermo-regulating nanowebs by means of coaxial electrospinning (Sarier et al, 2016). Babapoor et al (2017) fabricated nanofibers with polyethylene glycol (PEG1000) core and polyamide 6 (PA6) shell by coaxial electrospinning (Babapoor et al, 2017). Noyan et al (2018), produced heat storing poly(acrylonitrile) nanofibers by coaxial electrospinning (Noyan et al, 2018). In the study, poly(ethylene glycol) methyl ethers (PEGMEs) and poly(ethylene glycol) (PEG) polymers as PCM core were encapsulated in PAN polymer sheath. In this study, polyethylene glycol (PEG) polymers with different molecular weight were grafted on polyacrylonitrile (PAN) nanofibers.

## MATERIAL and METHOD

### Material

In the study, polyacrylonitrile was used as polymer and dimethyl formamide (Sigma Aldrich) was used as solvent for the production of nanofibers with heat storage properties. PEG 1000 (Merck) and PEG 2000 (Merck) were used as the phase change material while 25% glutaraldehyde aqueous solution (Sigma Aldrich) was used as the cross-linker to grafted the nanofibers of the phase change material.

### Method

#### Electrospinning Process

A 10% PAN/DMF solution was prepared to be used in the production of nanofibers in the process of electrospinning. PAN nanofibers were electrospun using a single needle electrospinning instrument. In nanofiber production, the feed rate was adjusted to be 0.4 mL / h, voltage as 1.93 kV, and the distance between electrodes as 12 cm.

#### Production of PEG-grafted PAN nanofibers

In this study, different molecular weight PEG polymers were grafted to PAN polymer chains in order to give latent heat storage property to nanofibers. In the process, PAN nanofiber surfaces (0.5 g) produced by electrospinning method were immersed in PEG 1000 or PEG 2000 polymer solutions containing 1.5 g glutaraldehyde cross-linker and kept at room temperature for 24 hours. At the end of 24 hours, PEG grafted-PAN nanofibers were rinsed with water to remove residues on the surfaces. In the study, the amount of the PEG grafted on nanofibers were changed and PAN / PEG ratio by weight was used as 1: 1, 1: 5, 1:10. The properties of nanofibers were given in Table 1.

**Table 1.** Produced nanofibers and their properties

Nanofibers	PEG/Molecular weight	PAN:PEG ratio
PAN/PEG 1000-1	PEG 1000	1:1
PAN/PEG 1000-2		1:5
PAN/PEG 1000-3		1:10
PAN/PEG 2000-1	PEG 2000	1:1
PAN/PEG 2000-2		1:5
PAN/PEG 2000-3		1:10

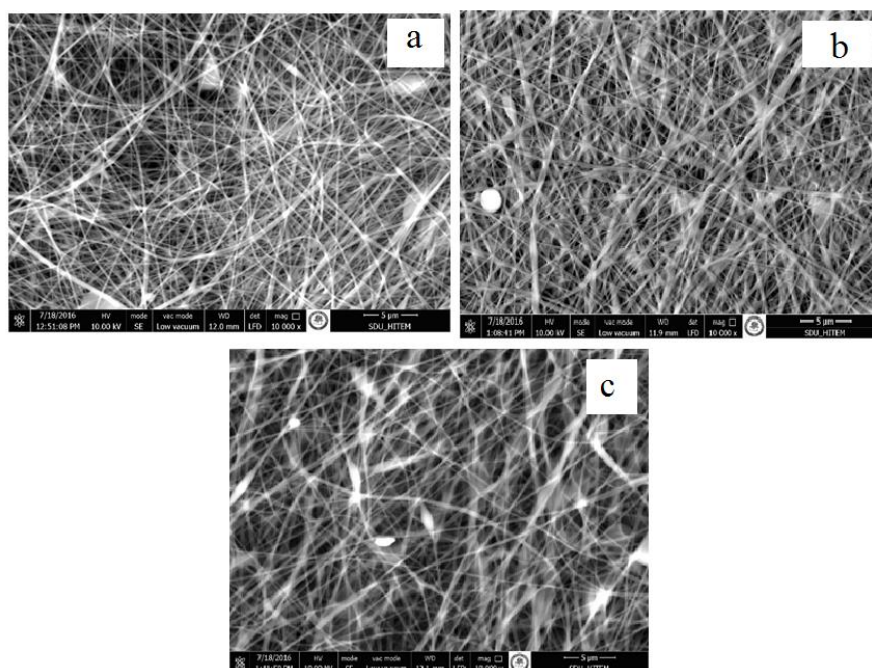
### Characterization of nanofibers

The morphology of the nanofibers was investigated using scanning electron microscopy (SEM). The diameters of the nanofibers were calculated using 50 different diameter values measured on SEM images of each sample using Digimizer image analysis program. Heat storage/releasing enthalpies and temperatures were investigated by differential scanning calorimetry (DSC) analysis and chemical structures were investigated by Fourier transform infrared (FT-IR) analysis.

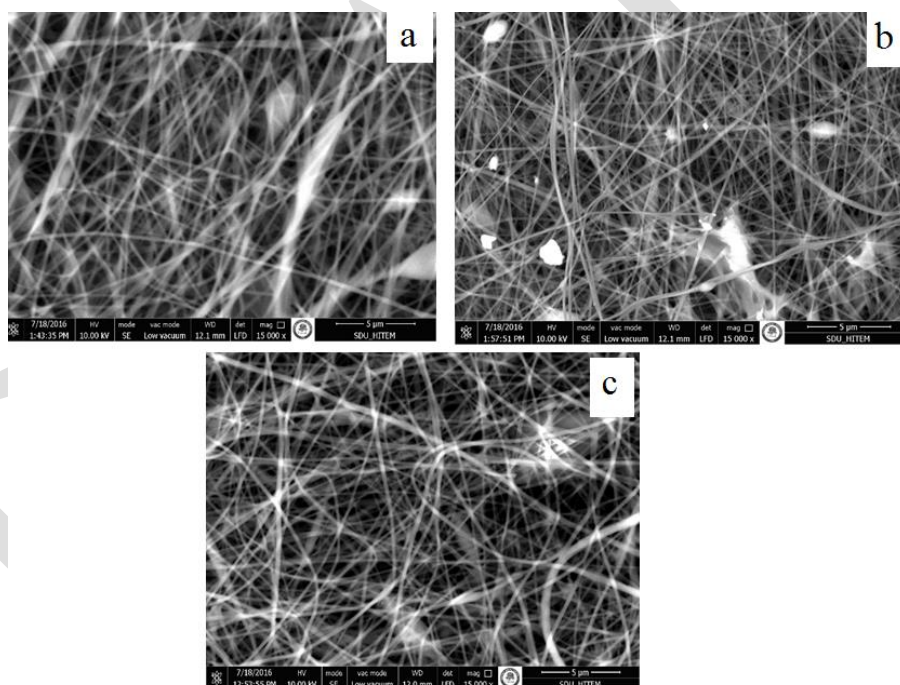
## RESULTS AND DISCUSSION

### SEM Results

Morphologies of PEG grafted PAN nanofibers were examined by SEM analysis and the obtained images are given in Figures 1 and 2. According to SEM images, nano-sized and uniform fiber formation was performed. In addition, grafting of PEG polymers onto PAN nanofiber surface did not adversely affect nanofiber morphology.

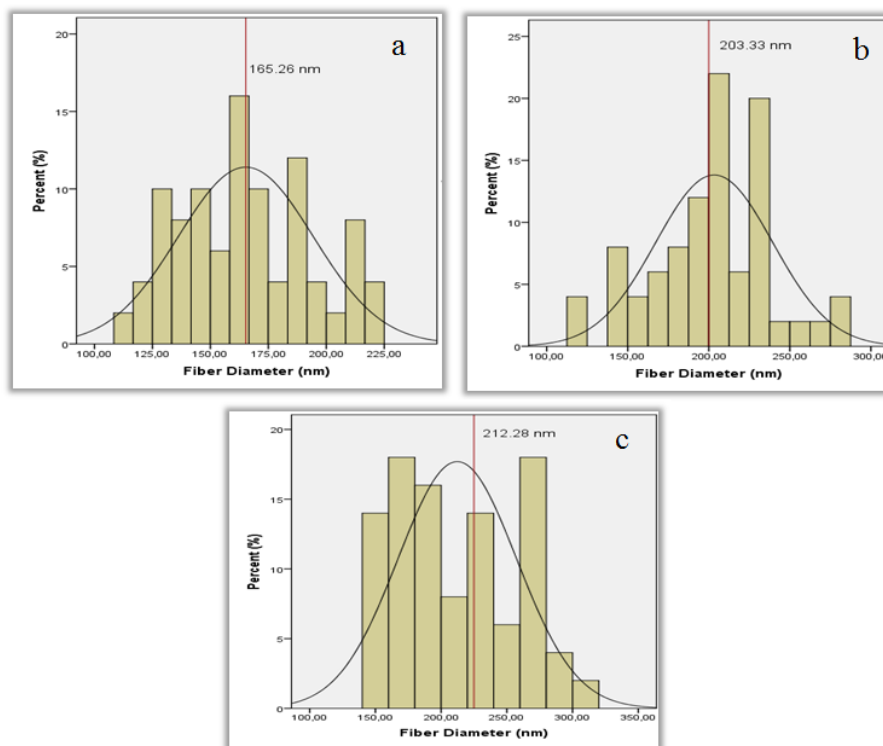


**Figure 1.** SEM images of PEG 1000 grafted PAN nanofiber (a: PAN:PEG1000 1; b: PAN:PEG1000 2; PAN:PEG1000 3 )



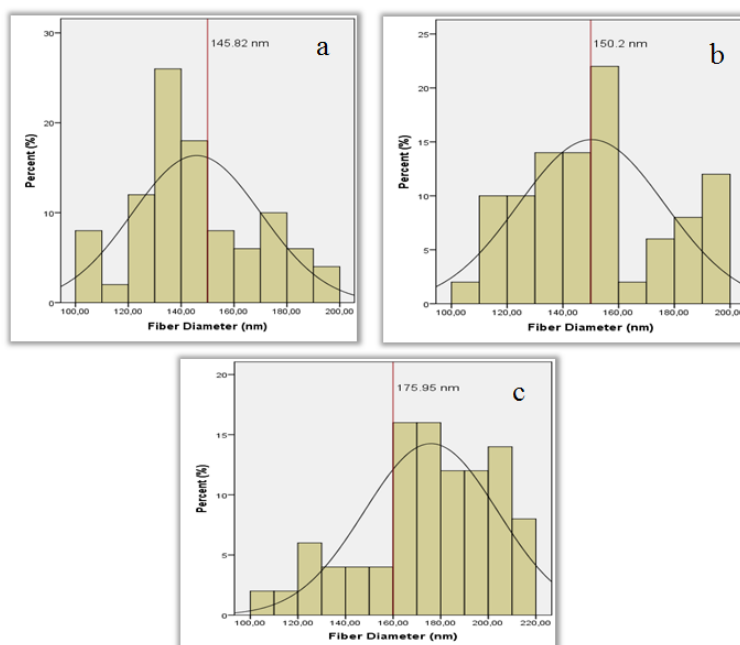
**Figure 2.** SEM images of PEG 2000 grafted PAN nanofiber (a: PAN:PEG2000 1; b: PAN:PEG2000 2; PAN:PEG2000 3 )

Diameter distribution graphs of nanofibers grafted with different amount of PEG 1000 polymer were given in Figure 3. According to the graph, PAN: PEG1000 1 nanofibers had the mean diameter of 165.26 nm and homogeneous diameter distribution. The mean fiber diameter of the PAN: PEG1000 2 and PAN: PEG1000 3 samples were calculated as 203.33 nm and 212.28 nm, respectively. It was concluded that fiber diameter increased as the amount of PEG grafted onto the nanofiber surface increased.



**Figure 3.** Fiber diameter distribution of PEG 1000 grafted PAN nanofiber (a: PAN:PEG1000 1; b: PAN:PEG1000 2; c: PAN:PEG1000 3)

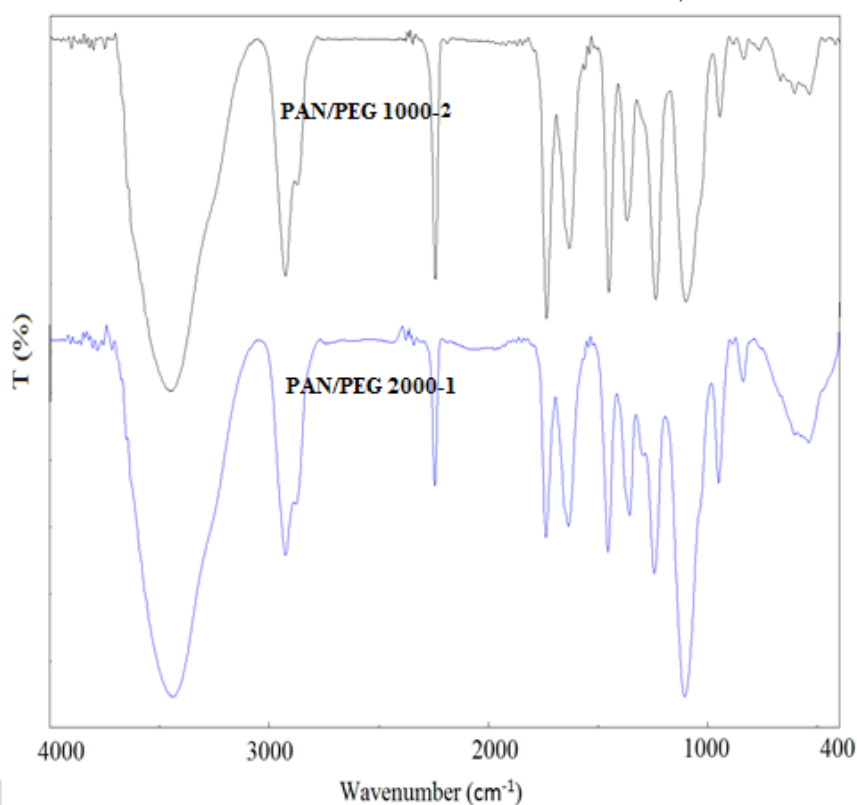
According to the Figure 4 that shows fiber diameter distributions of PEG 2000 grafted nanofibers, the fiber diameter of PEG 2000 grafted PAN: PEG 2000 1 sample varied between 102.94 nm and 199.86 nm and its average was 145.82 nm. The mean fiber diameter of the PAN: PEG 2000 2 nanofibers was determined to be 150.2 nm while the mean fiber diameter of the PAN: PEG 2000 3 nanofibers was 175.95 nm. As previous findings, the fiber diameter increased as the amount of PEG grafted onto nanofiber surfaces increased.



**Figure 4.** Fiber diameter distribution of PEG 2000 grafted PAN nanofiber (a: PAN:PEG2000 1; b: PAN:PEG2000 2; c: PAN:PEG2000 3)

## FT-IR Analysis Results

The presence of PEG polymer in the structure of the nanofibers was investigated by FT-IR analysis. The IR spectra of PAN-PEG 1000-2 and PAN-PEG 2000-1 nanofibers were given in Figure 5. The peaks at  $3402\text{ cm}^{-1}$  and  $1112\text{ cm}^{-1}$  wavelengths in the spectrum of the PEG polymer are characteristic O-H and C-O stretching peaks, respectively (Shameli et al., 2012; Kuru, 2012). These peaks appeared in the spectra of nanofibers at approximately  $3454\text{ cm}^{-1}$  and  $1102\text{ cm}^{-1}$  and proved the presence of PEG polymer in the nanofiber structure. Furthermore, PAN nanofibers have asymmetric and symmetrical bending vibrations of the methylene groups ( $\text{CH}_2$ ) at  $2900\text{ cm}^{-1}$  and  $1449\text{ cm}^{-1}$ , and stretching peak of nitrile groups (C-N) at  $2240\text{ cm}^{-1}$  (Ma et al., 2008; Zhang et al., 2009). The peaks appearing at  $2928\text{ cm}^{-1}$ ,  $2244\text{ cm}^{-1}$  and  $1454\text{ cm}^{-1}$  in the spectra of nanofibers were the C-N and  $\text{CH}_2$  bending peaks of PAN fibers, respectively.  $\text{CH}_2$  and C=O stress peaks at  $1738\text{ cm}^{-1}$  and  $2878\text{ cm}^{-1}$  were characteristic peaks of glutaraldehyde, indicating the presence of glutaraldehyde in the nanofiber structure.



**Figure 5.** FT-IR spectra of PAN-PEG 1000-2 and PAN-PEG 2000-1 nanofibers

### DSC Analysis Results

The results of DSC analysis of different amounts of PEG 1000 grafted PAN/PEG1000-1-3 and PEG 2000 grafted PAN/PEG2000-1-3 nanofibers were given in Table 2. According to the DSC measurements of PAN/PEG1000-1 nanofibers with 1:1 ratio of PAN/PEG, enthalpy value ( $\Delta H_m$ ) did not recorded. This result showed that this group of nanofibers did not have latent heat energy storage capacity. However, the PAN/PEG1000-2 and PAN/PEG1000-3 nanofibers produced at a PAN/PEG ratio of 1: 5 and 1:10 stored  $29.17\text{ J/g}$  energy at  $20.95\text{ }^\circ\text{C}$  and  $57\text{ J/g}$  energy at  $20.41\text{ }^\circ\text{C}$ , respectively.

When DSC results of PEG 2000 grafted nanofibers are examined, it is seen that latent heat storage temperatures ( $T_m$ ) of nanofibers vary between  $44.52\text{--}49.15\text{ }^\circ\text{C}$  depending on the amount of PEG used. Energy storage temperatures and enthalpies of PAN/PEG-2000-1, PAN/PEG-2000-2 and PAN/PEG-2000-3 nanofibers were recorded as at  $50.51\text{ J/g}$  at  $44.52\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $115.3\text{ J/g}$  at  $44.63\text{ }^\circ\text{C}$ , and  $127.4\text{ J/g}$  at  $49.15\text{ }^\circ\text{C}$ , respectively. It was concluded from results of DSC analysis, prepared nanofibers had very high thermal energy storage capacities and their energy storage capacities increased as the amount of PEG-grafted on nanofibers increased.

**Table 2.** DSC results of PAN/PEG 1000 1-3 and PAN/PEG 2000 1-3 nanofibers

Samples	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)
PAN/PEG1000-1	-	-	-	-
PAN/ PEG1000-2	20.95	29.17	10.87	-33.86
PAN/ PEG1000-3	20.41	57.32	11.22	-67.12
PAN/PEG2000-1	44.52	50.51	22.77	-48.63
PAN/ PEG2000-2	44.63	115.3	24.17	-111.7
PAN/ PEG2000-3	49.15	127.4	33.72	-125.7

## CONCLUSION

In this study, which aimed to produce nanofibers with heat storage properties, nanofiber production by electrospinning method was realized successfully. In the study, PEG polymers as phase change materials were grafted onto PAN nanofibers using a cross-linker. From the SEM images, it was observed that nano-sized and smooth structured nanofibers were produced. The average fiber diameters of the nanofibers ranged from 165.26 nm to 212.28 nm for the PEG 1000 grafted nanofibers, while ranged from 145.82 nm to 175.05 nm for PEG 2000 grafted nanofibers. The characteristic peaks of PEG polymers, PAN polymer and cross-linker glutaraldehyde were observed in the FT-IR spectra of nanofibers and their presence in nanofiber structure was proved. It was determined by DSC analysis that the melt enthalpy of PEG 1000 and PEG 2000 grafted nanofibers ranged between 29.17 J/g and 127.4 J/g and enthalpy values increased as the amount of grafted PEG polymer increased. Heat storage temperatures of PEG 1000 grafted nanofibers were approximately 20 °C, while the temperatures for PEG 2000 grafted nanofibers varied between 44-49 °C, depending on the amount of PEG.

## REFERENCES

- Babapoor A, Karimi G, Golestaneh SI, Mezjin MA. 2017. Coaxial electro-spun PEG/PA6 composite fibers: fabrication and characterization. *Applied Thermal Engineering*, 118:398-407.
- Cai Y, Ke H, Lin L, Fei X, Wei Q, Song L, Fong H. 2012. Preparation, morphology and thermal properties of electrospun fatty acid eutectics/polyethylene terephthalate form-stable phase change ultrafine composite fibers for thermal energy storage. *Energy Conversion and Management*, 64:245-255.
- Chen C, Zhao Y, Liu W. 2013. Electrospun polyethylene glycol/cellulose acetate phase change fibers with core-sheath structure for thermal energy storage. *Renewable Energy*, 60:222-225.
- Dang TT, Nguyen TTT, Chung OH, Park JS. 2015. Fabrication of form-stable poly (ethylene glycol)-loaded poly (vinylidene fluoride) nanofibers via single and coaxial electrospinning. *Macromolecular Research*, 23(9):819-829.
- Kuru. A, 2012. Tekstil Elyaf Teleflerinden Isı Depolama Özelliğine Sahip Isi Yalıtım Malzemesi Üretimi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 115, Isparta.
- Ma G, Yanga D, Niew J 2008. Preparation of porous ultrafine polyacrylonitrile (PAN) fibers by electrospinning. *Polymers Advanced Technologies*, 20, 147-150.
- Noyan, EC, Önder E, Sarier N, Arat R. 2018. Development of heat storing poly(acrylonitrile) nanofibers by coaxial electrospinning. *Thermochimica Acta*, 662:135-148.
- Sarier, N. Onder, E. 2012. Organic phase change materials and their textile applications: an overview, *Thermochim. Acta*, 540, 7-60.
- Sarier N, Arat R, Menceloğlu Y, Önder E, Boz EC, Oğuz O. 2016. Production of PEG grafted PAN copolymers and their electrospun nanowebs as novel thermal energy storage materials. *Thermochimica Acta*, 643:83-93.
- Shameli K, Ahmad MB, Jazayeri SD, Sedaghat S, Shabanzadeh P, Jahangirian H, Mahdavi M, Abdollah Y, 2012. Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol Mediated Silver Nanoparticles by the Green Method. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6639-6650.
- Shao-Xing S, Rui X, Xiao-Xue W, Guo-Qing W, Zhuang L, Wei W, Xiao-Jie J, Liang-Yin C. 2015. Fabrication of nanofibers with phase-change core and hydrophobic shell, via coaxial electrospinning using nontoxic solvent. *Journal of Materials Science*, 50(7): 5729–5738.
- Zhang Z, Li X, Wang C, Fu S, Liu Y, Shao C 2009. Polyacrylonitrile and Carbon Nanofibers with Controllable Nanoporous Structures by Electrospinning. *Macromolecular. Materials and Engineering*, 294, 673–678.



## General characteristics of white cheese

Salem Eljagmani\*, Ergin Murat Altuner

Kastamonu University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Kastamonu, Turkey

\*Corresponding author e-mail: aljagmanisalem@yahoo.com

### Abstract

In all north and east Mediterranean Sea and the Balkans, a variety of white cheese is made with just as much variety of processes and depending on the appeals and the surrounding circumstances when it comes to production, removing water, condensing, and aging of the cheese.

The entire cycle comprises the use of milk, starters, enzymes, required know-how, chemistry and micro-flora bacteria. In this cycle, there are modifications both in terms of chemistry and biochemistry once cheese is maturing in the mixture.

In the present review, we examine the various features of WBC (white brine cheese). Considering their chemical changes, impact of rennet and initiators or starters, homogeneity, and microbiology while aging. The present review of the WBC production and its practice is hoped to shed light on the process for producers to improve and achieve their expected yield quality, while also inspiring future work related to various stages to achieve the intended properties of WBC.

**Keywords:** Turkish white cheese, lipolysis, proteolysis, dairy products, lactic acid bacteria

### INTRODUCTION

The Mediterranean and the Balkans are both famous for their variety of cheese production, which is commonly made from milk of different domestic animals or a mixture of them (Bintsis and Papademas, 2002). Each one of these milks possesses certain characteristics in terms of digestibility in that particular family of animals. Many experts believe that some 1000 to 4000 different types of cheese exist around the globe produced with various brands; to provide examples, there is the Greek Feta, Egyptian Domiati, Turkish beyaz peyniri (meaning “white cheese” and most favoured for morning meals), and Cypriot halloumi (commonly melted for morning meals) among the numerous alternatives. Yet, some brands are not as popular and well-known – among them Greek batzos and Bulgarian brinza.

One can claim that such variety originates from similar sources, which have been later exposed to numerous applications and tastes depending demography and the environment. Most are often drained and added salt to keep them for longer periods – which implies that the salt content can vary for this reason. Once aged, the cheese is kept in salt water – a custom that often makes such variety possible, in particular within parts of the world as Europe where environment and weather varies from the rest and, thus, impacts the degree of salt applied to cheese (Hayaloglu et al, 2008).

As a custom, cheese used to be produced from as artisanal from unprocessed milk and reliance on naturally-occurring bacteria present in milk - in particular those of lactic acid – in order to make milk more acidic. To provide further background, some bacteria are probiotic, others are of lactic acid quality, and a third main species is known as actinobacteria. Lately, there has been growing interest in white cheese in salt water among consumers, giving rise to increased production by manufacturers of milk products to satisfy demand. In this respect, both bovine alone or in combination with other milks are applied, commonly sterilized and disinfected and later mixed with numerous starting agents.

In terms of microbiology, the characteristics of these cheese products may be affected in many ways, namely the overall milk quality in use, sterilization/heating, techniques to make cheese and the nature and extent of spoilage occurring throughout the various stages of production and also while the cheese is stored before heading to the market. To determine quality, the overall number of bacteria alive is a measure generally in use for food material. Cheese products are aged extensively in salt water to add to their useable lifetime. This process is greatly affected by major micro-florae to age the product and, up to a certain extent, maintain its overall conditions. Apart from these factors, the issue of food security and expiry date of the products also rely on such micro-flora and the role they play (Bintsis and Papademas, 2002).

## CHEESE PRODUCTION

### Milk Properties

For cheese with quality worthy of use by the public, it is crucial to utilize raw milk with bacteriologically and chemically acceptable standards in production. These characteristics comprise increased casein, high rennet condensation, and absence of any form of antibiotics, solvent or detergent, sterilizers and other chemical remains and residues, *E. coli*, *Clostridium* and *Bacillus* that can generate gas inflammation and soft deformities. Also, to remove any pathogens and disease-generating microorganisms, the best way is heating the milk by which all such agents are rendered harmless. Yet, such processing at the same time kills the lactic acid agents that make cheese and butter. As a result, starter agents guarantee the presence of such bacteria necessary to make cheese, avoid acidic formation, and generate spores soon enough to remain active throughout sterilization.

These cells or spores develop an effective status within the microbial culture, and eventually remove the flora, thereby altering cheese properties and rendering it unusable. In this way, it can be asserted that the chemical mix in the milk highly influences the quality of the cheese made.

For an acceptable end-product, therefore, premium-quality milk is most favoured to make cheese by means of regulating the proportion of casein to fat as 0.6, 0.9, 1.2 or 1.5. According to Aksoydan (1996), the best cheese is made with 0.6 or 0.9 on the above-stated ratio, and variations in this regard can significantly affect the ideal end-product. Another major element in making cheese is – as stated earlier – the chemical configuration of the milk itself.

According to Gollu and Kocak (1989), to standardize casein-to-fat at 0.8 can improve all solid compounds, unstable fatty acids, the taste and flavour in common Turkish white cheese; yet, as Hayaloglua et al (2002) claim, this rate at 0.7 is better for achieving these qualities.

### Cheese-Making Procedure

Different brands of white cheese are made – anywhere allowed by regulations – with fresh and pasteurized cow milk at about  $72\text{ }^{\circ}\text{C} \times 15\text{ s}$  according to Sabbagh et al (2010); another option is  $63\text{ }^{\circ}\text{C} \times 30\text{ min}$ , or heated – again, if allowed by regulation - at approximately  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \times 5\text{ min}$  using ewe, goat, buffalo or cow milk and even a mixture of all. Most cheese in salt water contain coagulated rennet, but there are some which contain no water and only salt is added – Feta is an example – while in others milk is supplied with salt in advance – Domiati being an example. In the past, yoghurt would be used to start most cheese processes; yet, present-day practices include numerous other cultures, namely thermophilic agents like yoghurt, and also mesophilic ones at higher temperatures. For cheese mad of fresh milk the local microflora within the milk can be applied to further acidify the product (Alichanidis and Polychroniadou, 2008).

A common illustration cannot be formed for all white brined cheese products, though the overall picture includes the following features as in Figure 1.

The main elements to consider when white cheese in brine is made are as follows:

- It is crucial to acidify the curds within accurate ratio and duration in the initial stages of curdling and draining. This is because the formation of lactic acid in these two steps is rather decisive in the quality of the cheese; if the speed or acidity level is not high enough, harmful organisms can get shaped as a result of gas formation. Such an occurrence is common in case of fresh milk used for production. On the other hand, if the process is accelerated or acidity is beyond the stated levels in the curd, there are other unfavourable results such as excessive drainage, reduced yield and too dry, firm, and spotty texture, and less coagulation - in particular, with goat or cow milk.
- When ripening, the pH levels are important In most cases of cheese production, this level should not exceed 5.0 after one day, moisture should remain below  $600\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and finally S/M (salt-in-moisture) to remain about  $25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Later on, the products are moved to cold storage at  $4\text{-}5\text{ }^{\circ}\text{C}$  once the pH is about 4.6 or less, moisture approx.  $550\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and S/M beyond  $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Enough salt water mixture is needed in containers to cover the blocks entirely, with salt content at min. 2 % over the S/M (Alichanidis. 2007).

Fresh milk  
↓

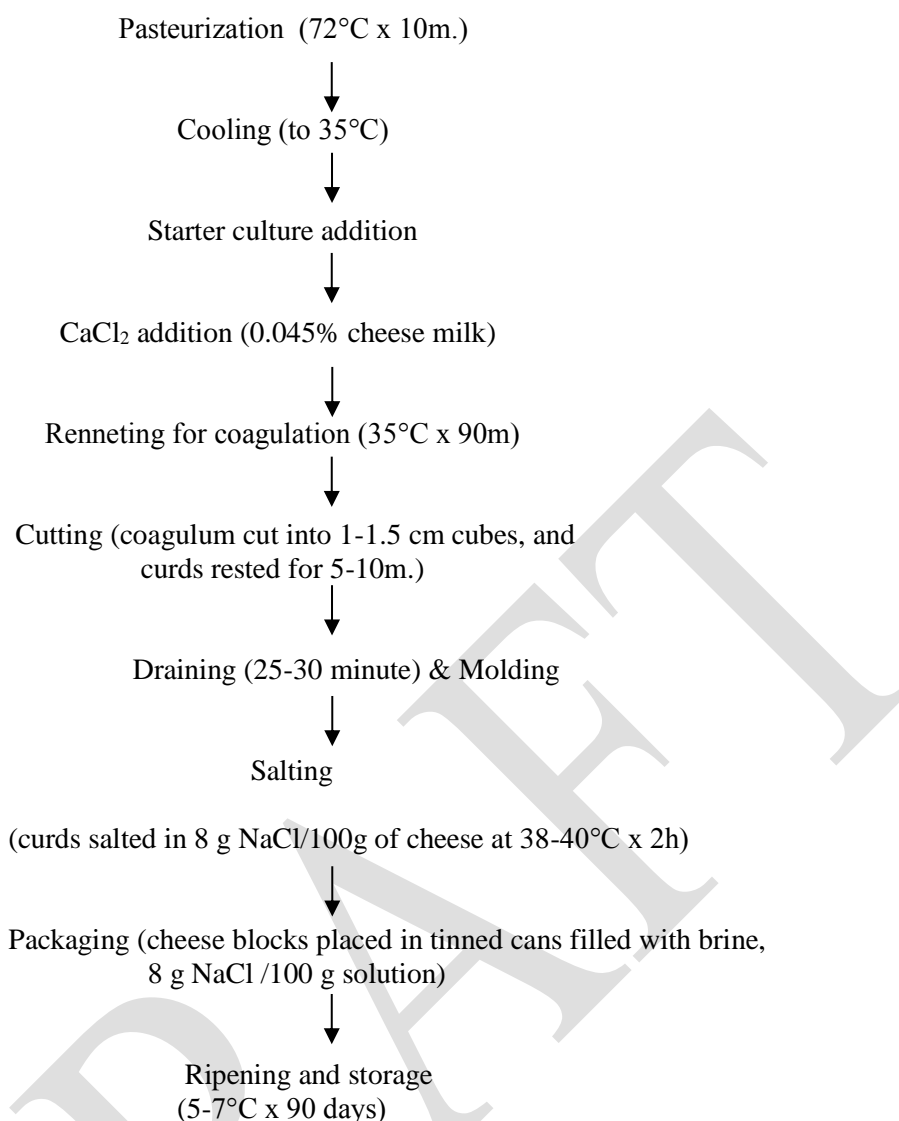


Fig. 1. White cheese production (Ozcan and Eren-Vapur, 2013)

## CHEESE PROPERTIES

As the abbreviation WBC implies, this is cheese is white in colour with porcelain, marble and snow hues once made from sheep, goat and buffalo milk. Other variations can be off-white and even yellow in case of cow milk, which is often expected by many to yield a rather pure white colour. To deal with this issue, anywhere the regulations allow, certain additives – among them, chlorophylls and titanium dioxide - or other alternatives can be applied to alter the otherwise not-so-popular yellow in cheese. White cheese in essence contains no crust or rind, and no other form of opening is to be visible within its bulk other than occasional mechanically induced ones; otherwise, gas openings of any size are considered as flaws in production. In terms of texture, this cheese is even, not hard, and breakable, yet easy to cut, and even crumbly as time goes by.

As for shape, it depends on the packaging and, often times, in rectangles and cubes measuring between a quarter of a kilogram and more than one kilogram. According to these criteria, packaging takes place – most preferred ones being rectangles in tin, lacquered metal or plastic packs of about 15 to 18 kilograms – using salt water. In case of minor and specialist producers in certain locations, there is also whey added with 80 to 100 g·L<sup>-1</sup> salt to the mix.

A very old custom widely in use even today by some producers requires aging and storing cheese in wooden barrels weighing about 50 kg in the form of a sphenoid. To sell the product, blocks weighing anywhere between half a kilogram to 1 kilogram are wrapped in plastic bags upon ripening and in airless or vacuum form both with or without salt water, which is intended to make cheese last longer (Alichanidis and Polychroniadou, 2008).

## THE RIPENING PROCESS

It is fair to state that one may not properly and sufficiently provide an explicit way to produce cheese, the reason being the many different kinds of milk, alternative methods, regulations and geographical locations that diversify the production process.

In ripening, five factors are essential; these are: coagulants in the form of rennet or other allowed material; endemic milk enzymes; primary starter (bacteria); secondary starter (again, bacteria); and finally nonstarter bacteria. Three main biochemical actions occur during the ripening; first the surplus lactose is glycolyzed along with mono saccharides (glucose and galactose); then lipolysis takes place, followed by proteolysis.

White cheese predominantly alters in terms of its qualities once salt water is applied during ripening, which can last anywhere between a couple of weeks to months. Given reduced pH levels, increased salt and a rather quick ripening process, not many biochemical modifications take place, and some lactose – about 10 g.kg<sup>-1</sup> – will continue to remain in the product (Hayaloglu et al, 2002).

As regards ripening, this entails an advanced and intricate operation demanding curd disintegration by means of proteolysis, lipolysis and other enzyme-induced processes to provide the desired flavour and texture according to the brand. Of these processes, proteolysis and lipolysis play the most essential role in terms of triggering change for ripening purposes. Lipolysis has been claimed to be noteworthy in itself to properly ripen the cheese according to Bakirc et al, (2011). Yet, in particular, a majority of curds need proteolysis to realize proper these outcomes the end product. In what follows, we will look at these two processes in further detail with sample content analysis for different types of cheese.

### Proteolysis

Of significance in maturing cheese, proteolysis shapes the texture along with the overall flavour expected from any of the different variations of this product – even to carry on after storage in salt water or brine, whose ratio of salt to the solution can affect the speed and efficiency of proteolysis at any time thereafter.

The condensing enzyme present in milk itself helps boost proteolysis as a result of high pressure exerted on the curd in the presence of increased moisture, as well as during the storage period in brine carrying residual coagulants.

According to Kaymaz (1982), in Turkish white cheese, during ripening, only five amino acids can be found, namely as leucine, phenylalanine, arginine, isoleucine and methionine. The same author adds that such formation may be taken as the standard to ripen and apply (or not) starter agents in making Turkish cheese using sterilized cow or sheep milk. Table 1 shows the FAA (free amino acid) values during ripening in some test trials. Accordingly, it can be seen that FAA values advance during the process, with leucine, glutamic acid and valine as the most prominent throughout the whole cycle, followed by serine, phenylalanine, isoleucine and alanine. As for the Feta cheese, lysine, leucine, valine and phenylalanine stood first in FAA ranking for controlled test sample properties in tests; though similar amino acids were seen in Iranian WTB after 50 days of ripening. This occurrence did not last all to the end of the period, as was the case with Feta, In other words, lysine (abundant in dairy products), arginine and glutamic acid appeared at most at the final stage (Hayaloglua et al, 2002).

Table 1. Different WBCs and FAA contents (Hayaloglua et al, 2002).

Amino acid	Turkish White Cheese (mg/100 g cheese)			Greek Feta Cheese (mg/100 g dry matter)			Iranian Brine Cheese (mg/100 g cheese)					
	Age of cows' milk cheese (day)d			Age of sheeps' milk cheese (day)d			Age of sheeps' milk cheese (day)			Age of cows' milk cheese (day)		
	1	60	120	1	60	120	1	60	120	1	60	10
Alanine	1.25	20.05	38.55	1.44	16.21	47.66	3.1	31.0	106.5	0.53	13.23	61.13
Arginine	1.50	4.95	4.65	0.95	5.60	5.81	7.2	12.7	2.3	0.63	40.05	144.07
Aspartic acid	0.0	4.05	12.4	0.16	9.0	18.20	2.7	18.7	23.5	0.27	9.20	19.02
Cysteine	0.92	10.55	18.4	0.9	9.20	10.62	NDe	1.7	15.5	0.25	0	5.44
Glutamic acid	5.68	58.4	107.6	8.8	68.75	141.6	2.6	10.5	8.0	1.4	57.38	72.4
Glycine	0.43	6.1	10.95	0.18	2.98	10.18	8.9	9.4	24.8	0.2	6.69	16.62
Histidine	1.03	5.85	19.6	2.2	7.7	11.62	1.4	6.9	9.7	0.72	10.58	14.85
Isoleucine	1.11	20.5	37.35	1.16	14.22	40.3	1.7	24.4	61.4	1.7	0	14.8
Lysine	2.55	20.75	48.0	0.56	6.72	58.72	5.1	131.3	107.7	2.97	33.79	80.78
Leucine	3.36	96.2	120.95	1.17	108.40	192.6	5.8	167.5	289.8	0	66.57	54.75
Methionine	0.75	16.45	28.55	1.40	14.65	28.22	4.8	15.9	34.3	0.31	6.3	5.73
Phenylalanin	1.49	40.1	54.0	2.26	29.66	67.0	2.8	82.3	127.4	0.89	50.44	38.63
Proline	2.13	12.0	20.55	1.7	12.3	29.45	6.1	38.2	83.7	2.42	46.36	57.25
Serine	3.26f	49.40f	78.85f	1.48f	21.2f	87.28f	7.0	36.3	77.4	0.56	8.04	9.56
Threonine	0.59	9.15	14.85	1.42	12.20	17.47	1.5	13.1	64.9	0.72	0	53.9
Tyrosine	3.63	12.75	16.05	2.0	7.82	9.88	3.0	16.9	15.4	0.3	5.98	5.49
Valine	1.23	24.3	66.85	2.26	39.26	76.27	5.1	61.6	125.8	0.87	29.71	28.15
Total	31.81	411.55	698.15	30.04	385.87	853.08	68.8	678.4	1178.1	14.74	384.5	682.57

### Lipolysis

Just like proteolysis, this process does not have a wide range in WBC production, and FFA (free fatty acid) values and acetic acids are 2-4 g·kg<sup>-1</sup>. FFA amounts and forms are naturally affected by milk, aging, and many other criteria.

Cheese made with fresh or thermal-treated milk in sub-pasteurization settings often have more FFA since local milk lipase stays the same or only partially treated. In spite of cultures having less lipolytic reaction, some can add to FFA amounts in the same way water removal from the curd does at higher temperatures of about 21 °C.

Kandarakis I. et al (2001) report elevated FFA values in case of common artisanal rennet and its paste. Also, according to Moatsou, et al (2004), such values in comparison to VFA (volatile fatty acids) are more in case of products using sheep or goat milk as opposed to cow milk. Regardless of the milk, however, the acetic acid remains the most likely VCA (volatile carboxylic acid).

### WBC QUALITY – DETERMINING ELEMENTS

#### Starter Culture

Cultures are mainly used to change lactose to lactic acid, thereby altering many characteristics of the cheese such as condensation, retaining coagulant and milk clotting in curds, the amount of proteolysis during storage, the overall product yield, ideal moist, and pH values which drop when making cheese (Pappas et al, 1996). Different mixtures of such cultures comprise thermophilic and/or mesophilic bacteria used for conventional Turkish WBC (Table 2).

Uysal (1996a) used a lactic culture of 1:1 as a mixture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in two stages to make Turkish WBC, and then assessed the product in storage for three months. According to the outcomes, there was an elevation in the values of acidity, salt, nitrogen compound which is water-soluble, and ripening index, and a drop in the values of pH and overall nitrogen in the product. Also, proteolysis at the ideal level improved along with the starter.

Recently, Gursoy, Gursel, Senel, Devenci, and Karademir (2001) assessed thermal treating at 65°C x 20 m and its effect on *Lactobacillus helveticus*/*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacterias (at 0.5 g/100 g) while

producing of Turkish WBC low fat as an addition to speed up the ripening. Under these circumstances, acid formation takes place by lactobacillus serving as additional culture, which also improves aging. The thermophilic characteristic of this bacteria allows for it to remain active even at 100 degrees or boiling point, and continue to acidify the coagulation until it cools.

The authors indicated that the heat-treated cultures reactions could be utilized successfully in regards to producing low-fat White cheese to shorten the ripening period. More specifically, the additional bacteria added guarantee the achievement of intended proteolysis values and the overall status of the cheese within a month of ripening. Ideal outcomes can be obtained using the thermophilic *Lb. helveticus* bacteria. It is stated in that study that lactic cultures are needed all along the ripening stage for traditional Turkish WBC. In addition, salt and acid concentrations are to be maintained at a proper level to tackle harmful microorganisms like Staphylococci, Clostridia and certain Gram-negative bacteria for the best results (Hayaloglua et al, 2002).

Table 2. Starter culture applied in common Turkish WBC (Hayaloglua et al, 2002)

Microorganisms	References
<i>Lactococcuslactis subsp. cremoris</i> + <i>Lactococcuslactis subsp. lactis</i> + <i>Leuconostoccremoris</i>	Ucuncu (1971); Celik (1982)
<i>Enterococcus durans</i> 41770+ <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CH2	Tunail (1978)
<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> + <i>Lc. lactis subsp. Lactis</i> .	Kaymaz (1982); Tekinsen (1983); Kurt (1991)
<i>lactis subsp. lactis</i> + <i>Lb. casei</i>	Yildiz, et al (1989)
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> + <i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> + <i>Lactobacillus sake</i>	Akgun (1995)
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> + <i>Lb. casei</i> and/or <i>Lb. plantarum</i> .	Ucuncu (1999)
<i>Lc. lactis subsp. lactis</i> + <i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> + <i>Lactobacillus helveticus</i> .	Gursoy, et al (2001)

### Rennet and Other Coagulants

Milk thickening or coagulation is possible in WBC production by means of an enzyme removed from calf or goat stomach. Rennet today is in more demand given the increased rate of cheese consumption across the world, forcing producers to find other alternatives to access this substance. Among these, there are enzymes – for example, lipase, chymotrypsin, trypsin, papain, and cysteine protease obtained from papaya – taken from both plants and animals and regarded as an alternative for producers of cheese. There are new genetic developments today which provide us with fresh perspectives into large-spectrum milk fermentation by means of modified enzymes to replace conventional animal-based options. According to Ozcan and Eren-Vapur (2013) – and to illustrate the case - calf rennet-chymosin may be replaced with genetically modified yeast and fungus.

WBC production in the last few years has experienced a wide range of applications as regards microbial proteases - an enzyme essential in proteolysis – due to its role in extracting alternative thickeners from bovine, porcine and chicken for example, as well as proteinases from microorganisms. Some of these can be named as mucormiehei, mucorpusillus, penicillium roqueforti, penicillium camemberti and cryphonectria parasitica (Vishwanatha et al, 2010).

Experiments show calf-based rennet is applicable in making Feta cheese, though the process requires maximum proteolysis. The work by Yesilyurt (1992) outlines minor changes in crust or dry matter, fat and salt values, the yield, and titratable acidity when making Turkish cheese using calf rennet as opposed to only two microbial rennet, mainly fromase or rennilase from *R. miehei*. Nevertheless, there were major changes in other values as the overall FFA and water-soluble nitrogen using these two alternatives for ultra-filtered milk.

Furthermore, it was also observed that the readings of water-soluble nitrogen, free tyrosine, ripening index, and non-protein nitrogen slightly increased during the first sixty days period of storage in the cheese made with microbial rennet. However, the sensory quality of cheese made with calf rennet was better than that of the other samples. A different test carried out in the same study reveals chicken pepsin or its combination with

calf rennet with a ratio of 50:50 or 70:30 to not greatly impact the values of the water-soluble nitrogen, acidity, sensorial scores, and pH in product specimens. Furthermore, the sensory properties of the product from calf rennet is shown superior to that of other samples.

A separate work by Hayaloglua et al, (2002) looks in to many enzymes, among them Rennilase 150L (from *R. miehei*), Maxiren 50 (from *Kluveromyces marxianus* var. *lactis*), and Fromase 46T (from *R. miehei*). These are applied as replacements for thickening instead of the common calf-based rennet to make Turkish cheese. Among these agents, Maxiren 50 alone shows similar rate of activity to calf rennet, thereby possible to be an alternative (Hayaloglua et al, 2002).

### **Homogenization using Pressure, Heat and CaCl<sub>2</sub>**

Studies have been conducted to examine the impact of different practices of homogenization in terms of cheese-to-milk composition and overall intended production yield. These practices are carried out in the following way.

Pressing occurs once cheese is moulded. Here, coagulation is still prone to the final pressing to allow the final release of whey, consolidate the texture and shape, to provide the cheese rind formation by long maturation periods. In this process, the rate and amount of pressing varies from one cheese brand to another, and it needs to be slow since a lot of pressure in early stages deforms the upper layer and maintain an even amount of moist inside the cheese block. Once complete, pressing is followed by applying heat to disinfect or pasteurize the product.

European countries have a very tight control over the quality of milk for mainstream cheese manufacturing and, hence, thermal processing and sterilization are applied to most milk and regardless of fat content. Otherwise, the products must be aged for a minimum of two months below 4°C to guarantee food safety and avoid pathogenic growth. Commonly speaking, different countries have different procedural protocol in this respect and for specific brands. In terms of using calcium chloride, once the milk is heated over 56 °C, the thickening property is affected owing to a significant drop in Ca<sup>++</sup> ions, in turn making water removal and drainage more challenging later. To tackle this issue, limited pasteurization is allowed in some cases and upon applying higher temperatures and supplying CaCl<sub>2</sub> to the mix. In case of Turkish WBC, this additive can be used up to a max. of 200 mg/kg (%0.02). Prior to its application, CaCl<sub>2</sub> must be dissolved in sterilized water and later added to and mixed with milk.

Within the period in between the stages, the fat content is evenly distributed via homogenization process, thereby changing the chemical bonds and equilibriums. In particular, this occurs in the colloidal stage caused by surface active fractions within plasma proteins – mainly, casein – taking part in re-arranging homogenized fat molecules. The result is, as stated before, transformation in the physiochemical properties of the milk being used.

Pasteurization generates ash and calcium el regarding cheeses, in contrast to these substances of required: amount of dry matter, ash, ash in dry matter, calcium compound in whey reduced depending the pasteurization process. Whereas the amount of fat in the homogenized test specimens appeared higher, other elements as dry matter, pH, and calcium were found to be less in the whey of the same samples. Also, pH levels were less in the drainage samples, hence resulting in further calcium loss within the curd formation stage. Expected yield was more within the studied samples that were homogenized, pasteurized and CaCl<sub>2</sub>-supplied. In all, these three stages proved to contribute to the overall yield and its quality (Ocak, et al, 2014).

### **Salting**

Adding salt is essential in just about any type of cheese making because it may not supply flavour, but it does impact the general properties, evenness, texture, and appealing of the cheese blocks, as supported by Turhan and Kaletunc (1992). The amount of this ingredient, of course, depends on the type of cheese; in case of cottage and Emmental cheese, the acid curd in salt can be between 0.5 and 0.7% (w/w), and 4 and 7% (w/w) in pickled cheese like Domiati and Feta.

Three main purposes are served by salt addition: (1) naturally preserving the aging process and long storage; (2) enhance the flavour; and (3) supplying sodium as a nutrient needed for bodily actions like blood pressure stabilizing, tissue insulation, cell water osmosis, and nervous system pulse transfers. The salt affects cheese manufacturing in other ways as like proper rind formation, maturing, and avoiding infectious growth detrimental to cheese and human health.

To provide further detail, water in solution form facilitates chemical reactivity in the products, thus avoiding unwanted micro-organisms, regulating enzyme functions, biochemical changes while maturing takes place, and adding aroma and taste. These effects of salt on cheese have also been confirmed by Hayaloglua et al. (2002) and Bakirci et al. (2011) as to pH, calcium, and protein changes affecting texture, consolidation, and solubility

## WBC MICROBIOLOGY

In all its different kinds, white cheeses is mostly common across the north and east Mediterranean region as well as the Balkans, being made from various milk supplies like ovine, buffalo, bovine and caprine, or their combination. Examples include – as stated in the Introduction - Domiati of Egypt, Feta of Greece, beyaz peynir of Turkey, and halloumi of Cyprus as the most popular ones, followed by not-so-familiar versions as Greek batzos and Bulgarian brinza. They all have relatively similar sources, though demand and production processes change them accordingly. They are primarily of artisanal nature with fresh milk and ordinary micro-flora applied for acidification – mainly bacteria thriving in lactic acid. Milk, at the same time, is pasteurized as part of the process.

Many elements impact the microbiological status in WBC; these are the milk itself, its pasteurization, and the degree and nature of microorganism growth. Other factors include technological aspects of production and storing. Such storage in salt water for a certain amount of time is vital to mature the cheese and make room for major micro-floras to do their functions, thereby maintaining the overall cheese quality in the end. As such, the presence of the right micro-flora as a whole significantly affects the end product (Bintsis and Papademas, 2002).

### Natural Flora

WBC making requires pasteurized milk, but the choice of starters is an entirely different issue and relies on the purpose and type of cheese. These starters comprise different families of bacteria, whose type and volume changes accordingly to make premium and healthy products. Starters add to milk acidity since the original bacteria disappears prior to aging maturation and allows the thickener to settle the cheese.

Many such cultures have been examined, and the outcomes show the subspecies of *Lactococcus lactis* – a mixture of *Lactobacillus delbrueckii*. and ssp *bulgaricus* - or even yogurt culture at 5–10 mL L<sup>-1</sup> to offer promising solutions to acidify milk. Yogurt culture, though, has been contended as the mainstream substance since it can be made and kept with no time constraints. Yet, from the testing perspective, it offers less pH, yield, and moisture in the cheese, which can be improved if an increase level of starter culture was used throughout manufacturing steps (Litopoulou and Tzanetaki et al, 1993; Pappa and Anyfantakis, 2001).

### Pathogens and Other Micro-flora

For long, milk-based products and conventional cheese were regarded harmless and beneficial to people. Yet, as time went by, studies revealed the potential danger of unhealthy microorganisms present in cheese, namely *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli O157:H7*, and the common *Staphylococcus aureus* - a form of coccal bacterium – to mention only a few. To this end, manufacturers improved certain operations and functions based on the criteria set by Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP). WBC-making later incorporated thermalize treatment of fresh milk – that is, heating it to 65°C for 15-18 seconds to remove bacterial growth and other harmful microbes.

In spite of these efforts, some pathogens such as *L. monocytogenes* and *E. coli O157:H7* have been shown to remain active in these temperatures, causing spoilage in cheese. Such survival has been linked with numerous causes, some of which cannot be eliminated by simply heating the raw milk. Among the related issues, researchers point to resistance to acid and salt present in the thickener, pre-heating contamination present in milk, and cheese composition depending on certain bacterial growth – all of which factors can give riser to a variety of microorganisms. To illustrate, WBCs mature at about 16–20°C in pre-maturation stage, which lasts for 2–3 weeks before salt water is used to immerse the blocks. Given the right conditions, pathogens may grow in large quantities within these temperatures. Nevertheless, it is paramount to use the right counteracting micro-flora to better manage such unwanted micro-organic formations (Bintsis and Papademas, 2002).

According to Alper and Nestrin (2013), the Total Aerobic Mesophilic Bacteria (TAMB) count in many specimens of WBC found in the market place presented for sale in bazaars of Çanakkale, was about  $5.2 \times 10^4$  to  $5.68 \times 10^{11}$  cfu/g, with the mean TAMB at  $3.7 \times 10^{10}$  cfu/g. Additionally, many other formations of coli forms, enterococci and staphylococci in large quantities were detected and compared with other studies. The authors



maintained that these high values can occur only if the product is put on sale prematurely – a point confirmed by other studies, which refer to small counts in TAMB within sufficiently matured cheese samples. Apart from this, such differences in results were also attributed to other factors as diverse manufacturing or storage practices.

Given the non-mechanized nature of Turkish WBC production, it may be stated that it is more likely to host different microorganisms at any point within the stages. As to the sixty samples used for the present work, we found the *E. coli* count at about  $1.0 \times 10^3$  and  $9.58 \times 10^8$  cfu/g, and for *E. coli* between  $1.2 \times 10^2$  to  $3.6 \times 10^8$  cfu/g. According to the Turkish Food Codex 2011, the uppermost coli count allowed is 95 cfu/g, with no *E. coli* or *Salmonella* spp to be observed any amount (Alper and Nesrin, 2013).

In another study published by El Sayed et al (2011), which examined a total of 70 samples of the Egyptian white soft cheese and specimens of various brands like Domiati, Tallaga, Feta, and Kariesh - 30, 15, 10, 15 specimens, respectively – made in Egypt. The specimens were taken from public markets in Cairo and Giza, and their microbiological configuration revealed mycotoxins, aerobic colony bacterial counts (ACC), molds and yeasts counts (M/YC) to vary in proportion. An example is the *E. coli* and coliform group, which were at 50% and 24%, respectively, of all specimens; other values were determined, such as pathogenic *E. coli* O157H7 at 19%, *Salmonella* spp at only 3% and 7% from Domiati and Tallaga cheese, respectively. The gram negative food borne bacteria such as *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp and *Citrobacter* spp, the gram positive bacteria as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* were also discovered and measured at 24%, 25.7%, 11.4%, and 14.2%, respectively. These figures exceed the standards released by the Egyptian standard (ES) 1008-2000. Finally, *Campylobacter jejuni* was not detected in any specimen (El Sayed et al, 2011).

## CONCLUSION

From the introduced research, WBC continues to be produced in mass, but it has not been adequately researched as regards the cultures for starting, necessary microorganism growth, salt ratios for cheese processing and storage, effect of brining temperature, pH values, and numerous other factors decisive in production.

Pasteurizing the milk adds to pathogens and undesired growth, while affecting acidification throughout the production and eliminating most of the lactic acid bacteria needed to mature the cheese. Other pathogens surviving the pasteurization can re-surface and contaminate the process by dominating the medium, leading to defective yield.

For this reason, to maintain the intended taste and flavour, it is important to trigger lactic acid formation with pure culture - which is, otherwise, removed by pasteurization – at the rate of 0.25 and 2 percent. Amino acids and fatty acids are formed within the cheese during the ripening, thus adding to flavour and the general quality of the yield. This acidification occurs quickly, only to become limited upon the application of salt in certain quantities. Salt-resistant strains in the process are an exception, which means that new starter culture becomes an alternative based on microorganisms separated fresh or heated milk - namely lactobacilli, lactococci, micrococci, pediococci and enterococci, all of which were separated and whose salt tolerance has been proved while brining. Other decisive factors in making quality cheese are the concept of sanitation and hygiene in production in farms and factories alike, pasteurisation, ways to prevent contamination at later stages, using automated equipment, and starter cultures to make nisin, thereby reducing non-starter bacteria masses.

The present review of the WBC production and its practice is hoped to shed light on the process for producers to improve and achieve their expected yield quality, while also inspiring future work related to various stages to achieve the intended properties of WBC.

## REFERENCES

- Alichanidis E, Polychroniadou A 2008. Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East Mediterranean countries: a review. Dairy Sci. Technol. 88 .495–510.
- Alichanidis E 2007. Cheeses ripened in brine, in: McSweeney P.L.H. (Ed.), Cheese Problems Solved, CRC Press, Cambridge, UK. pp. 330–342.
- Alper S, Nesrin C 2013. Bacterial contamination in fresh white cheeses sold in bazaars Canakkale, Turkey. International Food Research Journal 20(3): 1469-1472.
- Bakirci I, Kavaz A, Macit E 2011. Effect of different brine concentrations and ripening period on some quality properties of Turkish white pickled cheese. African Journal of Biotechnology. 10(56): 11925-11931.

- Bintsis T, Papademas, P 2002. Microbiological quality of white-brined cheeses: a review. *International Journal of Dairy Technology*. (55), (3):113 – 120.
- El Sayed M A, Hosny I M, El Kholy W I, El Dairouty R K, Sahar H S 2011. Microbiological evaluation of Egyptian white soft cheeses. *Style. Journal of American Science*. 7(5): 517 -527.
- Hayaloglu A A, Ozer B H, Fox P F 2008. Cheeses of Turkey: 2. Varieties ripened under brine. *Dairy Sci. Technol*. 88: 225–244.
- Hayaloglu A A, Guvena M, Fox PF 2002. Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese ('BeyazPeynir'). *International Dairy Journal* 12: 635–648.
- Kandarakis I, et al 2001). Effect of draining temperature on the biochemical characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry* 72: 369–378.
- Litopoulou- Tzanetaki E, Tzanetakis N, Vafopoulou- Mastrojiannaki A 1993. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of feta cheese. *Food Microbiology*.10: 31–41.
- Moatsou G, et al 2004. Effect of artisanal liquid rennet from kids and lambs abomasa on the characteristics of Feta cheese. *Food Chemistry* 88: 517–525.
- Ocak E, Andiç S, Tunçtürk Y 2014. The Effect of Homogenization, CaCl<sub>2</sub> Addition and Pasteurization on White Cheese and Whey Composition. *YYU J AGR SCI*. 24(1): 70-78.
- Ozcan T, Eren-Vapur U 2013. Effect of Different Rennet Type on Physico-Chemical Properties and Bitterness in White Cheese. *International Journal of Environmental Science and Development*. 4(1): 71-75.
- Ozer B, Atasoy F, Akin S 2002 . Some properties of urfa cheese (a traditional white-brined Turkish cheese) produced from bovine and ovine milks. *International Journal of Dairy Technology*. 55(2): 94 -98.
- Pappas C P, Kondy E, Voutsinas L P, Mallatou H 1996. Effects of starter level, draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of feta cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*. 49 (3): 73 -78.
- Pappa H C and Anyfantakis E M 2001. Effect of concentrated starter cultures on the manufacture of feta cheese. *Milchwissenschaft*.56: 325–329.
- Sabbagh N, Gheisari H, Aminlari M 2010. Monitoring the Chemical and Microbiological Changes During Ripening of Iranian Probiotic Low-Fat White Cheese. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 5 (4): 249-257.
- Vishwanatha K S, Rao A G, Singh SA 2010. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 85 (6): 1849-1859.

## Dünya' da ve Türkiye' de Uçucu Yağ Pazarı

Hülya Doğan<sup>1\*</sup>, Tansu Uskutoğlu<sup>2</sup>, Belgin Coşge Şenkal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi. Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu. Tohum Teknolojisi Programı. Yozgat. Türkiye

<sup>2</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: hulya.dogan@bozok.edu.tr

### Özet

Uçucu yağlar, gıda endüstrisinde lezzet verici ajanlar olarak, parfüm endüstrisinde ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. 2018 yılında Dünya' da uçucu yağ talebi 226.9 bin ton olmuştur. Son yıllardaki yiyecek, içecek, kişisel bakım ve kozmetik gibi endüstri alanlarının büyümesi ve aromaterapi ürünlerine olan talebin artmasından dolayı tahmini olarak 2019' dan 2025 yılına kadar bu değer % 8.6 oranında artması beklenmektedir. Aromaterapiye ilgi gösteren insan sayısının artması ile birlikte sağlık açısından doğal kaynaklı uçucu yağların farkındalığı, pazar piyasasında bir yükseliş sağlayacağı tahmin edilmektedir. Ar-Ge faaliyetlerinin artırılmasının yanı sıra, ekstraksiyon tekniklerindeki yeniliğin, gelişmekte olan ekonomilerde pazarın büyümesini desteklemesi beklenmektedir. Hindistan, Çin, Meksika ve Brezilya'daki yüksek sanayileşme ve kentleşme oranları, bölgedeki son kullanım endüstrilerini etkilemiş ve bu da aromatik bitkilere olan talebin artmasına neden olmuştur. Dünya' da 2018 yılında en önemli uçucu yağ talebi portakal yağına (52.1 bin ton) olmuştur. Sentetik olarak elde edilen uçucu yağlara oranla tıbbi bitkilerden elde edilen uçucu yağlar insan ve çevre sağlığını tehdit etmemesi ve birçok endüstri alanında kullanılabilmesinden dolayı dünyada her geçen yıl tüketimi artmaktadır. Son yıllarda Türkiye' nin uçucu yağ ihracatı, dünya fiyatlarına ve ekime bağlı olarak artış göstermektedir. Uçucu yağ ihracatı, 2017 yılında 49 milyon ABD Dolarına ulaşmıştır. Türkiye uçucu yağ ihracatının büyük kısmı gül yağından oluşmaktadır. Gül yağı ihracatının değeri 2016'da 15.6 milyon ABD dolarından 2017'de 18.5 milyon ABD Dolarına yükselmiştir. İhracatın büyük bir kısmı Fransa, İngiltere, Almanya, İsviçre, İspanya, Bahreyn, ABD ve Çin'e yönelik yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, uçucu yağların üretimi, dünya ticareti ve pazar payı hakkında detaylı bilgiler vermektir. Araştırma verileri ITC ve TÜİK kayıtlarından tarama, süzme ve gruplandırma usulüyle elde edilmiş ve özet olarak sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Uçucu yağ, ithalat, ihracat, tıbbi bitki

### World and Turkey essential oil market

#### Abstract

Essential oils are widely used as flavoring agents in the food industry, in the perfume industry and in the pharmaceutical industry. In 2018, the demand for essential oil in the world was 226.9 thousand tons. It is expected that this value will increase by 8.6% from 2019 to 2025 in recent years due to the growth of industrial areas such as food, beverages, personal care and cosmetics, and the increasing demand for aromatherapy products. With the increase in the number of people who are interested in aromatherapy, it is estimated that the awareness of natural essential oils in terms of health will provide an increase in the market. In addition to increasing R & D activities, innovation in extraction techniques is expected to support market growth in emerging economies. The high rates of industrialization and urbanization in India, China, Mexico and Brazil affected the end-use industries in the region, leading to an increase in demand for aromatic plants. The most important demand for essential oil in the world in 2018 was orange oil (52.1 thousand tons). Compared to synthetically derived essential oils, the consumption of essential oils from medicinal plants is increasing every year in the world as it does not threaten human and environmental health and can be used in many industrial fields. In recent years, Turkey's essential oil exporter, is increasing due to world prices and sowing. In 2017, essential oil exports reached 49 million USD. Turkey is composed of a large proportion of essential oil of rose oil exports. The value of rose oil exports increased from 15.6 million USD in 2016 to 18.5 million USD in 2017. Most of the exports are made to France, England, Germany, Switzerland, Spain, Bahrain, USA and China. The aim of this study is to give detailed information about the production of essential oils, world trade and market share. Research data were obtained from ITC and TÜİK records by screening, filtering and grouping method and presented as a summary.

**Keywords:** Essential oil, import, export, medicinal plant

## GİRİŞ

Uçucu yağlar, çiçek, tomurcuk, tohum, yaprak, dal, ağaç kabuğu, bitki, ağaç, meyve ve kök gibi bitki kısımlarından elde edilen aromatik veya kokulu, yağlı sıvılardır. Avrupa Farmakopesine göre, esansiyel bir yağ, buhar damıtma, kuru damıtma ya da ısıtma olmadan uygun bir mekanik işleme elde edilen botanik olarak tanımlanmış bir bitki hammaddesinden elde edilen genellikle kokulu bir üründür. Uluslararası Standart Örgütü (ISO) ISO 9235: 2013 / Kor 1: 2014 normu, Aromatik hammaddenin sözlük anlamını (ISO, 2013) bitki kökenli doğal bir hammaddeden elde edilen, kök damıtma, hidro- damıtma, kuru damıtma, mekanik işlem olarak tanımlamıştır. Bunlar genellikle karmaşık bir bileşime sahiptir ve çeşitli oranlarda alkoller, aldehytlere, ketonları, fenoller, esterleri, eterleri ve terpenleri içerir. Genellikle kokulu olan bu maddeler yağ görünümünde olduklarından “esans”, “uçucu yağ” veya “eterik yağ” olarak adlandırılırlar. Ancak, sabit yağların aksine ısıya maruz kaldıklarında buharlaşırlar; bunlar bitkilerin sadece % 10'unda bulunan hoş kokulu ve uçucu bileşiklerdir (Ahmadi ve ark., 2002; Wagner, 1996).

Damıtma. uçucu yağları izole etmek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Ancak belirli ürünler için enfleuraj (yağ kullanarak ekstraksiyon), maserasyon, solvent ekstraksiyonu ve mekanik presleme dahil diğer işlemler de kullanılır. En uygun ekstraksiyon yöntemi esas olarak yağın çıkarıldığı ham maddeye bağlıdır, örnek verecek olursak yapılacaksa genellikle uçucu yağları narenciye kabuklarından ekstre etmek için mekanik ya da soğuk presleme yöntem kullanılır. Bir bitkide uçucu yağın işlevi tam olarak anlaşılmamıştır. Çiçek kokularının, belirli böcekler için cezbedici olması ile doğal seçime yardımcı olduğu düşünülürken; yaprak, odun ve kök kaynaklı yağlar, bitki parazitlerine veya hayvan tahribatına karşı koruma sağlayabilir. Çok az sayıda uçucu yağ bitki metabolizmasında rol oynar; Aslında, bazı araştırmacılar bu malzemelerin çoğunun sadece bitki biyosentezinin atık ürünleri olduğunu savunmaktadırlar (Encyclopedia Britannica, 2019).

Bilinen tahmini 3.000 uçucu yağın yaklaşık 150'si şu anda ticari öneme sahiptir ve dünya pazarlarında işlem görmektedir (Baylac ve ark., 2003; Sivropoulou, 1996). Uçucu yağlar sabit yağlar ile karıştırılmamalıdır. Aslında, uçucu yağlar kimyasal olarak ve fiziksel olarak sabit yağlardan farklıdır. Ağırlıklı olarak endüstriyel amaçlar için üretilen uçucu yağlar portakal, mısır nane, okaliptüs, sitronella, nane ve limondan elde edilenlerdir (Sivropoulou, 1996). Evsel amaçlar için yaygın olarak kullanılan yağlar arasında lavanta, papatya, nane, çay ağacı yağı, okaliptüs, sardunya, yasemin, gül, limon, portakal, biberiye, akgünlük ve sandal ağacı bulunur. Uçucu yağlar, tarımsal bazlı temel endüstriyel ürünler grubunu oluşturur ve gıda ürünleri, içecekler, parfümler, eczacılık ürünleri ve kozmetik ürünleri gibi çeşitli endüstrilerde uygulamalara sahiptir (Hunter, 2009; Teixeira da Silva, 2004). Aromaterapi. piyasası için yeni bir büyüme alanını temsil ederken. bunların kullanımı genellikle gıda. lezzet ve koku endüstrilerinde daha yaygın olmuştur. Meşrubat endüstrisi, özellikle narenciye yağından elde edilen uçucu yağların en büyük kullanıcısıdır. Aslında portakal esansı, limon esansı, küçük Hindistan cevizi esansı, tarçın esansı, kişniş esansı ve turunç çiçeği uçucu yağları olmadan hiçbir "cola" üretimi gerçekleşemez. Diğer birinci sınıf kullanıcılar arasında, alkollü içecek üreticileri, tatlı, süt ürünleri, şekerleme ürünleri ve tatlı ürünleri üreticileri, ayrıca tüm gıda sektöründeki hızlı ve işlenmiş yiyecekler bulunur. Uçucu yağlar: ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde tıbbi-aromatik bitkiler ticari olarak bitkisel drog olarak değerlendirilmesinin yanında başta uçucu yağ olmak üzere elde edildiği kaynağa göre farklı ürünlere de işlenmektedir (Bakkalı ve ark., 2008).

Türkiye’de son yıllarda artan miktarlarda uçucu yağların ticareti yapılmaya başlamıştır. Buna bağlı olarak da özellikle Antalya, Isparta, Mersin, Hatay, Manisa ve Muğla illerinde uçucu yağ üretim tesislerinin sayısında artış meydana gelmiştir. Ancak tıbbi-aromatik bitkilerin mevcut işleme sanayi henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Ülkemiz bu anlamda işlenmiş üründen çok hammadde üretim ve ticareti alanında rol almaktadır (BATEM, 2012).

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) ve Uluslararası Ticaret Merkezi (ITC)’ den elde edilen istatistiksel veriler ve konu ile ilgili diğer yayınlar materyal olarak kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Dünya Uçucu Yağ Üretimi ve Ticareti

Ticari uçucu yağlar günümüzde tamamıyla bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Bitkisel esanslar koku ve tat endüstrilerinin vazgeçilmez hammaddeleridir. Bunun için uçucu yağ ya olduğu gibi koku karışımlarına

katılır veya uçucu yağdan elde edilen saf aroma kimyasalı veya fraksiyonu aynı amaçla kullanılır. Dünya uçucu yağlar, parfüm–kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ihracat toplamı 2002 yılında 38 milyar dolarken 2015 yılında 111,7 milyar dolara yükselmiştir (Temel, 2018). Bu değerler, 2014 yılında 118 milyar dolardan 2018 yılında 142 milyar dolara yükselmiştir. İhracat rakamları yıllar içerisinde artış sağlamıştır. İhracatçı ülkelerin başında Fransa, ABD, Almanya, İrlanda gelmektedir. Türkiye 783 milyon dolarla 26. sıradadır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Uçucu yağlar, parfüm–kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ülke ve yıllara göre dünya ihracatı (1.000\$)

Ülkeler	2014	2015	2016	2017	2018*
Fransa	17.321.707	15.117.599	15.558.682	17.760.405	19.699.194
ABD	11.551.622	11.808.302	12.048.202	12.954.557	13.607.647
Almanya	11.118.643	9.708.132	10.058.472	10.569.035	11.539.247
İrlanda	9.138.349	8.802.210	8.628.709	8.459.601	9.123.542
Singapur	4.570.667	4.554.698	5.173.229	6.504.764	8.365.611
Kore	1.920.013	2.929.480	4.210.464	4.973.816	6.253.225
İtalya	4.623.996	4.386.863	4.957.031	5.516.994	6.022.659
İngiltere	6.389.094	5.504.745	5.501.126	5.856.175	5.992.799
Çin	4.187.334	4.694.167	4.287.176	4.832.346	5.633.581
İspanya	4.331.559	3.907.148	4.101.824	4.648.211	5.406.631
Japonya	1.706.606	1.962.319	2.748.898	3.612.505	5.100.651
Hollanda	3.484.617	3.456.796	3.950.750	4.384.174	4.615.535
Polonya	2.980.211	2.694.767	2.998.539	3.391.805	3.855.805
İsviçre	3.143.818	2.867.536	2.941.223	3.289.634	3.733.801
Belçika	2.947.751	2.930.212	3.290.908	3.350.683	3.434.602
Hong Kong	1.752.027	1.932.439	2.065.369	2.562.693	3.416.581
Meksika	2.494.936	2.356.864	2.330.044	2.304.888	2.197.711
Kanada	1.796.478	1.796.125	1.843.860	1.930.185	2.186.102
Tayland	1.898.084	1.752.646	1.762.331	1.762.964	2.089.146
Hindistan	1.442.830	1.437.700	1.539.740	1.821.620	1.933.724
Dünya top.	118.270.891	111.704.409	117.372.740	130.847.142	142.971.695
Türkiye	771.351	695.467	696.371	762.425	783.321

ITC, 2018

\*Tahmini veriler

Dünya uçucu yağlar, parfüm–kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ithalatı toplamı 2002 yılında 37 milyar dolarken 2015 yılında 111 milyar dolara yükselmiş olup (Temel, 2018), 2014 yılında 115 milyar dolardan 2018 yılında 142 milyar dolara yükselmiştir. İthalatçı ülkelerin başında ABD, Çin, ve Almanya gelmektedir. Türkiye 1 milyar dolarla 29. sıradadır (Tablo 2).

**Tablo 2.** Uçucu yağlar, parfüm–kozmetik, diğer kişisel bakım ürünlerinin ülke ve yıllara göre dünya ithalatı (1.000\$)

Ülkeler	2014	2015	2016	2017	2018*
ABD	11.546.996	12.083.750	12.543.742	13.542.897	15.091.577
Çin	3.372.164	4.509.560	5.506.877	7.658.011	12.374.999
Almanya	7.266.717	7.047.991	7.233.821	8.113.757	8.678.946
İngiltere	6.618.062	6.428.265	6.231.304	6.589.838	6.819.960
Hong kong	3.711.598	4.013.205	4.606.782	5.286.654	6.726.907
Fransa	5.760.615	5.299.605	5.490.806	5.866.945	6.331.987
Singapur	2.728.286	2.674.209	3.047.500	3.653.844	4.478.879
Hollanda	3.336.530	3.212.238	3.609.113	3.878.627	4.257.057
İspanya	3.545.850	3.255.926	3.452.752	3.799.778	4.019.418
Kanada	3.175.784	3.292.699	3.395.818	3.644.742	3.822.779
Japonya	2.992.280	2.799.124	3.048.879	3.136.004	3.436.281

Rusya	3.622.859	2.629.627	2.600.367	3.112.753	3.338.84
İtalya	3.112.983	2.813.982	3.027.972	3.150.978	3.227.952
Belçika	2.626.170	2.590.232	2.971.674	3.162.926	3.212.739
Meksika	2.590.061	2.666.440	2.779.923	3.039.450	3.192.351
Polonya	2.190.803	2.003.218	2.316.757	2.704.413	2.806.270
Birleşik Arap Emirlikleri	3.814.387	2.520.748	2.360.158	3.307.579	2.389.041
Australia	1.579.256	1.606.674	1.639.934	1.769.803	2.042.748
Kore	1.690.800	1.718.225	1.777.996	1.917.349	2.013.034
Tayland	1.286.576	1.427.895	1.573.746	1.684.737	1.961.643
Dünya top.	115.674.252	111.264.172	116.744.483	129.096.860	142.196.295
Türkiye	1.191.615	1.101.905	1.113.776	1.200.318	1.141.902

ITC, 2018

\*Tahmini veriler

Dünya uçucu yağlar, parfüm–kozmetik, diğer kişisel bakım ürünleri grubundan sadece “uçucu yağlar” incelendiğinde ihracatı toplamı 2002 yılında 1,4 milyar dolarken 2015 yılında 5 milyar dolara yükselmiş (Temel, 2018), 2014 yılında ise 4.5 milyar dolar, 2018 yılında 6 milyar dolara yükselmiştir. İhracatçı ülkelerin başında Hindistan, ABD ve Fransa gelmektedir. Türkiye 47 milyon dolarla 26. sıradadır (Tablo 3).

**Tablo 3.** Uçucu yağların ülke ve yıllara göre dünya ihracatı (1.000\$)

Ülkeler	2014	2015	2016	2017	2018*
Hindistan	606.221	572.995	607.726	786.269	859.415
ABD	566.551	598.495	634.673	729.601	798.904
Fransa	366.053	355.201	396.745	471.278	522.070
Çin	594.871	793.598	423.524	353.410	469.176
Brezilya	228.609	256.877	339.048	431.217	437.220
Arjantin	119.500	224.655	196.376	203.718	255.450
İngiltere	267.655	243.714	218.628	277.144	247.155
Almanya	173.876	178.693	191.524	219.207	225.527
Hollanda	127.024	143.853	173.992	207.663	211.121
Endonezya	156.301	179.905	166.380	160.368	199.266
İspanya	125.749	126.830	124.347	160.872	195.944
İtalya	145.750	132.629	137.517	161.779	189.767
B.Arap Emirlikleri	20.821	16.627	23.110	42.140	155.918
Meksika	126.565	137.558	144.926	160.897	146.258
Bulgaristan	50.209	59.232	66.572	103.480	118.304
Kanada	50.526	55.148	68.069	84.287	81.109
Australia	58.186	58.266	60.722	88.038	75.338
Singapur	70.746	65.927	65.381	66.523	74.769
Madagaskar	37.766	25.223	34.040	44.458	71.271
İsviçre	59.648	55.759	53.666	57.264	57.110
Dünya top.	4.538.271	4.927.301	4.801.316	5.590.154	6.237.370
Türkiye	32.263	33.622	41.356	49.187	47.481

ITC, 2018

\*Tahmini veriler

Uçucu yağlar, parfüm-kozmetik, diğer kişisel bakım ürünleri grubundan sadece “uçucu yağlar” incelendiğinde ithalatı toplamı 2002 yılında 1,6 milyar dolardan 2015 yılında 4,5 milyar dolara yükselmiş olduğu belirtilmiştir (Temel, 2018). Bu ithalat rakamları 2014 yılında ise 4 milyar dolarken, 2018 yılında 6 milyar dolara yükselmiştir. İthalatçı ülkelerin başında ABD, Fransa ve Almanya gelmektedir. Türkiye 33.5 milyon dolarla 25. sıradadır (Tablo 4).

**Tablo 4.** Uçucu yağların ülke ve yıllara göre dünya ithalatı (1.000\$)

Ülkeler	2014	2015	2016	2017	2018*
ABD	858.081	987.623	1.063.620	1.269.048	1.379.468
Fransa	376.506	379.769	386.492	442.192	515.079
Almanya	308.413	322.693	355.509	418.333	435.393
Hindistan	159.914	160.506	212.284	272.228	388.064
İngiltere	306.498	326.138	285.067	334.917	340.639
Hollanda	166.499	179.059	222.780	286.872	338.382
Çin	221.099	228.330	189.290	204.405	250.003
Endonezya	122.403	114.912	129.440	136.213	211.109
Japonya	171.466	155.689	174.622	179.666	208.898
Singapur	133.225	132.688	150.511	169.791	187.943
İsviçre	137.358	138.462	138.803	158.500	172.647
Kanada	109.863	117.849	130.768	170.357	163.563
İrlanda	73.729	146.529	131.473	140.384	159.844
İspanya	120.474	137.049	125.332	147.364	159.355
Meksika	77.035	87.432	99.020	104.116	112.821
Avustralya	39.057	49.461	58.585	84.514	110.958
Brezilya	60.740	61.300	62.471	66.806	77.882
İtalya	72.593	62.306	67.479	69.869	77.239
Avusturya	44.559	41.549	42.367	51.497	53.930
Kore	38.220	37.131	47.261	53.029	52.172
Dünya top.	4.240.647	4.521.007	4.724.406	5.539.251	6.116.655
Türkiye	23.263	26.727	27.398	36.394	33.546

ITC, 2018

\*Tahmini veriler

### Türkiye Uçucu Yağ Üretimi ve Ticareti

Türkiye önemli bir tıbbi bitki potansiyeline sahip olduğu halde, koku ve tat endüstrisi, alkolsüz içkiler ile ilaç sanayiinde kullanılan uçucu yağlar üretim ve ihracatında henüz istenilen seviyelerde değildir. Uçucu yağ üretim ve ihracatının büyük bir kısmını gülyağı oluşturmaktadır. Gülyağı ve gül koncreti Gümrük Tarife İstatistik Pozisyon (GTİP) numarası ile ihraç edilmektedir. Türkiye gülyağı üretiminde dünyada söz sahibi ülkelerin başında gelmektedir. Ülkemiz gülyağı dışında, diğer uçucu yağlarda dünyada önemli bir etkinliğe sahip bulunmamaktadır. Gül yağı üretim yapan iller Isparta, Afyon, Burdur, Denizli’ dir. “Gülbirlik - Gül Gülyağı ve Yağlı Tohumlar Tarım Satış Kooperatifleri Birliği”, gül yağının ana üreticisidir (Tablo 5).

**Tablo 5.** Yıllara Göre Türkiye Gül Yağı İhracatı (1.000 \$)

Yıllar	Değer
2004	7.393
2005	7.174
2006	7.594
2007	9.383
2008	11.210
2009	8.492
2010	9.157
2011	10.301
2012	12.613
2013	10.748
2014	13.961
2015	10.793
2016	15.635
<b>2017</b>	<b>18.534</b>

TÜİK, 2018

**Tablo 6.** Türkiye’ de Üretilen Uçucu Yağların Ükelere Göre İhracatı (1.000 \$)

Ülkeler	Değer (1.000 \$)		
	2015	2016	2017
1 Fransa	20.471	25.409	28.259
2 İngiltere	2.015	4.560	5.348
3 Almanya	2.385	3.665	3.651
4 ABD	1.300	1.261	2.308
5 İsviçre	1.393	917	1.331
6 İspanya	1.277	545	937
7 Kanada	720	616	895
8 Kore	116	338	871
9 Sudi Arabistan	680	93	689
10 Hong Kong	44	216	594
11 Avusturya	203	127	455
12 Bulgaristan	168	258	420
13 Bahreyn	219	498	344
14 Çin	441	167	299
15 Hindistan	120	354	271
<b>Toplam</b>	<b>31.550</b>	<b>39.022</b>	<b>46.671</b>
<b>Türkiye’ nin toplam ihracatı</b>	<b>33.586</b>	<b>41.356</b>	<b>49.084</b>

TÜİK, 2018

Türkiye'nin uçucu yağ ihracatı, dünya fiyatlarına ve ekime bağlı olarak artış eğiliminde. Uçucu yağların ihracatı, yan ürünleri ve reçineleri 2017 yılında 49 milyon ABD dolarına ulaşmıştır. Türkiye'nin uçucu yağ ihracatının büyük kısmı gül yağından oluşmaktadır. Gül yağı geleneksel bir ihracat kalemi olmuş, ardından stearopten yağı ve kekik yağı. Uçucu yağların çoğunluğu Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir. Uçucu yağlar için ana alıcılar Fransa, İngiltere, Almanya, ABD ve İsviçre'dir. Bu ülkeler, 2017 yılında Türkiye toplam uçucu yağ ihracatının % 83'ünü oluşturmuştur. Türkiye gül yağı endüstrisinde dünya çapında oldukça rekabetçi bir konumdadır. Türk gül yağının dış ticaretinin çok eski ve geleneksel kökleri vardır. İhracat çok uzun zaman önce başlamıştır. 1920 ve 1921 yılları arasında gül yağı ihracatının çoğunun Fransa ve ABD için yapıldığı bilinmektedir. Gül yağı ihracatının değeri 2016'da 15,6 milyon ABD Dolarına, 2017'de 18,5 milyon ABD Dolarına yükselmiştir. İhracatın büyük kısmı Fransa, İngiltere, Almanya, İsviçre, İspanya, Bahreyn, ABD ve Çin'e yöneliktir (Tablo 6).



#### 4. SONUÇ

Ülkemizin doğal florasında bulunan, ticari öneme sahip, zengin içerikli katma değeri yüksek uçucu yağlar ve ekstratların ihracatına ağırlık verilmelidir. Uçucu yağ ihracatımız henüz istenilen seviye değildir ve uçucu yağ sanayinin desteklenmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda uçucu yağ bitkilerinin kalite özellikleri belirlenerek, ihtiyaç duyulan sektörlere kazandırılması, dünya uçucu yağ ticaretinde kaliteli ve standart ürünlerle daha büyük bir pay alması amacıyla bu konuda yapılacak olan çalışmalara hız kazandırılmalıdır. Kültürü yapılan türlerden uçucu yağ sektörüne uygun yeni çeşitler ıslah edilmelidir.

[1]

#### KAYNAKLAR

- Ahmadi L, Mirza M, Shahmir F 2002. The volatile constituents of *Artemisia marschaliana* Sprengel and its secretory elements. *Flavour and Fragrance Journal*. 17:141-143.
- Baylac S, Racine P 2003. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*. 13:138-142.
- Bakkalı, F, Averbek, S, Averbek, D, Idaomar, M, 2008. Biological Effects of Essential Oils-A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- BATEM, 2012, Tıbbi ve Aromatik Bitki İşletmelerinin Yapısal Analizi, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/batem/> erişim tarihi, 07.07.2019.
- Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/> erişim tarihi, 08.06.2019.
- Hunter M 2009. *Essential Oils: Art, Agriculture, Science*. New York: Industry and Entrepreneurship. Nova Science Publishers, Inc. pp. 43-63.
- ITC 2019. International Trade Statistics Database <http://www.trademap.org/> erişim tarihi 18.06.2019.
- ISO 9235:2013 Aromatic natural raw materials- Vocabulary. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>, erişim tarihi, 15.06.2019.
- Teixeira da Silva JA 2004. Mining the essential oils of the anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. 3:706-720.
- TÜİK 2018. Türkiye İstatistik Kurumu Kayıtları. <http://www.tuik.gov.tr/>, erişim tarihi, 10.06.2019.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolau C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44:1202-1205.
- Temel M, Tınmaz AB, Öztürk M, Gündüz O 2018. Dünyada ve Türkiye’de Tıbbi -Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Ticareti. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*. 21: 198-214.
- Wagner GJ 1996. Secreting glandular trichomes: More than just hairs. *Plant Physiology*. 96:675-679.

## Baharat kullanımında besin güvenliğine yönelik satın alma ve muhafaza yöntemlerinin değerlendirilmesi

Duygu Ağagündüz<sup>1\*</sup>, Nilüfer Acar Tek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: duyguturkozu@gazi.edu.tr

### Özet

Bu araştırma 18-64 yaş arası yetişkin bireylerin baharatları satın alma ve muhafaza yöntemlerinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür. Araştırma 18-64 yaş arası 244'ü erkek 781'i kadın olmak üzere toplam 1125 yetişkin birey üzerinde yapılmıştır. Bireylerin baharatları satın alma ile muhafaza yöntemlerinin belirlenebilmesi amacıyla yüz yüze görüşme tekniği ile bir anket formu uygulanmıştır. Bireylerin %98.3'ü evde kullanmak için baharat satın almaktadır. Bireyler baharatları sırasıyla en sık marketlerden(%60.2), baharatçılardan(%19.2), aktar dükkânlarından (%13.3), bakkallardan (%4.7) ve pazarlardan (%2.6) satın almaktadır. Baharatları satın alırken en çok tercih ettikleri ambalaj tipi ise sırasıyla; naylon ambalaj (%58.7), cam kavanoz (%25.2), kâğıt ambalaj (%13.5) ve plastik kavanoz (%2.6)'dur. Bireylerin %42.2'si baharatların tamamı tükenene kadar ve %23.7'si son kullanma tarihi bitene kadar kullandıklarını belirtmiştir. Yüzde 12.3'ü baharatları ortalama 1 ay, %11.0'i 3-6 ay ve %10.8'i ise 2 ay kullanmaktadır. Baharatların muhafaza yöntemleri ise sırasıyla; cam kavanozda(%52.3), baharatlıkta (%29.6), kendi ambalajında (%16.3) ve poşettedir (%1.8).Erkek bireylerin %44.9'u baharatları cam kavanozda, %28.3'ü baharatlıkta, %23.8'i kendi ambalajında, %3.3'ü poşette saklamaktadır. Kadın bireylerin baharatları muhafaza yöntemleri ise sırasıyla cam kavanoz (%55.5), baharatlık (%30.1), kendi ambalajı (%13.2) ve poşettir (%1.2). Bireylerin cinsiyetlerine göre baharatları muhafaza etme yöntemleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $\chi^2$ :26.015,  $p<0.05$ ).Baharatları muhafaza etme yöntemlerinin bireylerin eğitim düzeylerine göre de farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $\chi^2$ :35.777,  $p<0.05$ ). Bu araştırmanın sonucunda yetişkin bireylerin baharat kullanımının yaygın olduğu ve muhafaza yöntemlerinin cinsiyete ve eğitim düzeyine göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Sürdürülebilir beslenme kavramının bir parçası, güvenilir, sağlıklı besin kullanımudur. Baharatlar, uygun koşullarda üretilmediği ve muhafaza edilmediğinde ciddi sağlık riskleri oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu çalışma ülkemizde sıklıkla kullanılan baharatları, satın alma, kullanımı ve muhafazası hususunda tüketicinin bilinçlendirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Baharatlar, muhafaza koşulları, besin güvenliği, sürdürülebilir beslenme

### Evaluation the buying and storage methods for food safety regarding use of spice

#### Abstract

This study was planned and conducted in order to evaluate the buying and storage methods of spices in adults aged 18-64 years. Research was conducted on a total of 1125 adults, 244 males and 781 females, between the ages of 18-64. In order to determine the buying and storage methods of spices, a questionnaire was applied by face to face interview. 98.3% of individuals buy spices to use at home. Individuals buy spices mostly from supermarkets(60.2%), spice makers (19.2%), herbalist(13.3%), grocery stores(4.7%) and markets(2.6%). While buying spices, the most preferred packaging types are; nylon packaging (58.7%), glass jars (25.2%), paper packaging (13.5%) and plastic jars(2.6%), respectively. 42.2% of individuals stated that they used spices until all of them are consumed and 23.7% used them until their expiry date. 12.3% of people use the spices for 1 month on average, 11.0% use for 3-6 months and 10.8% for 2 months. Storage methods of spices are respectively; in glass jars(52.3%), in cruets(29.6%), in their packagings(16.3%) and in plastic bags(1.8%).44.9% of the males keep spices in a glass jar, 28.3% in cruets, 23.8% in their own packaging and 3.3% in a plastic bag. The storage methods of spices in females are respectively glass jars(55.5%), cruets(30.1%), their own packaging(13.2%) and plastic bags(1.2%). The difference between the storage methods of spices according to gender is statistically significant( $\chi^2$ :26.015, $p<0.05$ ). It has been found that the storage methods of spices are also different according to the individuals' educational levels( $\chi^2$ :35.777, $p<0.05$ ).In conclusion, it was found that use of spice was common in adults and the storage methods vary according to their gender and education level. Part of the concept of sustainable nutrition is the usage of safe, healthy food. Spices have the potential to cause serious health risks if they are not produced and

maintained in optimum conditions. This study shows that consumer awareness about purchase, use and storage of spices which are frequently used in our country is necessary.

**Keywords:** Spices, storage conditions, food safety, sustainable nutrition

## GİRİŞ

Baharatlar; çeşitli bitkilerin tohum, tomurcuk, çekirdek, meyve, çiçek, kabuk, kök, gövde, rizom, yumru, yaprak, sap, soğan gibi kısımlarının kurutulup; bütün halde ve/veya ufalanması ve/veya öğütülmesi ile elde edilen; besinlere renk, tat, koku ve lezzet vermek için kullanılan ürünlerdir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2013) . Baharatlar eski çağlarda Asya ve Hint toplumlarında yaygın olarak kullanılmakta iken günümüzde çeşitli nedenlerle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Türkiye’de kırmızıbiber, karabiber, kimyon, yenibahar, tarçın ve zencefilin en çok kullanılan baharatlar arasında olduğu bildirilmektedir (Vural ve ark., 2004).

Baharatlar, besin işleme ve besin sanayiinde aroma verici ve koruyucu ajan olarak yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Bunun yanı sıra; baharatlarda bulunan fitokimyasallar ve esansiyel yağların sağlık üzerine de olumlu etkileri olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur (Guldiken ve ark., 2018; Tapsell ve ark., 2006). Baharatların kendine özgü aroması ve sağlık etkilerinin yanı sıra besinin/ürünün kalitesini iyileştiren antimikrobiyal ve antioksidan etkileri olduğu da bildirilmektedir (Çoban ve Patır, 2010).

Besin kalitesi ve sağlık üzerine olan önemli koruyucu etkilerinin tam tersine baharatlar; nemli ve sıcak iklimlerde sağlıklı koşullarda üretilmeleri ve uygun olmayan koşullarda depolanmaları nedeniyle de besin güvenliği açısından önemli bir risk faktörü olabilmektedir. Bakterilerle kontamine olmuş baharatlar eklendikleri besinlerin mikrobiyal yüklerini arttırabilmektedir (Vural ve ark., 2004). Bunun yanı sıra baharatlar mikotoksin açısından da riskli olan besin maddeleri arasında sayılmaktadır. Mikotoksinler funguslar tarafından üretilen ve çeşitli tarımsal ürünlerde hasat öncesinde ve sonrasında çeşitli nedenlere bağlı olarak oluşabilen toksik metabolitlerdir (Şen ve Nas, 2010). Baharatlardan özellikle kırmızı toz biber, pul biber, karabiber aflatoksin açısından riskli ürünlerdir. Benzer şekilde baharatların depolanması sırasında sterigmatosistin isimindeki mikotoksinin oluştuğu bildirilmektedir. Okratoksinlerin de en çok bulunduğu besinler arasında baharatların bulunduğu belirtilmektedir (Öksüztepe ve Erkan, 2016; Uylaşer ve ark., 2005). Bu hususta tüketicilerin baharatları kullanım ve muhafaza alışkanlıklarının belirlenmesi besin güvenliği ve sağlık açısından önem arz etmektedir.

Bu araştırma 18-64 yaş arası yetişkin bireylerin baharatları satın alma ve muhafaza yöntemlerinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma 18-64 yaş arası 244’ü erkek 781’i kadın olmak üzere toplam 1125 yetişkin birey üzerinde yapılmış, kesitsel tipte bir çalışmadır. Bireylerin sosyodemografik özellikleri ve baharatları satın alma ile muhafaza yöntemlerinin belirlenebilmesi amacıyla yüz yüze görüşme tekniği ile bir anket formu uygulanmıştır. Anket formu uygulanmadan önce bireylere çalışmanın amacı ve içeriği hakkında bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. Ölçülen değişkenler için sayı (n), yüzde (%) ve aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri verilmiştir. Birden fazla seçmeli sorularda, çoklu analiz yöntemi kullanılmıştır. Sosyodemografik özelliklere göre baharatları satın alma ve muhafaza yöntemleri arasındaki farkın karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde önemlilik düzeyi olarak  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bireylerin sosyodemografik özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Buna göre; bireylerin %30.6’sı erkek, %69.4’ü kadın bireylerden oluşmaktadır. Bireylerin eğitim düzeyleri değerlendirildiğinde; %1.5’i okuryazar, %5.8’i ilköğretim, %4.7’si ortaokul, %43.7’si lise, %42.8’i, üniversite, %1.8’i yüksek lisans/doktora mezunudur. Bireylerin %64.5’i bekar, %33.5’i evlidir. Yüzde 73.1’i kentsel, %26.9’u ise kırsal bölgede yaşamaktadır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Bireylerin Sosyodemografik Özellikleri

	Erkek		Kadın		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
<b>Cinsiyet</b>	344	30.6	781	69.4	1125	100.0
<b>Eğitim Düzeyi</b>						
Okuryazar	3	0.9	14	1.8	17	1.5
İlkokul	14	4.1	51	6.5	65	5.8
Ortaokul	16	4.7	34	4.4	50	4.4
Lise	117	34.0	375	48.0	492	43.7
Üniversite	186	54.1	295	37.8	481	42.8
Yüksek lisans/doktora	8	2.3	12	1.5	20	1.8
<b>Medeni Durum</b>						
Bekâr	200	58.1	548	70.2	748	66.5
Evli	144	41.9	233	29.8	377	33.5
<b>Yaşadığı Yer</b>						
Kentsel	251	73.0	571	73.1	822	73.1
Kırsal	93	27.0	210	26.9	303	26.9

Bireylerin %98.3'ü evde kullanmak için baharat satın almaktadır (Tabloda gösterilmemiş veri). Bu çalışmada olduğu gibi ülkemizde yapılan birçok çalışmada baharat kullanımının yaygın olduğu ve hatta ev dışında da baharatların yaygın bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (Demircioğlu ve ark., 2007; Demirçivi and Altaş, 2016; Fırat ve ark., 2018).

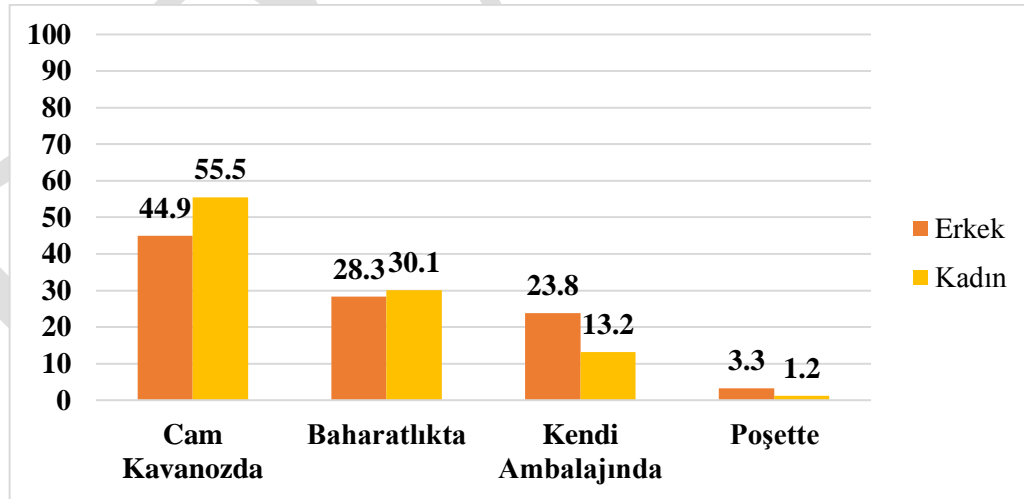
Bireylerin baharatları satın alma davranışları ve muhafaza yöntemleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Buna göre bireyler baharatları sırasıyla en sık marketlerden (%60.2), baharatçılardan (%19.2), aktar dükkânlarından (%13.3), bakkallardan (%4.7) ve pazarlardan (%2.6) satın almaktadır. Baharatları satın alırken en çok tercih ettikleri ambalaj tipi ise sırasıyla; naylon ambalaj (%58.7), cam kavanoz (%25.2), kâğıt ambalaj (%13.5) ve plastik kavanoz (%2.6)'dur (Tablo 2). Ülkemizde yapılan çalışmalar da bu çalışmaya benzer şekilde baharatların en sık marketlerden ve daha çok açık veya naylon ambalajlarda temin edilme eğilimlerinin olduğunu desteklemiştir (Fırat ve ark., 2018; Yıldız ve Kılınc, 2010). Ayrıca cinsiyet ve eğitim düzeyleri ile baharatları temin etme şekilleri arasında önemli bir ilişki olduğu bildirilmekte iken bu çalışmada bireylerin cinsiyetleri, medeni durumları, eğitim düzeyleri ve ikamet ettikleri bölge ile baharatları satın alma alışkanlıkları arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Bu çalışmada bireylerin %42.2'si baharatların tamamı tükenene kadar ve %23.7'si son kullanma tarihi bitene kadar kullandıklarını belirtmiştir. Yüzde 12.3'ü baharatları ortalama 1 ay, %11.0'i 3-6 ay ve %10.8'i ise 2 ay kullanmaktadır. Baharatların muhafaza yöntemleri ise sırasıyla; cam kavanozda (%52.3), baharatlıkta (%29.6), kendi ambalajında (%16.3) ve poşettedir (%1.8). Erkek bireylerin %44.9'u baharatları cam kavanozda, %28.3'ü baharatlıkta, %23.8'i kendi ambalajında, %3.3'ü poşette saklamaktadır. Kadın bireylerin baharatları muhafaza yöntemleri ise sırasıyla cam kavanoz (%55.5), baharatlık (%30.1), kendi ambalajı (%13.2) ve poşettir (%1.2) (Tablo 2). Baharat kullanım alışkanlıklarının araştırıldığı bir çalışmada, kadın bireylerin %70.6'sının aldığı baharatı renksiz cam kapta, %4.5'i ise plastik kapta sakladığı bildirilmiştir. Yüzde %32.3'ünün aldığı baharatı bitene kadar kullandığı, %28.8'inin ise bir ay içinde tükettiğini, %12.1'inin de son kullanma tarihine kadar kullandığını belirtmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak katılımcıların çoğunun (%89.4) baharatın son kullanma tarihi geçtiğinde baharatları kesinlikle kullanmadığı ifade edilmiştir (Fırat ve ark., 2018). Başka bir çalışmada da kadınların çoğunluğunun (%88.8) baharatları son kullanma tarihi geçtiğinde kesinlikle tüketmedikleri ve kesinlikle tüketmeyenlerin oranının eğitim düzeyinin yükselmesiyle artış gösterdiği görülmüştür (Demircioğlu ve ark., 2007). Literatürden farklı olarak bu çalışmada bireylerin neredeyse yarısının baharatları bitene kadar kullandıkları ve son kullanma tarihine diğer çalışmalara kıyasla daha az dikkat ettikleri belirlenmiştir. Literatürdeki çalışmaların daha çok kadınlar üzerinde yapılmasının bu çalışmadan farklı sonuçlar elde edilmesine neden olduğu düşünülmekle birlikte besin güvenliği hususunda bireylerin farkındalık kazandırılmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

**Tablo 2.** Bireylerin Baharatları Satın Alma Davranışları ve Muhafaza Yöntemleri

		n	%
<b>Evde kullanmak için baharat satın alanlar</b>		1106	98.3
<b>Baharatları en çok satın aldıkları yer</b>	Market	666	60.2
	Pazar	29	2.6
	Bakkal	52	4.7
	Baharatçı	212	19.2
	Aktar	147	13.3
<b>Baharatları satın alırken tercih ettikleri ambalaj tipi</b>	Cam kavanoz	279	25.2
	Kağıt torba	149	13.5
	Naylon torba	649	58.7
	Plastik kavanoz	29	2.6
<b>Baharatların ortalama kullanılma süreleri</b>	1 ay	136	12.3
	2 ay	119	10.8
	3-6 ay	122	11.0
	Son kullanma tarihi bitene kadar	262	23.7
	Tamamı bitene kadar	467	42.2
<b>Baharatların muhafaza edilme şekli</b>	Kendi ambalajında	181	16.3
	Cam kavanozda	578	52.3
	Baharatlıkta	327	29.6
	Poşette	20	1.8

Şekil 1’de bireylerin cinsiyetlerine göre baharatları muhafaza etme yöntemleri gösterilmiştir Erkek ve kadın bireylerin sırasıyla; %44.9 ve %55.5’i baharatları cam kavanozda muhafaza ettiklerini bildirmişlerdir. Baharatlıkta muhafaza eden erkek ve kadın sıklığı ise sırasıyla; %28.3 ve %30.1’dir. Erkek bireylerin %23.8’i baharatları kendi ambalajında muhafaza etmeye devam ederken, kadın bireylerin %13.2’si baharatları kendi ambalajlarında muhafaza etmektedir. Bir poşet içinde baharatları muhafaza eden erkek ve kadın bireylerin sıklığı ise sırasıyla; %3.3 ve %1.2’dir. Bireylerin cinsiyetlerine göre baharatları muhafaza etme yöntemleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $\chi^2$ :26.015,  $p<0.05$ ) (Şekil 1).



**Şekil 1.** Bireylerin cinsiyetlerine göre baharatları muhafaza yöntemleri

Tablo 3’te bireylerin eğitim düzeylerine göre baharatları muhafaza yöntemleri verilmiştir. Buna göre ilköğretim mezunu olan bireylerin %67.7’sinin baharatları cam kavanozda, %22.6’sının ise baharatlıkta muhafaza ettiği belirlenmiştir. Ortaokul mezunu olan bireyleri ise %46.9’u cam kavanozda, %32.7’si baharatlıkta ve %20.4’ü kendi ambalajında muhafaza etmektedir. Lise ve üniversite mezunu olan bireylerin ise sırasıyla; %47.5 ve %54.8’i cam kavanozda, %33.8 ve %27.0’si baharatlıkta ve %16.7 ve %16.3’ü ise kendi ambalajında muhafaza etmektedir. Tüm eğitim düzeylerinde baharatları bir poşet içerisinde muhafaza etme sıklıkları oldukça düşüktür. Baharatları muhafaza etme yöntemlerinin bireylerin eğitim düzeylerine göre farklılık gösterdiği bulunmuştur ( $\chi^2$ :35.777,  $p<0.05$ ) (Tablo 3).

Satın alındıktan sonra baharatların tazeliğinin, aromasının, kalitesinin ve güvenliğinin korunmasının en önemli yolu muhafaza yöntemidir. Baharatların özellikle öğütülmüş olanlarının sıcak ve nemli olmayan ortamlarda, ağzı kapalı ve renksiz kaplarda muhafaza edilmesi ve kısa süre içerisinde tüketilmesi besin güvenliği açısından önemli bir husustur (Yaldız and Kılınç, 2010). Bu kapsamda baharat muhafazasında cinsiyetin ve eğitim düzeyinin önemli bir faktör olduğu bulunmuş olup her iki cinsiyette ve tüm eğitim düzeylerinde baharatları uygun koşullarda muhafaza etmeyen bireylerin bilinç ve farkındalık düzeylerinin arttırılması gerekmektedir.

**Tablo 3.** Bireylerin Eğitim Düzeylerine Göre Baharatları Muhafaza Yöntemleri

Eğitim düzeyi	Kendi ambalajında		Cam kavanozda		Baharatlıkta		Poşette	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Okuryazar	4	36.4	4	36.4	3	27.3	-	-
İlkokul	5	8.1	42	67.7	14	22.6	1	1.6
Ortaokul	10	20.4	23	46.9	16	32.7	-	-
Lise	80	16.7	228	47.5	162	33.8	10	2.1
Üniversite	78	16.3	262	54.8	129	27.0	9	1.9
Yüksek lisans/doktora	1	5.0	18	90.0	1	5.0	-	-

## SONUÇ

Bu araştırmanın sonucunda yetişkin bireylerin baharat kullanımının yaygın olduğu ve muhafaza yöntemlerinin cinsiyete ve eğitim düzeyine göre farklılık gösterdiği bulunmuştur.

Son günlerde oldukça önem kazanan sürdürülebilir beslenme kavramının bir parçası, güvenilir, sağlıklı besin kullanımıdır. Baharatlar, uygun koşullarda üretilmediği ve muhafaza edilmediğinde ciddi sağlık riskleri oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu çalışma ülkemizde sıklıkla kullanılan baharatları, satın alma, kullanımı ve muhafazası hususunda tüketicinin bilinçlendirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Çoban ÖE, Patır B 2010. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(2):7-19.
- Demircioğlu Y, Yaman M, Şimşek I 2007. Kadınların baharat kullanım alışkanlıkları üzerine bir araştırma. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 6(3):161-168.
- Demirçivi BM, Altaş A 2016. Üniversite öğrencilerinin baharatlara ilişkin bilgileri ve tüketim tercihleri: Aksaray Üniversitesinde bir uygulama. Journal of Tourism and Gastronomy Studies 4(4):88-112.
- Firat YY, Tunçil E, Çelebi N, Çevik S, Öner N 2018. Kadınların baharat kullanımına yönelik alışkanlıkları, inanışları ve bilgi düzeyleri. ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 5(1-2):24-35.
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı 2013. Türk Gıda Kodeksi Baharat Tebliği. Tebliğ No: 2013/2.
- Guldiken B, Ozkan G, Catalkaya G, Ceylan FD, Yalcinkaya IE, Capanoglu E 2018. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. Food and Chemical Toxicology, 119:37-49.
- Öksüztepe G, Erkan S 2016. Mikotoksinler ve halk sağlığı açısından önemi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 5(2):190-195.
- Şen L, Nas S 2010. Kuru İncir, Üzüm ve Kırmızıbiberlerde Mikotoksin Varlığı. Akademik Gıda, 8(3):24-32
- Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, Roodenrys S, Keogh JB, Clifton PM, Williams PG and ve ark. 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. The Medical journal of Australia, 185(4 Suppl):S4-24.
- Uylaşer V, Karaman B, Kazancı Y 2005. Mikotoksinler ve insan sağlığına etkileri. Hasad, 21(244):43-48.
- Vural A, Kaya NBA, Mete M 2004. Bazı öğütülmüş baharatlarda küf ve maya florasının incelenmesi. Dicle Tıp Dergisi, 31(3):15-19.
- Yaldız G, Kılınç E 2010. Rize ili kentsel alanda tüketicilerin baharat tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5(2):28-34.

## Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) tohum uçucu yağının kullanım alanları ve uçucu yağ kompozisyonu üzerine diurnal varyabilitenin etkisi

Belgin Coşge Şenkal<sup>1\*</sup>, Tansu Uskutoğlu<sup>1</sup>, Esmâ Ersin<sup>1</sup>, Hülya Doğan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Yozgat, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: belgin.senkal@bozok.edu.tr

### Özet

Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) Umbelliferae familyasından dünya genelinde yetiştiriciliği yapılan önemli bir baharat ve uçucu yağ bitkisidir. Tek yıllık otsu yapıdaki bitkinin hem yeşil kısmı hem de tohumları farklı şekilde değerlendirilirken, tohumları gıdalara aroma kazandırmak için kullanılmaktadır. Tohumlarının bünyesinde %2.7'ye kadar ulaşabilen uçucu yağ bulunmaktadır. Uçucu yağın ana bileşeni olan linalool gıda, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte kişniş uçucu yağı diüretik, gaz giderici, kas gevşetici vb etkilerinden dolayı halk hekimliğinde de önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, Yozgat ekolojik koşullarında yetiştirilen iki adet kişniş (küçük taneli-Gürbüz ve iri taneli-Arslan) çeşidinin tohum uçucu yağ içeriği ve kimyasal kompozisyonu üzerine diurnal varyabilitenin etkisi incelenmiştir. 21.04.2017 tarihinde ekilen çeşitlerin tohum hasadı 12.08.2017 tarihinde yapılmıştır. Olgunlaşan bitkiler dört farklı zamanda (saat 07:00, 11:00, 15:00 ve 19:00) hasat edilmiştir. Hasat edilen tohumlar öğütülmüş ve Clevenger cihazıyla su distilasyonuna tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonu GC/MS ile analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda, Arslan çeşidinin uçucu yağ oranı %0.31-0.33, Gürbüz çeşidinin ise %0.33-0.47 arasında değişmiştir. En yüksek uçucu yağ oranı saat 19:00'da hasat edilen bitkilerden alınmıştır. Her iki çeşide ait uçucu yağda ana bileşen linalool (ortalama %74) olarak kaydedilmiştir. Bu bileşeni gamma-terpinene, geraniol ve camphor takip etmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kişniş, uçucu yağ, GC/MS, linalool

### The usage areas of coriander (*Coriandrum sativum* L.) seed essential oil and effect of diurnal variability on essential oil composition

### Abstract

Coriander (*Coriandrum sativum* L.) is a member of Umbelliferae family, which is cultivated as an important spice and essential oil plant in worldwide. The plant are annual herbaceous and both green parts and seeds are evaluated differently; seeds are used to give aroma to the food. The seeds essential oil content can reach up to 2.7%. The essential oil main component is linalool which is used in food, pharmaceutical and cosmetic products. In addition, coriander essential oil has an important place in folk medicine due to its diuretic, degassing, muscle relaxant etc. effects. In this study, the effect of diurnal variability on seed essential oil content and chemical composition of two coriander (small grain-Gurbuz and large grain-Arslan) cultivars grown in Yozgat ecological conditions were investigated. Seed sowing was done on 21.04.2017 and seed harvesting was carried out on 12.08.2017. The maturing plants were harvested at four different times (07:00, 11:00, 15:00 and 19:00). The harvested seeds were finely ground and subjected to water distillation with the Clevenger type apparatus. The chemical composition of the essential oils was analyzed by GC / MS. As a result of the research, the essential oil ratio of cv. Arslan ranged between 0.31-0.33% and cv. Gürbüz 0.33-0.47%. The highest essential oil was obtained from the plants harvested at 19:00. The essential oil component of both types was recorded as linalool (74% on average). This component was followed by gamma-terpinene, geraniol and camphor.

**Keywords:** Coriander, essential oil, GC/MS, linalool

### GİRİŞ

Bitkiler aminoasitler, basit şekerler, nükleik asitler ve lipitler gibi hücresel işlemler için gerekli olan birincil (primer) metabolitlerin haricinde, ikincil (sekonder) metabolitler de sentezlerler. Bitkiler tarafından üretilen bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili olamayan ikincil metabolitler (alkaloitler, uçucu yağlar, glikozitler, steroidler, fenoller vb), tıp, gıda, kozmetik vb. alanların önemli hammaddeleridir. Söz konusu sekonder metabolitlerden olan uçucu yağlar, aromatik bitkilerin salgı tüyleri, salgı cepleri, salgı kanalları, salgı hücreleri gibi bazı özel metabolik doku ve organlarında çok küçük damlacıklar halinde biriken sekonder metabolitlerdir (Baydar, 2009).

Tek yıllık ve otsu yapıda olan kişniş (*Coriandrum sativum* L., Umbelliferae/Apiaceae), 20-70 cm arasında boylanan bir gövdeye sahiptir. Bitkinin Haziran-Temmuz aylarında beyaz veya açık pembe renkli çiçekleri açar. Meyveleri açık sarı-kahve renkli, 2-4 mm çapında, küre biçiminde şizokarptır. 1000 meyve ağırlığı 5-18 g arasında değişmektedir. Kişniş meyve büyüklüğüne göre küçük meyveli (*C.sativum* var. *microcarpum*) ve büyük meyveli (*C. sativum* var. *macrocarpum*) kişniş olmak üzere iki varyeteye ayrılmaktadır. Değerli bir baharat ve uçucu yağ bitkisi olan kişnişin ekonomik olarak değerlendirilen kısımları meyveleridir. Kurutulmuş kişniş meyvelerinden su buharı distilasyonu ile %0.03-2.7 arasında uçucu yağ elde edilir. Uçucu yağın bileşiminde en fazla linalool (%60-70) bulunmaktadır (Ravi ve ark., 2007; Baydar, 2009; Shahwar ve ark., 2012)

Bitkilerin bünyelerindeki sekonder metabolitler bitkinin kullanılan organına, bitkinin hayat devresine ve bitkinin toplama zamanına göre değişmektedir. Sekonder metabolitlerin bitkide günlük, hatta saatlik değişimine diurnal varyabilite denilmektedir.

### **KİŞNİŞ (*Coriandrum sativum* L.) TOHUM UÇUCU YAĞININ KULLANIM ALANLARI**

Kişniş tohumlarından elde edilen uçucu yağ dünya piyasasındaki en önemli 20 uçucu yağ içerisinde yer almaktadır. Kuru tohumlarında %0.03-2.7 arasında değişen oranlarda uçucu yağ içermektedir (Shahwar ve ark., 2012). Bu yağın büyük bir kısmını linalol oluşturmaktadır. Uçucu yağ antibakteriyel, antifungal ve antioksidan aktivite sergilemektedir (Shahwar ve ark., 2012; Mandal ve Mandal, 2015).

İnsanlar için herhangi bir toksik etkisi bulunmayan kişniş bitkisinin uçucu yağı bu nedenden dolayı farklı alanlarda kullanılmaktadır.

- Gıdalarda tatlandırıcı ve koruyucu olarak,
- Farmasötik ürünlerde,
- Parfümlerde,
- Aromaterapide kullanılmaktadır (Mandal ve Mandal, 2015).

Tohumdan elde edilen uçucu yağı; alkollü içkiler, tütün, şeker, turşular, et sosu vb. dahil her türlü gıda ürünüde tatlandırıcı ajan olarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Gıda sanayinde ortalama 0.1-100 ppm düzeyinde kullanılmaktadır. Ayrıca, uçucu yağ gıdalarda oksidatif bozulmayı önleyen serbest radikal temizleyici olarak da değerlendirilmekte olup, gıdaların raf ömrünün korunmasında büyük rol oynamaktadır (Elgayyar ve ark., 2001). Genelde yaygın olarak kullanılan kimyasal ve toksik antioksidanların (BHT) yerine kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Linalol bakımından zengin uçucu yağ içeren tohumlar temel olarak baharat ve ilaçların bileşeni olarak kullanılır. Kişniş uçucu yağı diüretik, gaz giderici, kas gevşetici vb. etkilerinden dolayı halk hekimliğinde de önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte, uçucu yağın oral hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Al-Snafi, 2016).

Bu çalışmada, Yozgat ekolojik koşullarında yetiştirilen iki adet kişniş (küçük taneli-Gürbüz ve iri taneli-Arslan) çeşidinin tohum uçucu yağ içeriği ve kimyasal kompozisyonu üzerine diurnal varyabilitenin etkisi incelenmiştir.

### **MATERYAL VE METOT**

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü tarafından tescil edilen Arslan (Büyük Taneli) ve Gürbüz (Küçük Taneli) kişniş çeşitleri kullanılmıştır. İki çeşide ait tohumlar 21 Nisan 2017 tarihinde sıra arası 30 cm, sıra uzunluğu 3 m ve her sıraya 1 g tohum gelecek şekilde elle ekim yapılmıştır. Tohumlar olgunlaşma döneminde (12 Ağustos 2017) 4 farklı saatte (07:00, 11:00, 15:00 ve 19:00) hasat edilmiştir.

Öğütülmüş 100'er gram tohum balon jöjelere yerleştirilmiş ve üzerine 750 mL su ilave edilerek 3 saat süreyle Clevenger cihazında distilasyona tabi tutulmuştur. Kuru madde üzerinde % uçucu yağ oranları belirlenmiştir. Elde edilen uçucu yağlar eppendorf tüplerine alınarak analiz edilmeye kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Uçucu yağların kimyasal bileşenleri Yozgat Bozok Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde Shimadzu, QP2010 ULTRA marka Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC/MS)



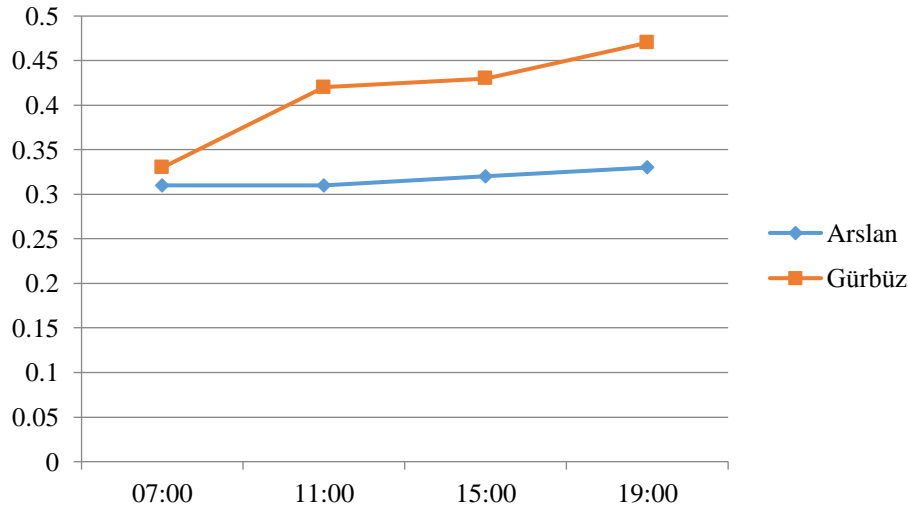
kullanılarak tespit edilmiştir. GC/MS analizinde kullanılan kromatografik yöntem ile ilgili bilgiler Tablo1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** GC/MS için kromatografik yöntem

GC parametreleri			MS parametreleri		
Fırın sıcaklığı	Oran (°C/dk)	Son sıcaklık (°C)	Tutulma zamanı (dk)	Tarama hızı:	50-550 (m/z)
-	-	70	1	Transfer sıcaklığı:	250 °C
20	20	180	1	İyon kaynağı sıcaklığı:	200 °C
10	10	280	10	MS Kütüphanesi:	FFNSC 1.2
Kolon:	Rxi-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)				
Taşıyıcı gaz:	Helyum				
Enjeksiyon sıcaklığı:	250 °C				
Split oranı:	10				
Akış oranı:	1.10 mL/dk				

## BULGULAR VE TARTIŞMA

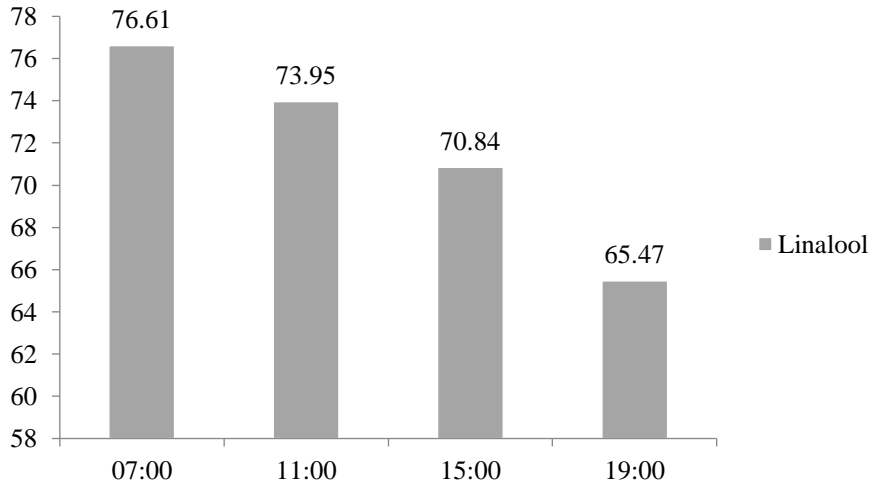
Arslan çeşidinin uçucu yağ oranı %0.31-0.33, Gürbüz çeşidinin ise %0.33-0.47 arasında değişmiştir. En yüksek uçucu yağ oranı saat 19:00’da, en düşük uçucu yağ oranı ise saat 07:00’de hasat edilen bitkilerden alınmıştır. Ancak, Arslan çeşidinde saat 07:00 ile 11:00’de hasat edilen bitkilerin uçucu yağ oranları (%0.31) aynı bulunmuştur (Şekil 1).



**Şekil 1.** Kişniş çeşitlerinin uçucu yağ içeriklerinin diurnal varyabilitesi

Genel olarak kişniş tohumlarındaki uçucu yağ miktarı %0.03-2.6 arasında değişmektedir (Khan ve ark., 2009; Shahwar ve ark., 2012; Tsagkli ve ark., 2012; Bhat ve ark., 2014). Bu değişimde tür, ekoloji ve iklim koşulları gibi faktörlerin önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Khan ve ark., 2009). Bu bağlamda farklı ülkelerde yürütülen çalışmalardan farklı sonuçlar alınmıştır. Örneğin; Bangladeş, Kanada ve Türkiye’de yürütülen çalışmalardan sırasıyla %0.42 (Bhuiyan ve ark. 2009), %0.8-2.2 (Zheljzskova ve ark. 2008) ve %0.15-0.43 (Telci ve ark. 2006) arasında değişen uçucu yağ oranları tespit edilmiştir.

Her iki çeşidin dört farklı saatte hasat edilen tohumlarından elde edilen uçucu yağlarda linalool ana bileşen olarak tespit edilmiştir. Linalol değeri Arslan çeşidinde %64.49-75.69, Gürbüz çeşidinde ise %65.83-77.53 arasında değişmiştir. Her iki çeşitte de bu değer saat 07:00’de hasat edilen bitkilerde daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Çeşitlere ait ortalamalar dikkate alındığında; linalol değeri hasat saatinin gecikmesiyle azalma eğilimi sergilemiştir (Şekil 2). En yüksek linalol değeri (%77.53) Gürbüz çeşidinin 07:00’da hasat edilen tohumların uçucu yağında kaydedilmiştir. Linalol’den sonra en yüksek değere sahip bileşenler olarak “geraniol, gamma-terpinene ve campor” tespit edilmiştir.



**Şekil 2.** Kişniş çeşitlerinin ortalama linalool değerinin diurnal varyabilitesi (%)

Geraniol %6.11 (Gülbüz, saat 11:00) - 12.31 (Arslan, saat 07:00), gamma-terpinene %2.72 (Arslan, saat 07:00) - 11.67 (Arslan, saat 19:00) ile camphor %2.82 (Arslan, saat 07:00) - 5.81 (Arslan, saat 19:00) arasında değişim sergilemiştir (Tablo 2). Gamma-terpinene'de en yüksek değer saat 19:00'da, en düşük değer ise saat 07:00'de hasat edilen bitkilerden alınmıştır. Benzer durum camphor içinde geçerlidir. Romanya'da yürütülen bir çalışmada Sandra kişniş çeşidinin tohumlarından elde edilen uçucu yağda ana bileşenin linalol (%48.4-54.3) olduğunu, diğer önemli bileşenler olarak ise gamma-terpinene (%9.2-12.1), alpha-pinene (%5.5-9.3) ve limonene (%4.7-6.3) tespit edilmiştir (Tsagkli ve ark. 2012). Shahwar ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada kişniş tohum uçucu yağında ana bileşen linalol (%55.49) olmuş, bu bileşeni %7.47 ile gamma-terpinene, %7.14 ile alpha-pinene ve %5.59 ile camphor takip etmiştir. Bhat ve ark. (2014) kişniş genotipine bağlı olarak uçucu yağdaki linalool oranını %65-70 arasında değişebileceğini ifade etmişlerdir. Önceki yıllarda yürütülen çalışmaların sonuçları dikkate alındığında; kişniş tohumlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonunun ekolojiye ve genotipe göre önemli değişimler sergilediği görülmekle birlikte ana bileşenlerin linalol (%37-87), geraniol asetat (%0.9-17), gamma-terpinene (%0.1-14) olduğu, bunların dışında *p*-mentha-1,4-dien-7-ol, alpha-pinene ve neryl acetate'ında ana bileşenler arasında yer aldığı ifade edilmektedir (Msaada ve ark., 2007; Zheljzskova ve ark., 2008; Bhuiyan ve ark., 2009; Zoubiri ve Baaliouamer, 2010). Önceki yıllarda yapılan araştırma sonuçları ile bizim bulgularımız benzerlik sergilemektedir.

Araştırmadan elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde; Arslan çeşidinin uçucu yağ oranı %0.32-0.33, Gülbüz çeşidinin ise %0.36-0.47 arasında değişmiştir. En yüksek uçucu yağ oranı saat 19:00'da hasat edilen bitkilerden alınmıştır. Her iki çeşide ait uçucu yağda ana bileşen linalol (ortalama %74) olarak kaydedilmiştir. Bu bileşeni gamma-terpinene, geraniol ve camphor takip etmiştir. Kişniş uçucu yağının sergilemiş olduğu biyolojik aktivitelerin (antioksidan ve antibakteriyal gibi); içerdiği limonen alpha-pinene, camphor gibi bileşiklerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerde uçucu yağın kimyasal kompozisyonu kaliteyi belirleyen önemli bir unsurdur. Bu nedenle, bitkilerden elde edilen uçucu yağların kalitesinin iyileştirilmesi kapsamında gün içerisinde en uygun hasat saatinin tespit edilmesi önemli bir konudur. Yürüttüğümüz çalışmada da en yüksek linalool değeri saat 07:00'da hasat edilen bitkilerden elde edilmiştir.

**Tablo 2.** Kışniş çeşitlerine ait tohum uçucu yağının kimyasal bileşenlerinin diurnal varyabilitesi

No	Bileşik	RT*	07:00		11:00		15:00		19:00	
			A	G	A	G	A	G	A	G
1	Alpha-thujene	3.671	-	-	-	-	-	0.03	-	0.03
2	Alpha-pinene	3.760	0.39	1.57	1.03	1.67	2.02	3.49	2.22	4.56
3	Camphene	3.909	0.03	0.13	0.11	0.15	0.19	0.29	0.24	0.36
4	Sabinene	4.093	-	0.13	0.13	0.13	0.20	0.27	0.73	0.31
5	Beta-Pinene	4.152	0.05	0.30	0.23	0.31	0.33	0.57	-	0.70
6	Beta-Myrcene	4.182	-	0.25	0.21	0.26	0.41	0.64	-	0.61
7	Myrcene	4.185	-	-	-	-	-	-	0.47	-
8	Alpha-terpinene	4.468	-	-	-	-	-	0.04	-	0.04
9	Alpha-humulene	4.469	-	-	-	-	0.03	-	-	-
10	Ortho-Cymene	4.537	-	0.49	0.73	0.67	1.19	1.17	1.68	1.09
11	Para-Cymene	4.538	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Limonene	4.578	0.41	1.26	1.43	1.45	1.72	2.29	2.52	2.14
13	Beta-ocimene	4.695	-	-	-	-	-	0.10	-	-
14	Gamma-Terpinene	4.831	2.72	6.00	8.11	6.94	9.22	10.14	11.67	10.01
15	1,4-cineole	4.925	0.20	-	-	-	0.10	0.07	-	-
16	Trans-sabinenehydrate	4.930	-	0.01	0.01	0.02	-	-	-	0.01
17	Alpha-terpinolene	5.106	-	-	-	-	0.13	0.14	-	0.13
18	Linalool	5.203	75.69	77.53	73.52	74.38	67.29	65.83	64.49	66.44
19	Citronellal	5.615	-	-	-	0.02	0.03	0.04	-	0.02
20	Camphor	5.667	2.82	3.24	3.67	4.22	5.44	4.76	5.81	4.28
21	1-Borneol	5.836	0.22	0.11	0.14	0.22	0.49	0.37	0.26	0.25
22	Terpinen-4-ol	5.911	0.18	0.14	0.19	0.18	0.36	0.28	0.26	0.26
23	L-alpha-Terpineol	6.013	0.39	0.15	0.21	0.25	0.41	0.31	-	0.28
24	Myrtenol	6.074	0.34	-	0.27	0.29	0.45	0.34	-	0.32
25	L-citronellol Citral	6.253	0.29	0.11	-	-	0.24	0.20	-	-
26	Geraniol	6.444	12.31	7.11	6.11	8.45	9.20	8.17	8.81	7.72
27	Cis-myrtanol	6.615	-	0.01	-	0.01	0.03	0.03	-	0.02
28	Caryophyllene	8.109	0.40	0.33	0.21	0.31	0.33	0.34	0.32	0.33
29	Germacrene D	8.686	0.12	0.06	-	-	-	-	-	-
30	Bicyclogermacrene	8.833	-	-	-	0.06	-	0.05	-	0.05
31	Cycloheptasiloxane	8.455	-	-	-	-	-	-	0.06	-
32	Germacrene D-4-ol	10.089	0.11	-	-	-	0.07	-	-	-
33	2-tridecenal	10.378	-	-	-	-	-	-	0.17	-
34	Phytone	12.125	0.17	-	-	-	-	0.06	-	-
35	Cis-sclareoloxide	12.953	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Amberin	16.221	1.51	0.79	-	-	-	-	-	-
TOPLAM			98.35	99.72	96.31	99.99	99.88	100.0	99.71	99.96
Uçucu Yağ Oranı (%)			0.31 ±0.01	0.33 ±0.03	0.31 ±0.025	0.42 ±0.03	0.32 ±0.01	0.43± 0.025	0.33± 0.025	0.47± 0.02

\* RT: Retention Time

## KAYNAKLAR

- Al-Snafi AE 2016. A review on chemical constituents and pharmacological activities of *Coriandrum sativum*. IOSR Journal of Pharmacy. 6(7): 17-42.
- Baydar H 2009. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Yayın No:51, Isparta
- Bhat S, Kaushal P, Kaur M, Sharma HK 2014. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects. African Journal of Plant Science. 8(1): 25-33.
- Bhuiyan NI, Begum J, Sultana M 2009. Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh Bangladesh J Pharmacol, 4: 150-153
- Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of Food Protection. 64: 1019-1024.
- Khan AL, Javid H, Rehman N, Khan F, Hussain ST, Shinwari ZK 2009. Proximate and nutrient investigations of selected medicinal plants species of Pakistan. Pakistan Journal of Nutrition, 2009(8): 620-624.

- Mandal S, Mandal M 2015. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Chemistry and biological activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. m(m): 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.04.001>
- Msaada K, Hosni K, Ben Taarit M, Chahed T, Kcouk ME, Marzouk B 2007. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. Food Chem. 102: 1131-1134.
- Parthasarathy VA, Zachariah TJ 2008. Chemistry of Spices. "Coriander". Ed: Parthasarathy, VA, Chempakam, B., Zachariah, TJ. CAB International, UK.
- Ravi R, Prakash M, Bhat KK 2007. Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. Eur Food Res Technol. 225: 367-374.
- Shahwar MK, El-Ghorab AH, Anjum FM, Butt MS, Nadeem M 2012. Characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds and leaves: Volatile and non volatile extracts. International Journal of Food Properties. 15:736-747.
- Telci I, Gul TO, Sahbaz N 2006. Yield, essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* varieties (var. *vulgare* Alef and var. *microcarpum* DC.) grown in two different locations. J Essent Oil Res, 18:189-193.
- Tsagkli A, Hancianu M, Aprotosoiaie C, Cioanca O, Tzakau O 2012. Volatile constituents of Romanian coriander fruit. Rec. Nat. Prod. 6(2): 156-160.
- Zheljaskova VD, Pickett KM, Caldwell CD, Pincock JA, Roberts JC, Mapplebeck L 2008. Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada Ind Crop Prod, 28:88-94.
- Zoubiri S, Baaliouamer A 2010. Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. Food Chem, 122 : 1226-1228.

## Exploring Comperative Effects of Sodium Lauryl Sulphate (SLS) and Sodium Laureth Sulphate (SLES) Zebrafish Embryos and Larvae

Burak Gökçe\* , Mustafa Kıran, Sema İşisağ Üçüncü

Ege University, Science Faculty, Biology Department, Zoology Section Izmir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [burak\\_gokce@yahoo.com](mailto:burak_gokce@yahoo.com)

### Abstract

Currently surfactants are widely distributed in the environments and have been continuously detected within aquatic environments as a consequence of their use on a global scale. As organic pollutants, their effects have drawn extensive attention. Sodium Lauryl Sulphate also is known as Sodium Dodecyl Sulphate (SLS / SDS) is a synthetic organic compound and used as an anionic surfactant in many hygiene products. Sodium Laureth Sulfate or Sodium Lauryl Ether Sulfate (SLES) is an anionic detergent and used as a foaming agent in many personal care products. SLES is produced from SLS with the ethoxylation process. In this study, the effects of SLS and SLES surfactants on zebrafish larval behavior were explored and compared. Five behavioral parameters were recorded using larval rest/wake assay including rest total, the number of rest bouts, rest bouts length, total activity, and waking activity. Moreover, we also tested the toxicities of these surfactants in developing zebrafish embryos. Results were indicated that these surfactants have concentration-dependent effects on zebrafish larval behavior and embryonic development. Our findings provide references for ecotoxicological comparison of different types of surfactants and first comparative results for SLES toxicity.

**Keywords:** Sodium Lauryl Sulphate, Sodium Dodecyl Sulphate, Sodium Laureth Sulfate, Zebrafish, Toxicity.

### INTRODUCTION

Water pollution is a major problem for global ecosystem. The sewage from domestic waste, agriculture, and industry threatens the aquatic ecosystem and public health, and water pollution has aroused considerable public attention around the world in recent decades. As an organic pollutants surfacants are widely distrubuted in the environment and their toxicities have drawn extensive attention (Ying, 2006; Peterson et al., 2000). surfactants are organic and amphiphilic compounds. They consisted of both hyrophobic and hydrophilic groups. There are four types of surfactants and their classification are based upon the composition of the polarity of the head group: nonionic, anionic, cationic and amphoteric.

Sodium dodecyl sulfate (SDS), synonymously, sodium lauryl sulfate (SLS), or sodium laurilsulfate, is a synthetic organic compound. SDS is mainly used in detergents for laundry with many cleaning applications. Sodium laureth sulfate (SLES), an accepted contraction of sodium lauryl ether sulfate (SLES), is an anionic detergent and surfactant found in many personal care products (soaps, shampoos, toothpaste, etc.). SLES is prepared by ethoxylation of dodecyl alcohol, which is produced industrially from palm kernel oil or coconut oil. The resulting ethoxylate is converted to a half ester of sulfuric acid, which is neutralized by conversion to the sodium salt. The related surfactant sodium lauryl sulfate (also known as sodium dodecyl sulfate or SDS) is produced similarly, but without the ethoxylation step. SLS and ammonium lauryl sulfate (ALS) are commonly used alternatives to SLES in consumer products (Haigh, 1996; Garcia et al., 2007)

Studies have previously assessed the toxicity and safety of surfactants. Masakorala et al. Examined the toxicities of sodium dodecyl sulphate (SDS), Triton X-100 (TX) and hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA) in marine macroalgae and found that all of them reduced the efficiency of photochemical energy conversion, and SDS had a lesser effect compared to TX and HDTMA. Vaughan et al. tested the acute toxicity of anionic, cationic and non-ionic surfactants in zebrafish embryos and adults. Their study indicated that embryos are as sensitive to cationic and non-ionic surfactants as adult fish but may be more sensitive to anionic surfactants. However, few studies have investigated the developmental and behavioral effects (Wang et al., 2015)

In this study, the effects of SLS/SDS and SLES surfactants on zebrafish larval behaviours were evaluated.

## MATERIAL AND METHODS

### Zebrafish:

The zebrafish (wild type) were raised in a standard water system at 28.5 °C temperature with a 14 h light/10 h dark cycle. The zebrafish were fed with commercial fish food. A day before, one male and one female zebrafish were transferred to a breeding tank. The next morning, eggs were collected from the breeding tanks and cultured in system water at 28.5 °C. The embryos were stored with sufficient room to develop normally. The solutions were renewed three times per day. The larvae were used for behavioural assays at 4 dpf.

### Larval sleep/wake Assay for Testing The Behavioural Activity of Zebrafish Treated with SLS/SDS and SLES:

To observe the concentration-toxicity relationships between two surfactants and zebrafish larvae, four concentrations (0.1, 0.5, 1 and 1.5 µg/mL) were used. Ten fish were tested for each group. After exposing the zebrafish larvae to the surfactants for 12 hours, we used a custom video tracking system to record their locomotor activity over 48 continuous hours. In this system, the larvae were pipetted into a 96-well plate. To minimise evaporation, the 96-well plate was sealed with a layer of plastic film.

### Data Analyses

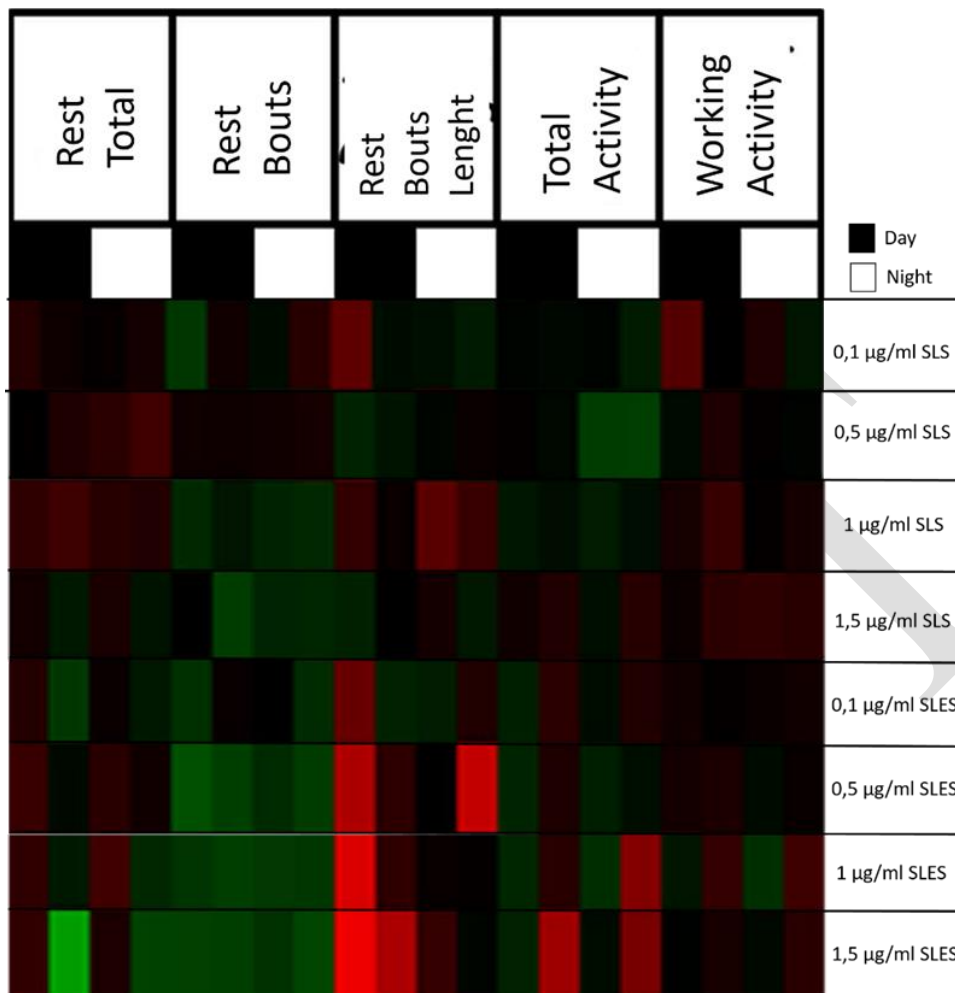
We obtained a time series from the raw data of the offline file. Each number in the time series represented the number of movements by one larva in one minute during the 48 consecutive hours. To assess the larval rest/wake behavioural changes, five parameters were extracted from the raw data: rest total, the number of rest bouts, rest bouts length, total activity and waking activity. These parameters were calculated for each experimental day and night.

Any minute with less than 0.3 seconds of total movement was defined as one rest minute. A rest bout was defined as a continuous series of rest minutes. The rest total was defined as the total minutes of rest during all experimental days and nights. The rest bout length was defined as the average length of a continuous string of rest minutes. The total activity was defined as the average amount of activity per animal. Waking activity was also defined as the average amount of activity after excluding all rest minutes. We replicated the rest/wake behavioural assay three times for each surfactant on independent occasions. The value for each parameter is the average of all of the repeated experiments and is expressed as the means ± standard error of the mean (SEM).

One-way ANOVA was conducted to assess differences between the four treated groups and the control group. P-values <0.05 were considered to indicate significance. Among the five parameters, total rest and waking activity were normalised to the controls and averaged in 10-minute intervals; these were then used to generate a time series. The controls were also plotted for comparison. For each surfactant, five parameters were tested at four doses, which were normalised to the controls and constituted a feature vector. These feature vectors were used to perform k-means clustering analyses based on the Euclidean distance. The feature vectors were taken as behavioural fingerprints for each surfactant.

## RESULTS AND DISCUSSION

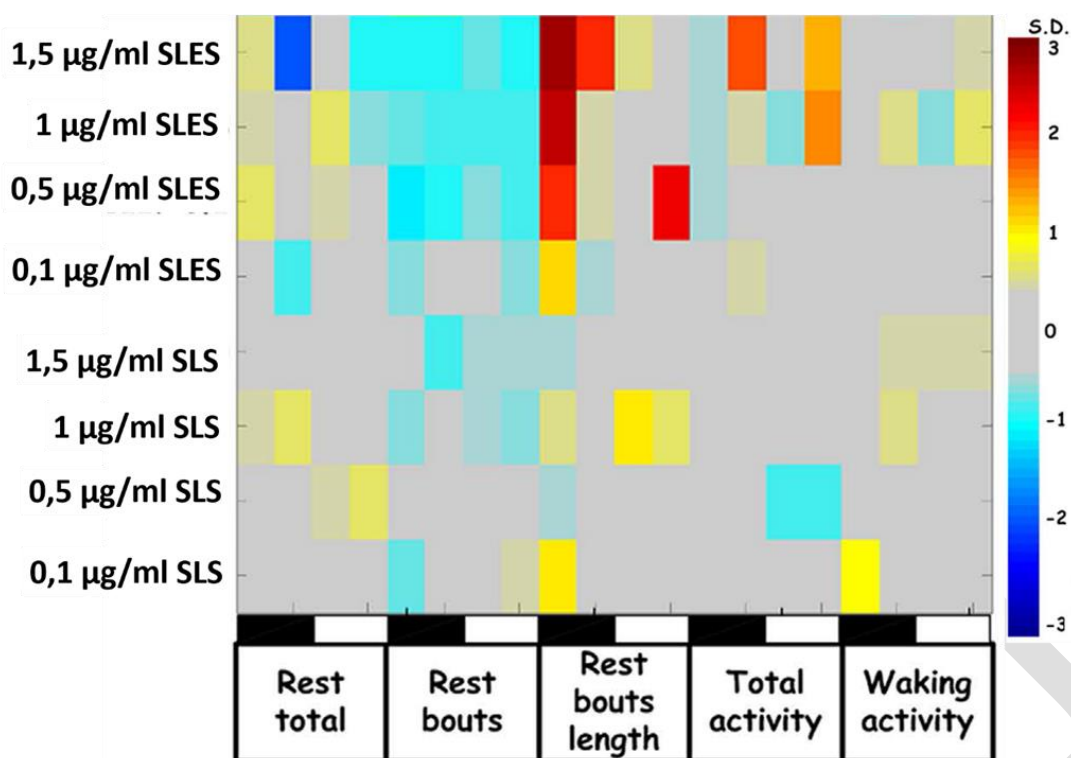
Behavioural similarities induced by SLS/SDS and SLES: In the k-means clustergram, each row represents a chemical at a unique dose, and each column represents a behavioural parameter. The black bars indicate the night measurements, and the white bars indicate the day measurements. From left to right, the parameters were: total time spent at rest, number of rest bouts, rest bout length, total activity and waking activity. These parameters were normalised as standard deviations from the control values. The red and green colours indicate that the values are higher and lower than the controls, respectively (Figure 1)



**Figure 1.** Behavioral Similarities

### Qualitative And Quantitative Analyses of Behavioural Changes Caused by SLS/SDS And SLES

In the fingerprint, five parameters were described. From left to right, the parameters were: total time spent at rest, number of rest bouts, rest bout length, total activity and waking activity. Each row represents a chemical at a unique dose, and each column represents a behavioural parameter. The measurements are normalised as standard deviations from the control values. The blue and red colours indicate that the values were lower and higher relative to the control values. The black bars indicate the night measurements, and the white bars indicate the day measurements (Figure 2).



**Figure 2.** Qualitative and quantitative analyses of behavioral changes.

Our experimental protocols briefly referred to Rihel et al. (2010), in which an automatic video recording system was employed to observe the rest/wake behaviour of zebrafish larvae exposed to thousands of psychotropic drugs, followed by the assessment of the neural pathways affected by these compounds.

To obtain the locomotor activity data of larval rest/wake behaviour for 48 continuous hours, a custom program was developed and integrated the use of a camera (WANG et al., 2015). With anionic and non-ionic surfactants, chronic toxicity usually occurs at concentrations greater than 0.1 µg/mL; thus, we used concentrations of 0.1, 0.5, 0.1, and 1,5 µg/mL to determine various concentration effects. The rest/wake behaviour of zebrafish is very complex. Five behavioural parameters were further quantitatively analysed to compare the effects of the two surfactants on larval rest/wake behaviour. After exposure to SDS, the treated groups showed no significant changes relative to the controls.

The SLES treated group displayed more marked effects. The number of rest bouts was remarkably decreased at night in this group. The lowest observed effective concentration (LOEC) was 0.2 µg/mL. The animals' total activity increased during the second day. The rest total, rest bouts length and waking activity were not significantly different from those of the controls. To compare the differences between these behavioural measures during the day vs those during the night, we calculated the total values for the number of rest bouts and the total day and night activity, respectively. SLES caused significant changes at 0.2, 0.5, and 1 µg/mL, while SDS had little effect on the two parameters. From the SDS, SLES and analyses, we found that SLES increased larval locomotor activity. Our results were shown similarities with other studies performed with same or similar molecules (Wang et al., 2015) In summary, SLES more toxic to the locomotor activity of zebrafish larvae than SDS.

## REFERENCES

- Garcia M.T., Campos E., Ribosa I. 2007. Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants. *Chemosphere* 69:1574-8.
- Haigh S.D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Sci Total Environ* 185:161-70.



Petersson A., Adamsson M., Dave G.T. 2000. Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere* 41:1611-20.

Rihel J., Prober D.A., Schier A.F., 2010. Chapter 11 - Monitoring Sleep and Arousal in Zebrafish *Methods in Cell Biology*, 100:281-294.

Wang Y., Zhang Y., Li X., Sun M., Wei Z., Wang Y., Gao A., Chen D., Zhao X., Feng X. 2015. Exploring the Effects of Different Types of Surfactants on Zebrafish Embryos and Larvae. *Scientific Reports* volume 5, Article number: 10107 (2015).

Ying G.G. 2006. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int*, 32:417-31.

DRAFT

## Bitlis Katı Atık Birliği (BİKA) Katı Atık Depolama Sahası Sızıntı Suyunun Fitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Hülya Durmaz Bekmezci<sup>1\*</sup>, Ensar Ömer Çetin<sup>1</sup>, Emine Keserci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bitlis Eren Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Bitlis, Türkiye

\*hulyadurmaz80@gmail.com

### Özet

Hızlı nüfus artışı, artan sanayi ve endüstrileşme ile birlikte oluşan atıklar gün geçtikçe büyüyen bir sorun haline gelmiştir. Atıklar oluştukları alanlarda ve düzensiz depolama alanlarında toplum sağlığını tehdit eden koşulların oluşmasına neden olmaktadır. Düzenli depolama, atıkların bertarafında en uygun, ucuz ve tercih edilen yöntemdir. Depolama alanlarının en büyük dezavantajı sızıntı sularının oluşmasıdır. Sızıntı suları çok sayıda kirleticiyi kompleks bir şekilde içermektedir. Katı atık kompozisyonu zamana ve bölgelere göre farklılık göstermektedir. Buna bağlı olarak sızıntı suyu kalitesi de farklılık göstermektedir. Bileşimi hızla değiştiği ve kirleticileri yoğun şekilde içerdiği için sızıntı suları arıtılmaları en zor olan sulardır. Değişkenlik göstermekle birlikte temel bileşiminde bulunan yüksek organik madde miktarı, azotlu maddeler, ağır metaller, organik ve inorganik tuzlar nedeni ile yeraltı ve yüzey sularıyla birlikte toprak kirlenmesine neden olabilmektedirler. Kirleticilerin çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde kimyasal ve biyolojik yöntemler birlikte kullanılmalıdır. Kimyasal testler ölçülemeyen düzeydeki kimyasalları ve kirleticilerin birlikte etkilerini gösteremezler. Uluslararası kuruluşlar tarafından çevresel kirleticilerin etkilerini ortaya koyabilecek çok sayıda test tanımlanmıştır. Bitkilerde çimlenme ve büyüme inhibisyonunun ölçümüne dayanan fitotoksite testleri bunlardan biridir. Bu çalışmada BİKA Katı Atık Depolama Sahası (Bitlis) sızıntı sularının karasal ekosistem üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla *Lepidium sativum* ile fitotoksite testi uygulanmıştır. Sızıntı suyu toplama havuzundan alınan su ile hazırlanmış 9 farklı seyreltme oranında sızıntı suyu (%10 -%90), stok besin çözeltisi (pozitif kontrol) ve ham sızıntı suyu (negatif kontrol) etkisinde bırakılan tohumların çimlenme yüzdesi, kök ve gövde uzunlukları ölçülmüştür. Gruplar arasındaki fark ANOVA Tukey testi ile analiz edilmiştir. En yüksek çimlenme oranı ile kök ve gövde uzamaları pozitif kontrolde tespit edilirken, sızıntı suyu oranı arttıkça büyümenin yavaşladığı görülmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Sonuç olarak, Bitlis İli Katı Atık Depolama sahası katı atık sızıntı suyu *L. sativum* için fitotoksiktir.

**Anahtar Kelimeler:** Katı atık, Sızıntı suyu, Fitotoksite, *Lepidium sativum*, Bitlis.

### Phytotoxicity assessment of Bitlis Solid Waste Association (BİKA) solid waste landfill leachate

#### Abstract

With the rapid population growth and increasing industrialization, wastes have become a growing problem. Wastes create conditions threatening public health in the areas where they occur and in irregular landfills. Landfill is the most convenient, inexpensive and preferred method of disposal. The main disadvantage of landfill is the formation of leachate. Leachate contain complexly a large number of pollutants. Solid waste composition varies according to time and region. Consequently, the quality of leachate varies. Since the composition changes rapidly and contains pollutants intensively, the leachate is the most difficult to treat. Although variable, due to the high organic matter, nitrogenous substances, heavy metals, organic and inorganic salts contained in the basic composition, they can cause ground and surface water and soil contamination. Chemical and biological methods should be used together to evaluate the environmental effects of pollutants. Chemical tests cannot demonstrate the effects of unmeasurable amounts of chemicals and the combined effects of pollutants. Numerous tests have been identified by international organizations to demonstrate the impact of environmental pollutants. Phytotoxicity tests based on measurement of germination and growth inhibition in plants are one of them. In this study, phytotoxicity test was applied with *Lepidium sativum* to evaluate the possible effects of BİKA Solid Waste Landfill (Bitlis) leachate on terrestrial ecosystem. Seed germination percentage, root and stem lengths were measured at 9 different dilution rates (10% -90%) prepared by leachate from leachate collection pond, stock nutrient solution (positive control) and raw leachate (negative control). The difference between the groups was analyzed by ANOVA Tukey test. While the highest germination rate and root and stem elongations were detected in the positive control, growth slowed down as the leachate ratio increased. The difference between the groups was statistically significant ( $p < 0.05$ ). As a result, Bitlis Province Solid Waste Landfill leachate is phytotoxic for *L. sativum* leachate.

**Keywords:** Solid waste, Leachate, Phytotoxicity, *Lepidium sativum*, Bitlis.

## GİRİŞ

Hızlı nüfus artışı, artan sanayi ve endüstrileşme ile birlikte oluşan atıklar gün geçtikçe büyüyen bir sorun haline gelmiştir. 29314 sayılı “Atık Yönetimi Yönetmeliği”nde atık “üreticisi veya fiilen elinde bulunduran gerçek veya tüzel kişi tarafından çevreye atılan veya bırakılan ya da atılması zorunlu olan herhangi bir madde veya materyal”, olarak tanımlanmaktadır. Atıklar oluştuğu alanlarda ve düzensiz yapılan depolama işlemleri ile toplum sağlığını tehdit eden koşulların oluşmasına neden olurlar. Atıkların toplanması, taşınması, depolanması ve bertarafı yerel yönetimlere devredilmiştir. Belediyeler ve büyükşehir belediyeleri bu kapsamda düzenli depolama sahaları kurmak ve işletilmesini sağlamakla yükümlüdür (Atık Yönetimi Yönetmeliği, 2015). Bitlis ilinde Bİ-KA birliği (Bitlis İli, İlçeleri ve Beldeleri Katı Atık Bertaraf Tesisleri Yapma ve İşletme Birliği) oluşturulmuştur. 2010 yılında inşası biten ve 2011 yılı Ocak ayı itibarı ile Merkez ilçe, Tatvan ve Güroymak ilçelerinden belediyelere ait atıklar “Bitlis Düzenli Katı Atık Depolama Tesisi”nde” depolanmaya ve bertaraf edilmeye başlanmıştır (Can ve ark., 2014).

Düzenli depolama ile atıklar kontrollü bir şekilde stabilize olmuş maddelere dönüşüncüye kadar anaerobik olarak parçalanmaktadır. Atıkların sıvı içeriği ve depo alanına düşen yağmur sularının sızması ile zamana bağlı olarak sızıntı suyu oluşmaktadır. Sızıntı suları toplama kanalları ile depo sahasından ayrılmakta, sızıntı suyu toplama havuzlarında biriktirilmektedir. Sızıntı suları çok sayıda kirleticiyi kompleks olarak içermektedir. Sızıntı sularının temel özellikleri depo yaşına, örtü malzemesinin özelliğine, bölgedeki katı atık çeşitliliğine ve meteorolojik şartlara bağlı olarak değişim göstermektedir. Kompleks içeriği ve niteliğinin sabit olmaması nedeni ile arıtılması en zor olan atık sulardan biridir. Değişkenlik göstermekle birlikte temel bileşiminde bulunan yüksek organik madde miktarı, azotlu maddeler, ağır metaller, organik ve inorganik tuzlar nedeni ile yeraltı ve yüzey suları ile toprak kirlenmesine neden olabilmektedirler (Duran ve Cuci, 2016).

Kirleticilerin çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik testler bir bütün olarak ele alınmaktadır. Limit değerlerle kıyaslama socunda değerlendirilen kimyasal analizler, düşük düzeylerde bulunan ölçülemeyen kirleticileri, bu kirletici unsurlar arasındaki sinerjistik ve antagonistik etkileşimleri ve bu kirleticilerin canlılara doğrudan etkilerini değerlendirmede yetersizdir (UBA, 2013). Biyolojik test yöntemleri, standart koşullar altında, indikatör canlıların yaşamsal işlevlerinde meydana gelen değişimler ile canlıların kirletici etkisinde yanıt oluşturma kapasitesini kullanır. Test canlılarının toksik atık bileşenlerine duyarlılığı, türe göre çeşitlilik gösterebilir. Bu kapsamda etkili bir ekotoksik karakterizasyon için karasal ve sucul ayrıca farklı trofik düzeylerden olmak üzere farklı indikatör canlılar ile test sistemleri tasarlanmalıdır (UBA 2013). Atıkların sucul ve karasal ekosistemlere olası etkilerini değerlendirmede yüksek yapılı bitkiler önemli indikatör canlılardır. Bitkiler sıklıkla, büyümelerini baskılayan, geçici veya uzun süreli stres oluşturabilen kimyasalların etkisinde kalmaktadırlar. Bu kimyasallar fitotoksik olarak tanımlanırlar. Tohumların çimlenme kapasitesini, kök gelişimini ve kuru biyokütle oluşumunu etkilerler. Kirletici etkisinde kalan ve kalmayan bitkilerde bu semptomlar karşılaştırılarak toksik etkiler değerlendirilebilmektedir (Brinza ve ark., 2009). Fitotoksikite testleri ile çimlenme oranları, kök ve gövde uzunlukları kaydedilir ve popülasyonun yarısında baskılayıcı etki oluşturan derişimlerin (EC50) hesaplanması ile fitotoksikite belirlenir. Ekonomik İşbirliği ve Kalınma Örgütü (OECD) tarafından yayınlanan dökümanlar ile çimlenme ve büyümenin incelendiği fitotoksikite testlerinde kullanılan bitkileri listelemiştir (OECD Guideline 208). *Lepidium sativum* (tere) fitotoksik faktörlere karşı yüksek duyarlılığa sahiptir. Bu yüzden ağır metaller, nanopartiküller, petrokimyasal bileşikler veya polisiklik aromatik hidrokarbonlar ile kirlenmiş atıkların ve toprakların fitotoksikitesinin geçici, hızlı ve uygun maliyetli analizlerinde tercih edilmektedirler (Hoekstra ve ark., 2002; Josko ve Oleszczuk 2014). Topraktaki mutajenik ve kanserojen bileşiklerin varlığına karşı yüksek kök duyarlılığına sahip olması toprak toksisitesi için biyolojik bir gösterge olarak laboratuvar çalışmalarında tercih edilmesini sağlamaktadır (Pavel ve ark., 2013)

Bu çalışmada BİKA Katı Atık Depolama Sahası (Bitlis) sızıntı sularının bitkiler üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla *Lepidium sativum* ile fitotoksikite testi uygulanmıştır. Sızıntı suyu toplama havuzundan alınan su örneklerinin etkisinde bırakılan tohumların çimlenme yüzdesi, kök ve gövde uzunlukları ölçülmüş ve inhibisyon değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE METOD

### BİKA Katı Atık Depolama Sahası Sızıntı Suyu

BİKA, Bitlis ili, Güroymak ilçesi, Tahtalı Köyü, Beektepe Mevkiinde kurulmuştur. Tesis alanı 460.000 m<sup>2</sup> olup, evsel atık depolama alanı ise 150.000 m<sup>2</sup> dir. Tesis alanında Tıbbi Atık Sterilizasyon Ünitesi, Sızıntı Suyu Arıtma Tesisi (Membran-Bio Reaktör), Ambalaj Atığı Toplama Ayrırma Tesisi, Depo (Çöp) Gazı Enerji Üretim Tesisi ve Kontrol Binası, Kantar, Lastik Yıkama Ünitesi, Garaj, Atölye, İdari Binalar bulunmaktadır. Hücrede depolanan atıklardan oluşan sızıntı suları sızıntı suyu dengeleme havuzuna oradan biyoreaktöre aktarılmaktadır. Biyoreaktörde NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>(nitrit/nitrat), SO<sub>4</sub> (sülfat), NH<sub>4</sub> (amonyum), BOİ (Biyolojik Oksijen İhtiyacı) ve KOİ (Kimyasal oksijen ihtiyacı) giderimi yapılmaktadır. Ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon ünitelerinde fiziksel olarak arıtılmasından sonra deşarj suyu olan konsantre su ise tekrar dengeleme havuzuna gönderilmektedir. Toplanan sızıntı suyu geri besleme hattı ile atık depolama alanında biyomineralizasyonu desteklemek üzere çöplerin ıslatılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında su kalite parametreleri analiz edilememiştir. Tesisten alınan su kalite parametrelerine ait veriler Tablo 1’de bir araya getirilmiştir. Bu bulgular sızıntı suyunun bugünkü kalitesi hakkında bilgi vermemekle birlikte genel kalite hakkında bir değerlendirme imkanı sunması amacıyla incelenmiştir.

Tablo 1: BİKA Katı Atık sızıntı suyuna ait su kalite parametreleri.

Su Kalite Parametresi	2011 Haz.	2011 Tem.	2011 Ara.	2012 Oc.	2013 Ek.	2013 Kas.
KOİ (mg/L) (n)	2610,9 ± 990,3 (10)	3730,5 ± 1761,4 (20)	1628,3 ± 422,2 (3)	1696,7 ± 507,0 (3)	2629,3±1048,6 (9)	3793,9 ± 1795,4 (22)
pH (n)	7,79 ± 0,40 (10)	7,55 ± 0,34 (20)	–	–	8 ± 0,4 (3)	7,56 ± 0,32 (22)
NH <sub>4</sub> -N (mg/L) (n)	28,9 ± 13,4 (10)	44,0 ± 21,0 (20)	>80 (3)	>80 (3)	28,9 ± 13,4 (10)	46,0 ± 22,0 (21)
NO <sub>3</sub> -N (mg/L) (n)	<1 (9)	1,63 ± 0,48 (16)	<1 (3)	<1 (3)	<1 (8)	1,78 ± 0,64 (18)
NO <sub>2</sub> -N (mg/L) (n)	28,70 ± 12,17 (8)	29,35 ± 14,66 (20)	52,73 ± 6,40 (3)	45,40 ± 13,03 (3)	27,90 ± 13,10 (7)	31,66 ± 16,91 (22)
PO <sub>4</sub> -P (mg/L) (n)	0,9 ± 0,39 (8)	0,73 ± 0,44 (18)	8,4 ± 0,07 (2)	–	0,8 ± 0,30 (7)	0,91 ± 0,60 (20)

\* Sonuçlar Ortalama ± Standart sapma olarak sunulmuştur.

(n) = ölçüm sayısını göstermektedir.

Katı Atık Depolama Tesisi Sızıntı Suyu Örnekleri Mayıs (2018) ayında anlık olarak, havuz kıyısından 1 m açıktan, suyun yaklaşık 20 cm altından görevli personel ile alınmıştır. 1 L’lik numune şişeleri ile alınan su örnekleri soğuk zincir ile Bitlis Eren Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarına getirilmiştir. Çalışma zamanına kadar buzdolabında saklanmıştır.

### Fitotoksitesite Analizi

Test bitkisi olarak seçilen *Lepidium sativum* tohumları piyasadan temin edilmiştir (Mitofarm (parti no: TR.79.1826.3299)). *L. sativum* Crucifare ailesine aittir. Başlangıçta bir kazık kök, 4-6 cm boylandıktan sonra yan kökler oluşmakta ve zamanla saçak köke dönüşmektedir. Gövdesi dallanmış otsu bir yapıya sahiptir. Tohumları açık kırmızı kahverengi, kahverengi kırmızı renktedir. Tohumların çimlenme gücü minimum %80 civarındadır. Ilımlı, nemli iklimlerden hoşlanmaktadır.

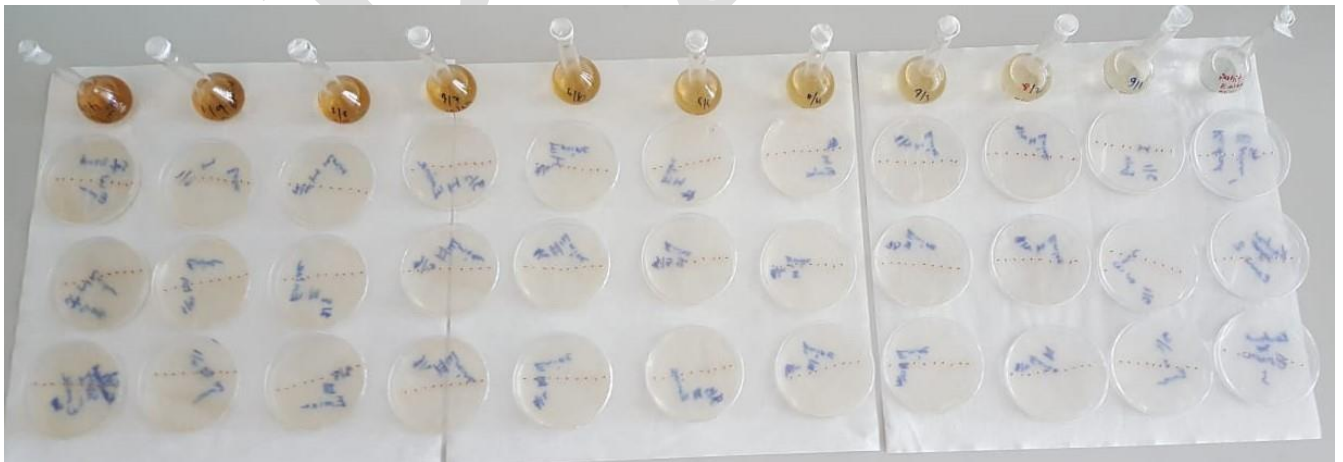
Tablo 2. Stok seyreltme suyunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar (Devare ve Bahadır, 1994).

Kimyasal	1 L çözelti için (g/L)	Kimyasal	1 L çözelti için (g/L)
<b>A) Nutrient Yardımcı Çözeltisi</b> (1000 mL çözümlerden 250 mL kullanılır)		<b>C) İz Element Yardımcı Çözeltisi</b> (1000 mL çözümlerden 0,5 mL kullanılır)	
1. Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,63 g	1. EDTA-Na-II tuzu	40,4 g
2. NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,32 g	2. ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	26,4 g
3. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,8 g	3. ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	1,56 g
4. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,04 g	4. CoSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,76 g
5. Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,004 g	5. MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	6,16 g
		6. 1N KOH	8 mL
<b>B) Demir Tuzlu Yardımcı Çözelti</b> (1000 mL stok çözeltisinden 2 mL kullanılır)		<b>D) Fosfat tamponlu yardımcı çözelti</b> (1000ml çözümlerden 5 ml kullanılır)	
1. EDTA-Na II tuzu	10,46 g	1. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	59,24 g
2. FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	6,46	2. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	41,20 g
3. 1 N KOH	*		

\* Kimyasallar çözününceye kadar eklenmiştir.

Alınan su örnekleri ile çok sayıda seyreltme yapılmıştır (stok seyreltme suyu / sızıntı suyu (v/v) olmak üzere (1/9, 2/8, 3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2, 9/1). Bu seyreltme serileri ile birlikte stok seyreltme suyu pozitif kontrol (PK) ve ham sızıntı suyu ise negatif kontrol (NK) olarak kullanılmıştır. Stok seyreltme suyu Tablo2'ye göre hazırlanmıştır.

Seyreltilmiş sızıntı suyu örneklerinden 5 mL örnek alınarak 9 cm çapında petri kabının içine yerleştirilmiş bir kağıt filtre üzerine pipetle eşit dağılıma dikkate edilerek eklenmiş ve hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde petri kapları hazırlanmıştır. Petri kaplarına 10'ar tane *L. sativum* tohumu ekvatorial olarak eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Üç tekrar olmak üzere toplam 30 adet tohum her bir derişim için kullanılmıştır. Çalışma düzeneği Resim 1'de sunulmuştur.



Resim 1. *L. sativum* fitotoksitesite testi çalışma serisi.

Petri kapları 72 saat karanlıkta 20 °C'de inkübe edildikten sonra çimlenen tohumlar sayılmıştır. Çimlenen *L. sativum*'larda kök ve gövde uzunlukları ölçülmüştür. Her bir seyreltme oranında bulunan kök ve gövde uzunluk değerleri ile pozitif kontrol grubundaki değerler kıyaslanarak % inhibisyon hesaplanmıştır (Pavel ve ar., 2013).

$$\text{Kök \% İnhibisyon} = \frac{\text{kontrol grubu ort kök uzunluğu} - \text{test grubu ort kök uzunluğu}}{\text{kontrol grubu ort kök uzunluğu}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Gövde \% İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol grubu ort. göv. uz.} - \text{test grubu ort. göv. uz.}}{\text{kontrol grubu ort. göv. uz.}} \times 100 \quad (2)$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri ile % dilüsyon oranları kullanılarak çizilen grafikler aracılığı ile kök ve gövde gelişimini %50 oranında etkileyen seyreltme oranları (EC50) hesaplanmıştır. Zehirliliğin bir ifadesi olarak Toksikite Birimi (TB) kullanılmaktadır (Fulladosa ve ark., 2005). Toksik birim (TB) değerlerine göre sınıflandırma şu şekildedir; TB= 0 toksik değil, 0< TB< 1 hafif toksik, 1<TB<10 toksik, 11<TB<100 çok toksik (Persone ve ark., 1993).

$$\text{Toksik Birim} = 100 / \text{EC50} \quad (3)$$

Kök ve gövde uzunlukları ortalama, standart hata, en düşük ve en yüksek değerler şeklinde değerlendirilmiştir. Zehirlilik, kök ve gövde uzunluğunda gelişimin engellenmesi olarak ölçülmüş, EC50 ve TB hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı ANOVA Tukey HSD testi ile değerlendirilmiştir.

## SONUÇ

Bitlis ili BİKA tesisi katı atık sızıntı sularına ait kalite parametreleri “Katı Atık Değerlendirme ve Bertaraf Tesisleri Deşarj Limitleri” ve Kıta İçi Su Kalite Sınıflaması” açısından incelendiğinde alıcı ortama deşarj için uygun olmadığı görülmektedir.

Test canlısının çimlenme oranı, kök ve gövde uzunlukları ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerleri ile % inhibisyon değerleri Tablo 3 ve Tablo 4’de sunulmuştur.

**Tablo 3.** *L. sativum* kök gelişimine ait hesaplamalar

Sızıntı suyu % derişimi	Toplam tohum sayısı / kök gelişimi olan tohum sayısı (% Çimlenme)	Kök Gelişimi (cm)			
		(Ort ±Std Hata)	Minimum	Maksimum	% İnhibisyon
PK	23/30 (%77)	3,57 ± 0,23 a	1,80	5,60	0
10	21/30 (%70)	2,73 ± 0,12 b	2,00	4,10	22,4
20	28/30 (%93)	2,16 ± 0,14 bc	0,60	3,50	36,1
30	26/30 (%87)	2,44 ± 0,11 bc	1,30	3,50	29,8
40	24/30 (%80)	2,65 ± 0,15 b	1,20	3,80	25,8
50	25/30 (%83)	1,95 ± 0,16 ce	0,50	3,20	45,4
60	23/30 (%76)	1,48 ± 0,11 de	0,40	2,70	58,5
70	27/30 (%90)	1,38 ± 0,11 df	0,40	2,50	61,4
80	22/30 (%73)	1,07 ± 0,09 df	0,30	2,00	70,0
90	22/30 (%73)	0,89 ± 0,14 df	0,10	2,40	75,1
NK	23/30 (%76)	0,67 ± 0,08 f	0,10	1,20	81,4

**Not.** a, b, c...f harfleri gruplar arasında p<0,05 düzeyinde farklılıkları göstermek amacıyla kullanılmıştır.

Tablo 3’de çimlenme başarısını ifade eden % çimlenmenin derişimden etkilenmediği ortalama çimlenme başarısının % 80 olduğu görülmektedir. Tüm derişimlerde kök uzamasının pozitif kontrol (PK) grubuna göre p<0,05 önemlilik düzeyinde azaldığı, azalmanın % 22,4 – 81,4 oranında olduğu görülmektedir. Tablo 4’de gövde gelişimi gözlenen birey sayısının kök gelişimi gözlenen birey sayısından daha az olduğu, dolayısı ile kökte meydana gelen hasarın gövde gelişimini etkilediği söylenebilir. Gövde uzamasındaki azalma kökte olduğu gibi düzenli olmayıp % 10 ve %30 derişimlerde negatif inhibisyon gözlenmiştir. İnhibisyon oranları köke kıyasla daha düşüktür.

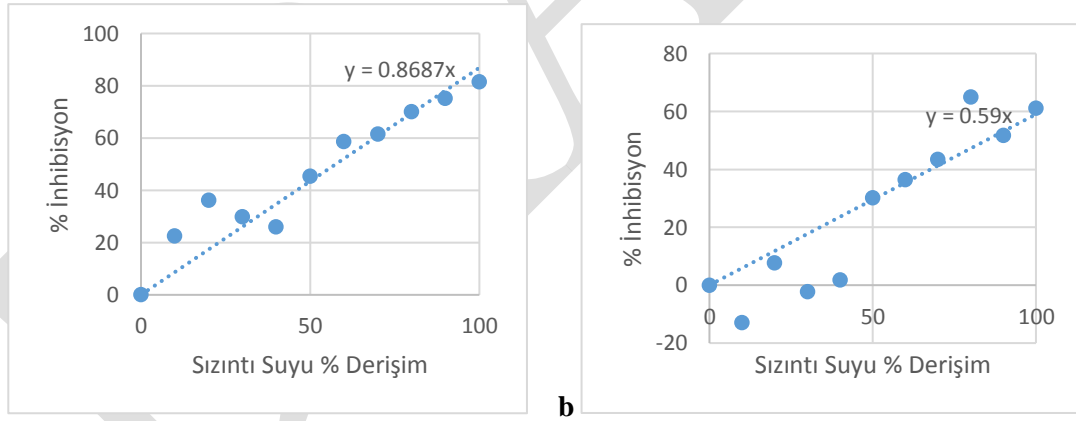
**Tablo 4.** *L. sativum* Gövde Gelişimine Ait Hesaplamalar

Sızıntı suyu % derişimi	Toplam tohum sayısı / gövde gelişimi olan tohum sayısı	Gövde Gelişimi (cm)			
		(Ort ±Sdt Hata)	Minimum	Maksimum	%inhibisyon
PK	30/23	2,45 ± 0,11	1,50	3,60	0
10	30/21	2,77 ± 0,17	1,20	4,20	-13,03
20	30/28	2,26 ± 0,16	0,50	3,50	7,65
30	30/26	2,50 ± 0,11	0,80	3,30	-2,29
40	30/24	2,40 ± 0,16	0,70	3,70	1,78
50	30/25	1,71 ± 0,18	0,40	3,00	30,22
60	30/23	1,56 ± 0,19	0,40	3,30	36,41
70	30/24	1,38 ± 0,15	0,40	3,00	43,49
80	30/19	0,86 ± 0,14	0,20	2,20	64,95
90	30/19	1,19 ± 0,18	0,30	3,00	51,62
NK	30/17	0,95 ± 0,15	0,2	2,00	61,07

**Not.** a, b, c...f harfleri gruplar arasında  $p < 0,05$  düzeyinde farklılıkları göstermek amacıyla kullanılmıştır.

Şekil 1’de sıra ile kök (a) ve gövdedeki (b) % inhibisyon, sızıntı suyu % derişimine karşı grafiklendirilmiştir. Tablo ve grafiklerde gövdede inhibisyonun başlangıç düşük derişimlerde çok az hatta negatif olduğu (%10 ve %30) daha sonraki derişimlerde ise bitkinin direncinin kırılmasına bağlı olarak %30 ve üzeri inhibisyon oranlarının gerçekleştiği görülmektedir. Grafik ile elde edilen denklem kullanılarak %50 inhibisyon etkisine neden olan % derişim (EC50) kök ve gövde için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

*Lepidium sativum* kök gelişimi için BİKA sızıntı suyu EC50 değeri %57,56, gövde içinse %84,75 olarak belirlenmiştir. Persone’nin zehirlilik sınıflamasına göre (sıra ile TB 1,74-1,18) BİKA sızıntı suyu  $1 < TB < 100$  aralığında yer almakta, yani toksik atık su olarak sınıflandırılmaktadır.



Şekil 1. Farklı sızıntı suyu derişimlerinde meydana gelen kök ve gövde gelişiminde % inhibisyon.

## TARTIŞMA

Katı atık depolama sahası sızıntı sularının alıcı ortama deşarj edilebilmesi için güvenli aralıkların tespitinde fizikokimyasal parametreler yaygın olarak kullanılmaktadır (Al Muzaini ve ark., 1995; Tuprakay ve ak., 2014). Ancak bu parametrelerden hiç biri tek başına sucul ve karasal canlılar üzerine toksik etkilerini tayin edemez. Bu açıdan, kirleticilerin canlılar üzerindeki risklerini değerlendirmede biyolojik testler oldukça faydalı bulgular üretmektedir (Liang ve ark., 2017; Abbas ve ark., 2018).

Kirleticilerin tek tek yada karışım halindeki etkilerini değerlendirmede akut toksisite analizine olanak sağlayan, bitkilerde tohum çimlenme başarısı ve kök gelişiminin izlenmesi (ISO 11269-1 (1993), ISO 11269-2 (1995), CEN/TC 223 (2003), OECD 208 (2000) yaygın olarak kullanılmaktadır (Asgharipour ve Sirousmehr, 2012;). Özellikle çeşitli atıksuların, katı atıkların ve deponi saha sızıntı sularının çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadırlar (Wilke ve ark., 2008; Klauk ve ark., 2015). Aydın ve Kara (2006)

Konya ili 1. Organize sanayi giriş ve çıkışlarından aldıkları atıksu örneklerinde balık zehirlilik testi ve *Lepidium sativum* ile fitotoksosite testini uygulamışlardır. Balık zehirlilik ve fitotoksosite testini birlikte kullandıkları çalışmalarında balık testlerinin fitotoksositeye göre tekrarlanabilirliklerinin az, maliyetinin fazla olduğunu ve fitotoksosite testlerinin kullanımlarının sınırlı olmasına karşın zehirli etkinin erken fark edilmesinde daha kullanışlı olabileceğini vurgulamışlardır. Çevresel kirleticiler tohumun çimlenmesini, kök ve gövde gelişimlerini etkileyerek bitkinin gelişimine zarar vermektedir (Bae ve ark., 2014). Bu çalışmada tohumlarda ortalama % 80 kök gelişimi gözlenmiştir. Gövde gelişimi kök gelişimine bağlı olarak devam ettiği için kök gelişimi gözlenen bireylerde oluşan hasara bağlı olarak gövde gelişimi gerçekleşmemiş ya da düşük oranda gerçekleşmiştir. Gövde gelişimi ölçülebilen birey sayısı daha düşüktür. Toksik maddelerin bitkilere, heterotrofik beslenmeden ototrofik beslenmeye geçerken doğrudan değil kök meristeminin toksik maddeler ile teması nedeniyle hassasiyetin artması, geçirgenliğin artması, büyüme hormonlarının artışı ve hücre farklılaşma mekanizmalarını etkileyerek dolaylı etki gösterdiği bildirilmiştir (Kummerova ve Kmentova, 2004).

Bu çalışmada BİKA katı atık depolama alanı sızıntı suyunun farklı % derişimlerinde kök gelişimin oldukça hassas olduğu görülmektedir. En düşük % derişimde (%10) dahi kök büyümesindeki azalma kontrol grubundan oldukça düşüktür (Tablo 3; p<0,05). Derişim arttıkça kök büyümesi üzerindeki baskı artmaktadır. Ham sızıntı suyunda kontrol grubuna göre % 81,4 kök gelişiminde azalma meydana gelmiştir.

Bitki türlerinin kullanıldığı toksisite testlerinde kök gelişimi hassasiyeti yüksek bir parametredir. Çalışmalar sızıntı suyu ve ağırmetaller gibi çevresel kirleticilerin *L. sativum* için toksik olduğunu göstermektedir (Aydın ve Kara 2006; Tongur ve ark., 2017 ). Toksik birim sınıflamasına göre BİKA tesisi sızıntı suları *L. sativum* kök ve gövde gelişimi için toksik sınıfında (1<TB<100 toksik) yer almaktadır (sıra ile; TB= 1,74; 1,18). Zaltauskaite ve Cypaite (2008) ham sızıntı suyu örneklerinde *Lactuca sativa* kök gelişiminin baskılandığını, kontrol grubuna göre % 80 azalma olduğunu bildirmişlerdir. Klauck ve arkadaşları (2015) ham sızıntı suyu (Sinos Nehri Vadi Bölgesi Depolama Sahası/ Brezilya), artılmış sızıntı suyu (biyolojik arıtım) ve kontrol grubu (çeşme suyu) etkisinde *Lactuca sativa*, *Eruca sativa* ve *Allium cepa* bitkilerinde çimlenme başarısı ve kök gelişimini incelemişlerdir. Bitkilerin birbirlerinden farklı düzeylerde yanıt gösterdiklerini, sızıntı suyunun arıtmadan sonra dahi fitotoksik etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Farklı türlerin farklı yanıtlar oluşturmasının, bitkiler arasındaki doku geçirgenliği, alım mekanizmaları ve metabolizmalarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Klasik arıtma mekanizmaları ile giderim işlemlerinin ardından yeni kimyasalların oluşabileceği, tekstil boyası atık su arıtımında fitalik asit esterlerinin oluşması (Liang ve ark., 2017) gibi, yüksek dirençliliğe sahip ve düşük miktarda dahi toksik etkiler gösterebilen (mikrokirleticiler) kimyasalların varlığını sürdürmeleri nedeni ile artılmış sızıntı sularının da ekotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu açıdan fizikokimyasal test sonuçlarının ekotoksosite değerlendirmelerinde yetersiz kalacağı açıktır.

Bu çalışma yüksek yapılı bitki türlerinin depolama alanı sızıntı suyu toksisitesinin değerlendirilmesinde etkili olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Fitotoksosite testlerinin atıksuların analizlerine entegre edilmesi gerekmektedir. Kimyasal analizler ölçülebilir düzeylerdeki kirletici maddelerin varlığını ve miktarını belirleyebilir, ancak biyolojik çalışmalar ile bu kimyasalların toksik ve sinerjistik etkilerini değerlendirebilmek mümkün olacaktır. Arıtılmamış sızıntı suyunun toksisitesini ortaya koymada ve çevresel koşulların depolama sahasında yer alan ayırıştırma ünitesinin dinamiklerine etkilerinin dikkate alındığı arıtma teknolojisinin performans değerlendirmelerinde de ekotoksosite testleri faydalı bilgiler sunacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abbas M., Adil M., Ehtisham-ul-Haque S., Munir B., Yameen M., Ghaffar A., Shar G.A., Tahir M.A., Iqbal M., (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity. *Science of the Total Environment*. 626, 1295-1309.
- Al-Muzaini S., Beg M.U., Muslmani K., (1995). Characterization of landfill leachates at a waste disposal site in Kuwait. *Environmental International*. 21 (4). 399-405.
- Asgharipour M.R., Sirousmehr A.R., (2012). Comparison of three techniques for estimating phytotoxicity in municipal solid waste compost. *Annals of Biological Research*. 3(2), 1094-1101.
- Atık Yönetimi Yönetmeliği (2015). 02.04.2015 tarih ve 29314 sayılı Resmi Gazete.
- Aydın M.E., Kara G., (2006). Organize sanayi atık sularının zehirliliği. Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi. 21 (3-4), 13-20.
- Bae J., Mercier G., Watson A.K., Benoit D.L., (2014). Seed germination test for heavy metal phytotoxicity assessment. *Canadian Journal of Plant Science*. 94, 1519-1521.



- Brinza L., Nygard C.A., Dring M.J., Gavrilesco M., Benning L.G., (2009), Cadmium tolerance and adsorption by the marine brown alga *Fucus vesiculosus* from the Irish Sea and the Bothnian Sea, *Bioresource Technology*, 100, 1727-1733.
- Devare M., Bahadir M., (1994). Biological monitoring of landfill leachates using plants and luminescent bacteria. *Chemosphere*, 28, 261-271.
- Duran E.B., Cuci Y., (2016). Katı atık düzenli depolama sahası sızıntı suyunun fizikokimyasal arıtım yöntemleriyle arıtılabilirliğinin araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 19(2). 104-100.
- Hoekstra N.J., Bosker T., Lantinga E.A., (2002). Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 93. 189-196.
- Josko I., Oleszczuk P., (2014). Phytotoxicity of nanoparticles- problems with bioassay choosing and sample preparation. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 10215-10224.
- Klauck C.R., Rodrigues M.A.S., Silva L.B., (2015). Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. *Brazilian Journal of Biology*. 75 (2), 57-62.
- Kummerova M., Kmentova E., (2004). Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling. *Chemosphere*. 56 (4) 387-393.
- Liang J., Ning X., Kong M., Liu D., Wang G., Cai H., Sun J., Zhang Y., Lu X., Yuan Y., (2017). Elimination and ecotoxicity evaluation of phthalic acid esters from textile-dyeing wastewater. *Environmental Pollution*. 231, 115-122.
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1984). 208: Terrestrial Plants, Growth Test, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Tongur S., Yıldız S., Ünal A., Atalay K., Yeniköşker M., (2017). Toxicity assessment of analgesics by *Lepidium sativum* toxicity test method. Digital proceeding of ICOCCEE-CAPADOCIA 2017. Nevşehir, Turkey. 8-10 May.
- Tuprakay S.R., Suksabye P., Menchai P., Tuprakay S. (2014). The physical and chemical properties of solid waste from water tourism. Case study: Taling Chan Floating Market, Bangkok, Thailand. *WIT Transactions on Ecology and The Environment*, Vol 180, WIT Press.
- UBA (2013). Umwelt Bundes Amt for our Environment (Almanya Federal Çevre Örgütü). Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes.
- Wilke B.M., Riepert F., Koch C., Kühne T., Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70. 283-293.
- Zaltauskaite J., Vaitonyte I., (2016). Toxicological assessment of closed Municipal Solid Waste Landfill impact on the environment. *Environmental Research, Engineering and Management*. 72 (4), 8-16.

## Katı atıkların ekotoksikolojik karakterizasyonu

Hülya Durmaz Bekmezci<sup>1\*</sup>, Ensar Ömer Çetin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bitlis Eren Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Bitlis, Türkiye

\*hulyadurmaz80@gmail.com

### Özet

İnsanların sosyal ve ekonomik faaliyetleri sonucunda işe yaramaz hale gelen, kullanım süresi dolmuş yaşadığımız ortamdan uzaklaştırılması gereken maddelere atık denmektedir. Atıkların kaynağına, bileşimine ve özelliklerine göre sınıflandırılması; toplama, taşıma ve bertaraf sistemlerinin tasarımı, tesisi ve işletilmesi, geri kazanılabilir maddelerin ekonomiye kazandırılması ve bu atıklardan enerji üretimi açısından son derece önemlidir. 29314 sayılı 2015 tarihli “Atık Yönetimi Yönetmeliği” ile 839 atık, 405 adet tehlikeli atık, 173 muallak atık tanımlanmıştır. Atıkların tehlike sınıflandırmaları için 15 kriter belirlenmiştir. Tehlike kriteri 14 (H14) ekotoksik tehlikeyi ifade eder. Atıkların ekotoksikolojik karakterizasyonu için kimyasal ve biyolojik test yöntemleri birlikte kullanılmalıdır. Atıkların çevresel tehlikelerinin değerlendirilmesi ancak biyolojik test yöntemlerinin kullanılması ile mümkündür. Biyolojik yanıtlar EC50, LC50 ve IC50 (sıra ile; etkili derişim, öldürücü derişim ve inhibisyon derişimi) verilerinin hesaplanması ile değerlendirilir. Avrupa’da atık desarjlarının değerlendirilmesinde etkili derişimler esas alınmaktadır. Ülkemizde balık biyodeneylelerine dayananan zehirlilik seyreltme faktörü (ZSF) kullanılmaktadır. Diğer ekotoksikolojik testlere göre pahalı, uygulanması zor ve sonuçların güvenilirliği tartışmalıdır. Bu çalışma ile atıkların Avrupa Standartları kapsamında ekotoksikolojik karakterizasyonuna ait prosedür ve uygulama örneklerini içeren ilgili bilimsel çalışmalar derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Atık Karakterizasyonu, Tehlikeli Atıklar, Ekotoksik Atıklar, Biyodeneyleler

### Ecotoxicological characterization of solid wastes

#### Abstract

Waste is a substance that has become useless as a result of the social and economic activities of the people, has expired and must be removed from the environment. Classification of wastes according to their source, composition and properties is extremely important in terms of design, installation and operation of collection, transportation and disposal systems, saving of recyclable materials to the economy and generating energy from these wastes. In the “Waste Management Regulation” (29314/ 2015), 839 wastes, 405 hazardous wastes, 173 mirror entries wastes have been identified. 15 criteria for hazard classification of wastes have been determined. Hazard criteria 14 (H 14) represent an ecotoxic hazard.

For the ecotoxicological characterization of wastes should be used together chemical and biological testing methods. The assessment of the environmental hazards of wastes is only possible with the use of biological test methods. The biological responses are evaluated by calculating EC50, LC50 and IC50 (respectively effective concentration, lethal concentration and inhibition concentration). The assessment of waste discharge limits is based on effective concentrations in Europe. In our county, toxicity dilution factor (TDF) based on fish acute toxicity test is used for this reason. Compared to other ecotoxicological tests, it is expensive and difficult to perform, and the reliability of the results is controversial. In this study, test systems and strategies for ecotoxicological characterization of solid wastes have been compiled within the scope of international standard protocols

**Keywords:** Waste Characterization, Hazardous Wastes, Ecotoxic Wastes, Bioassay

### GİRİŞ

İnsanların sosyal ve ekonomik faaliyetleri sonucunda işe yaramaz hale gelen, kullanım süresi dolmuş yaşadığımız ortamdan uzaklaştırılması gereken maddelere genel olarak atık denmektedir. Artan sanayileşme ve nüfusa bağlı olarak miktarı gün geçtikçe artmaktadır. Atıkların toplanması, taşınması ve bertaraf sistemlerinin tasarımı, yönetimi ve işletilmesi, geri kazanılabilir maddelerin ekonomiye kazandırılması ve bu atıklardan enerji üretimi proseslerinin etkili olraak planlanabilmesi için atıkların sınıflandırılması gereklidir. Atıklar genel olarak bileşimlerine (biyolojik, kimyasal, kompostlaşabilir, biyolojik bozunmaya dirençli vb.) ve kaynaklarına göre (evsel, kentsel, endüstriyel vb.) sınıflandırılabilirler.

Atıklar “Atık Yönetimi Yönetmeliğine (AYY) (29314-2015)” göre altı rakamdan ve çeşitli işaretlerden (\*, A, M, ve 99) oluşan bir sistem ile en uygun geri kazanım, geri dönüşüm bertaraf işlemlerini bulmak amacıyla kaynaklarına ve üretim proseslerine göre sınıflandırılmaktadır. Bu sistem Avrupa Birliği'nin 2000/532/EC kararı ile oluşturulan Avrupa Atık Listesi (ALL) ve Basel Sözleşmesi kapsamında düzenlenmiştir. Listede (\*) tehlikeli atıkları, (A) kesin tehlikeli atıkları, (M) muhtemel tehlikeli atıkları ve (99) kodun sonunda yer alır ve tehlikeli ya da tehlikesiz olarak sınıflandırılmayan atıkları ifade eder. İlgili yönetmeliğe göre 20 atık bölümünde 839 atık kodu ile 405 “tehlikeli atık” ve yaklaşık 200 "muallak atık" yer almaktadır.

Muallak Atıklar, içerdiği kirleticilerin türüne ve konsantrasyonuna göre bir atığın tehlikeli veya tehlikeli olmadığı şeklinde sınıflandırılabilen kayıt çiftlerinden oluşur. Muallak atıkların çoğunluğu "tehlikeli maddeler" terimine karşılık gelirken bazıları "tehlikeli özellikler" veya belirli tehlikeli atık bileşenlerini tanımlar. Muallak Atıklarda tehlikeli ve tehlikesiz atıklar arasında ayırım yapmak için, Avrupa Atık Listesinde 15 tehlike kriteri belirtilmiştir (AYY, 2015). H14 kodlu tehlike kriteri **ekotoksik**; çevrenin bir veya daha fazla kesimi üzerinde ani veya gecikmeli zararlı etkiler gösteren veya gösterme riski taşıyan madde ve preparatlar grubunu kapsar. Atığın esas özelliği olan ekotoksikolojik potansiyel veya çevresel tehlikeleri tanımlar. Tehlikeli Atıkların Sınır Aşan Hareketlerinin Kontrolü ve Bertaraf Edilmesine İlişkin Basel Sözleşmesinde yer alan H 12’de (**ekotoksik**- Serbest halde bulunmaları durumunda, biyoakümülyasyon yoluyla çevre üzerinde ani veya gecikmeli olarak olumsuz etkiler yaratan veya yaratabilecek olan ve/veya biyotik sistemlerde toksik etkiler yaratan veya yaratması muhtemel olan maddeler veya atıklar) benzer şekilde atıkların ekotoksikolojik potansiyelinin değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Yönetmeliğe göre “Atıklar sadece H14 ekotoksik özellikten dolayı tehlikeli sınıfına dahil edilmez, ancak atıkların yönetimi, tekrara kullanımı ve işlenmesinde ekotoksik özellikler dikkate alınarak işlem yapılır. Atıklar ekotoksik özelliğin düzeyine bağlı olarak gerekli hallerde bakanlık tarafından tehlikeli atık olarak sınıflandırılabilir.

Atıkların oluştukları yerde, toplama, taşıma, depolama ve bertaraf işlemleri sırasında ekosistem üzerindeki olası zararlı etkilerinin belirlenmesi amacıyla ekotoksikolojik karakterizasyonu için fizikokimyasal ve biyolojik test yöntemleri birlikte kullanılmalıdır. Fizikokimyasal analiz yöntemleri ile atıkların bileşenleri, yoğunluğu, nem içeriği, uçucu madde içerikleri, kül miktarları, karbon-azot-hidrojen-kükürt-oksijen miktarları ile kalorifik değerleri gibi özellikleri ortaya konabildiği gibi ağır metaller gibi zararlı organik ve inorganik kimyasalların ölçümleri yapılabilmektedir (Tuprakay ve ark., 2014). Kimyasal analiz sonuçlarının mevcut eşik değerler ile karşılaştırılması atıkların neden olduğu tehlikeleri değerlendirmek için yetersizdir. Atıkların çevresel tehlikelerinin değerlendirilmesi ancak biyolojik test yöntemlerinin kullanılması ile mümkündür. Bu şekilde atıklardaki kimyasal analizlerle belirlenemeyen kirleticilerin etkileri ve potansiyel etkileşimleri ortaya konabilir. (Klauck ve ark., 2015; Liang ve ark.,2017). Çok sayıda atık örneği ile yürütülmüş test analiz sonuçları, biyolojik test yöntemlerinin heterojen atık kompozitler için de tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu nedenle, tek bir kirleticinin değil aynı zamanda kimyasal analiz ile tespit edilemeyen matris etkilerinin de tespit edilebileceği bildirilmiştir (Römbke ve ark., 2009).

Biyolojik test yöntemleri, yaşamsal işlevlerinde meydana gelen değişimler ile standart koşullar altında, özel canlıların kirletici etkisinde yanıt oluşturma kapasitesini kullanır. Test canlılarının toksik atık bileşenlerine duyarlılığı, türe göre çeşitlilik gösterebilir. Bu nedenle, test bataryası denilen farklı test yöntemlerinin kombinasyonu, farklı taksonomik gruplara ait ve farklı trofik seviyeleri temsil eden organizmaları içermelidir. Buradaki amaç, mümkün olduğunca geniş bir duyarlılık aralığını kapsamak ve aynı zamanda hem suda yaşayan hem de karasal organizmaların ekolojik işlevleri üzerinde potansiyel etkileri hakkında bilgi elde edebilmektir. Biyolojik test yöntemleri, test organizmalarına ve dolayısıyla biyolojik olarak benzer organizmalara doğrudan akut ve kronik toksisiteye ilişkin sonuçlar çıkarılmasına olanak tanır. Çevresel kompartmanlarda ve besin zincirinde birikerek hasara neden olan kalıcı kirleticilerin çevresel tehlikeleri fiziksel-kimyasal yöntemlerle veya uygun biyoakümülyasyon testleriyle tespit edilebilir (UBA, 2013).

Biyolojik test yöntemleri, farklı etki kriterleri içermeli ve hem genotoksisiteyi hem de akut ve kronik toksisiteyi kapsamalıdır. Pratik uygulamalarda kullanılmak üzere bu test yöntemleri, test konusu (kimyasal, kompozit, genetiği değiştirilmiş organizma) ne olursa olsun, çeşitli ek gereksinimleri karşılamalı, standardize edilmeli, yeterince hassas, kullanımı kolay ve ekonomik olarak uygulanabilir olmalıdır (Römbke ve ark., 2009).

Ekotoksisite testleri ile atıkların H14 "ekotoksik" tehlike kriterinin güvenilir, geçerli ve tekrarlanabilir bir şekilde belirlenmesini sağlar ve böylece muallak atıklar içerisindeki atıkların bu tehlike kriteri açısından tehlikeli olarak tanımlanması sağlanır. Ayrıca atığın temel özelliklerinin belirlenmesi, çevresel açıdan güvenli

ve kamu yararına uygun bertarafı veya doğru ve güvenli geri kazanımı için gereksinimlerin ortaya konmasında yeterli değildir, biyolojik testler ile çevresel risklerinin değerlendirilmesi gereklidir. Örneğin, atık arıtma tesislerine izin verilmesi durumunda kullanılmak üzere muhtemel maruziyet senaryolarının risk değerlendirmesine dahil edilmesi gereklidir (UBA, 2013; Römbke ve ark., 2009b).

Atıkların ekotoksik sınıflandırılmasında önerilen deneysel tasarım seçilen test parametresinin (belli bir test canlı türü) % 50 sini etkileyen seyreltme oranını (EC50; effective concentration) bulmayı amaçlamaktadır. Ayrıca EC50-çalışmalarının kullanılması farklı Avrupa ülkelerinde farklı yasal birimler (özellikle pestisitler gibi kimyasalların çevresel risk değerlendirmelerinde) ve atık test uygulamaları arasında uyum sağlamayı kolaylaştırmaktadır (Lapa ve ark., 2002; Ferrari ve ark., 2006). Örneğin Fransa atık değerlendirmede EC50-deneylemlerini tercih etmektedir (Ferrari ve ark., 2006). Ülkemizde, zehirlilik seyreltme faktörü (ZSF) atık deşarjlarının değerlendirilmesinde tercih edilmektedir. Atık suların ekotoksikolojik değerlendirilmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada *Lepistes reticulates* ile yapılan balık biyodeneylemlerinin etki değerlendirmede yeterli duyarlılığa sahip olmadığını, maliyet ve uygulama güçlüğüne sahip olduğunu ifade etmekte ve farklı trofik düzeylerdeki canlılar ile etkili derişimlerin (EC50) değerlendirilmesi gerekliliğini bildirmektedirler (Aydın ve Kara, 2006).

Atıklarının ekotoksikolojik testleri üzerine yayınlanan çalışmaların değerlendirilmesi, yayınlarda sürekli bir artış olduğunu göstermektedir. Bu yayınlarda çok çeşitli atıklar ve test yöntemleri (özellikle elüatların oluşturulması için) yer almaktadır (Wilke ve ark., 2008; Mtisi ve Gwenzi, 2019). Atıkların ekotoksitesitesi ile ilgili yayınlanmış verilerin heterojenliği elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve basitleştirilmesini zorlaştırmaktadır (Ferrari ve ark., 2006). Bununla birlikte, uluslararası geçerliliği kabul gören standart yöntemler ile (ISO, OECD, DIN, BSI) katı ve sıvı atıkların ekotoksikolojik karakterizasyon çalışmaları yürütülerek uygunluk sağlanabilir. Bu çalışma ile atıkların ekotoksikolojik karakterizasyonunun amaçları, genel işleyiş sistemi ve uluslararası standartlarda yer alan uygun yöntemlerin derlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Atıkların ekotoksikolojik karakterizasyonu için geçerli yöntemler

Ekotoksitesite testleri temel olarak atık sularda ve katı atık süzüntülerinde yüzde derişimler ile EC50 değerinin hesaplanması temeline dayanır. EC50-değeri, en az beş farklı seyreltmeden oluşan bir "Doz-Yanıt İlişkisi" ile belirlenir. Sucul sistemlerde test edilen atık sızıntı suları teste-özel seyreltme suyu ile karıştırılırken, karasal sistemlerden kaynaklanan katı atık örnekleri karşılığı olan kontrol ortamıyla (örneğin suni toprak, standart toprak veya kuvarz kumu gibi) karıştırılır. Test edilen kimyasalın çeşidine göre test edilen dilüsyon serileri çoğunlukla geometrik kümelerden oluşmaktadır (ISO 14735; ISO 17616; ISO 11269-2).

**Tablo 1:** Seyreltme serileri için analizlerde örnek derişimlerinin için örnek hesaplama

A Serisi			B Serisi		
LID Değeri	Seyreltme	Test örnek derişmi [%]	LID Değeri	Seyreltme	Test örnek derişmi [%]
2	1:2	50	1,5	1:1,5	66,667
4	1:4	25	3	1:3	33,334
8	1:8	12,5	6	1:6	16,667
16	1:16	6,25	12	1:12	8,334
32	1:32	3,125	24	1:24	4,167
64	1:64	1,562	48	1:48	2,084
vb.	vb.	vb.	vb.	vb.	vb.

Heterojen kompozit atıklardan temsili numunelerin toplanması zordur. Aynı zorluk tekrarlanabilir verilerin elde edildiği ağır metal ölçümleri gibi kimyasal analizler için de söylenebilir. Almanya Federal Atık Çalışma Grubu (LAGA), atıkların karakterize edilmesi için örnekleme yöntemi tanımlamıştır. Buna göre; katı atık numuneleri serbest deponi yığınlar, konteynerler ve nakliye araçlarından, ayrıca atık akışlarından (örneğin, taşıyıcı bant, oluk) alınabilir. Malzeme akışından örnekleme yapılırken hareketli atık akışları, serbest düşen atık akışları, statik atık akışları gibi ayırt edici öğeler kullanılabilir (LAGA PN 98). Atık için karakterize edici numune alma yönteminin amacı, test sonuçları aracılığı ile malzeme kalitesi hakkında doğrulanmış verileri toplamaktır.

## 2.1. Örneklemeye ve örneklerin korunması

Atıkların ekotoksikolojik değerlendirilmesi için ilgili literatürler ile (LAGA PN 98, DIN 15442, DIN 19698, LAGA 2012) önerilen örneklemeye yöntemi şöyledir;

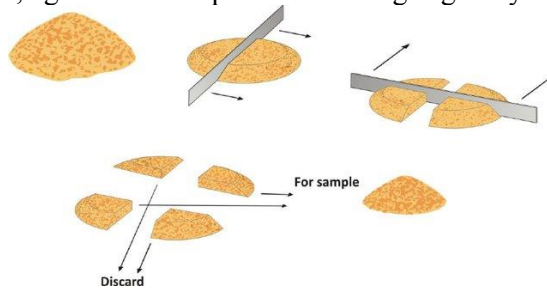
1. Laboratuvar örneğinde, elek analizinde %20 nin üzerindeki kütle 20.000'den fazla parçacık tarafından temsil edilmelidir.
2. Herhangi bir örneklemeye, taşıyıcı banttardan kayan partikül kütlelerinin tüm enine kesitinde belirli bir zamanda rasgele noktalardan yapılmalıdır. Bunun mümkün olmadığı durumlarda örnekler atık yığınınından alınabilir.
3. Bir atık yığınınından örnek alırken yığın kurulumu sırasında faz ayırımının oluşmadığından emin olunmalıdır.
4. Temel nüfusun büyüklüğünden bağımsız olarak 16 ayrı numune alınmalıdır.
5. Münferit örnekler rastgele örnekler olmalıdır. Başka bir deyişle: temel nüfusun her bir parçası, münferit bir örnek parçası ile aynı olasılığa sahip olmalıdır.
6. Atık yığından örneklemeye, tekerlekli bir yükleyici kullanılarak yapılmalıdır. Bu şekilde alınan 16 örnek yaklaşık 1 - 1.5 dm yüksekliğinde yaklaşık iki boyutlu bir düz tabaka ile birleştirilmelidir. Münferit örnekler, bu iki boyutlu katmanın münferit koordinatlarından rasgele alınabilir.
7. Tüm münferit örnekler, bir örnek karışımı ile (laboratuvar örneği) birleştirilmelidir.
8. Parçacık boyutunda ek bir azaltma yapılmamalıdır

Ayrıca, atığın örneklemeye sonrası kimyasal, fiziksel ve biyolojik değişikliklere uğradığı unutulmamalıdır. Bu nedenle, potansiyel değişikliklerin hesaba katılması gerekmekte ve örneklemeye koşulları, bu tür değişikliklerin biyolojik tahlillerin sonuçları üzerindeki etkisi en aza indirilecek şekilde yapılmalıdır. Kimyasal ve biyolojik işlemleri geciktirmek amacıyla koruyucuların (örneğin asitler) eklenmesi ilgili standartlara göre uygun değildir (UBA, 2013).

Atık örneklerinin taşınması mümkün olduğunca kısa sürede olmalıdır. Örneklerin özelliklerinin değişimi engellenmelidir. Taşıma süresi depolama süresinin bir parçası olarak düşünülmelidir ve taşıma süresinin 48 saatin altında ve / veya  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklıkta olması gereklidir. Örnekler iki aydan uzun süre depolanmamalıdır. Daha uzun depolamaya ihtiyaç duyulursa depolama sırasında atık örneklerinde olası değişiklikler, atığa özgü parametrelerin fiziksel, kimyasal veya biyolojik analizleri ile birlikte belirlenmelidir.

## 2.2. Katı örneklerin ön hazırlığı

Atık partiküllerin büyüklüğündeki herhangi bir azalma yeni yüzeylerin üretilmesine ve dolayısıyla test maddesinin ekotoksikolojik özelliklerinin modifikasyonuna neden olur. Bu nedenle mümkünse kaçınılmalıdır. Eleme işlemi sonunda 4 mm'den küçük maddelerin ekotoksikolojik testler için uygunsuz olduğu ancak ilk değerlendirmeler için rahatlıkla kullanılabilirleri belirtilmiştir. Orijinal atık maddenin ağırlıklı olarak > 4 mm parçacıklardan oluşması durumunda, elek analizi uygun miktarda malzeme kullanılarak hazırlanmalıdır. Bu tür materyal kaba taneleri içerdiğinden el ile eleme, uygun bir elek analizi yapmak için yeterlidir. Büyük kaba tane içeriğine sahip malzemeler test edilecekse, > 4 mm'lik iri taneciklerin boyutu küçültülmelidir, böylece materyal herhangi bir durumda ince öğütülmemiş olur. Bu amaçla kriyojenik uygulama gerekli olabilir. Malzemenin eleme için kurutulması gerekiyorsa, kurutma sıcaklığı çeşitli atık özelliklerini değiştirebileceğinden  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmemelidir. Parçanın genel karakterine uymayan, parçalanmayan ve iri parçacıkların yanı sıra uzun boylu tek parçalar ön muamele sırasında çıkartılmalı ve görsel imgeleri fotografik olarak kaydedilmelidir. Numaraları, ağırlıkları ve toplam numune ağırlığının yüzdesi de kaydedilmelidir.



Şekil 1. Dörde bölme ve karıştırma yöntemi (Alakangas, 2015)

Genel olarak, numunenin hazırlanması ve ön-muamelesinin, teste veya analize bağlı olarak numuneyi daraltacağına ve dolayısıyla sonuçlara olan güveni azaltacağına dikkat edilmelidir. İncelenen materyal ile ilişkili olarak örneklemin temsil yeteneği önceden bilinemeyeceğinden, testlerin güvenliği ile ilgili bilgiler yalnızca paralel incelemeler ile elde edilebilir. Numune hazırlama ve ön işlem sırasında örneklerin yeniden düzenlenmesi için dalgalı ayırıcılar önerilir. Alternatif olarak, dörde bölme ve karıştırma "Coning ve quartering" yöntemi (Şekil 1) kullanılabilir (LAGA PN 98). Dörde bölme ve karıştırma yöntemi ile örnek hacmi uygun bir ayıraç ile dörde bölünür iki parça birleştirilir. İstenen uygun örnek hacmine ulaşana kadar dörde bölme işlemi sürdürülür (Alakangas, 2015).

### 2.3. Atık eluatlarının hazırlanması

Suda çözülebilir bileşenlerin atıktan sızması atıkların çevresel hasarlarının temel mekanizmalarından biridir. Bu yüzden su ile süzülebilen atık bileşenlerinin ekotoksik özelliklerinin belirlenmesi için uygun sulu ortamların hazırlanarak süzüntüler elde edilmelidir. Atıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri süzüntü elde etme prosedürünün başarısını etkilemektedir. Eluat hazırlamak için standart yöntemler kullanılmalıdır. DIN 12457-2 atıktan süzüntü suyu elde etme yöntemini tanımlamaktadır. Katılarda her bir kilograma karşılık 10 L süzüntü elde edilmektedir. Partikül büyüklüğü <4 mm olan atıklara uygulanır. Bu yöntem aynı zamanda CEN 14753 "Atık Karakterizasyonu-Ekotoksikite Testleri için Atık Örneklerinin Hazırlanması" standardının bir parçasıdır. Süzüntü elde etme işleminden sonra ayrıca bir filtrasyon işlemi ile oluşan katı ve sıvı fazlar birbirinden ayrılır. Biyotestler için eluatın pH'sı ayarlanmalıdır. Bu sırada ağır metal tuzları çökelti oluşturabilir. pH arandıktan sonra tekrar filtre edilir. Sulu eluatın yoğunlaştırılması için bir katı faz ekstraksiyonu ayrıca kullanılabilir (Ehrlichmann ve ark. 2000). Atık eluatları, üretilir üretilmez testte kullanılmalıdır (önerilen maksimum depolama süresi: 48 saattir 72 saate kadar saklanabilir). Atık eluatları koruyucu eklenmesi ile stabil hale getirilemez. Dondurma işlemi eluatların geri dönüşümü olmayacak şekilde değişmesine neden olabilir, bu nedenle, sadece istisnai durumlarda izin verilebilir. Dondurma işlemi kaçınılmaz ise özellikle belirtilmelidir. Atık eluatları, pH ayarlaması olmadan biyotestlerde kullanılmamalıdır. Test karışımının pH'sı seyreltmeler nedeni ile önemli ölçüde değişebilmektedir. Bunun için atığın seyreltilmesi ve tampon kapasitesi arasında bir karar faktörü seçilmelidir. Test canlısının yaşamını önemli ölçüde etkileyecekse pH ayarlaması yapılarak test tekrarlanabilir. Asit ya da alkali eluatlar toksik etkiye neden olabilirler ve bu durum atığın sınıflandırılmasını etkileyecektir.

### 3. Ekotoksikolojik testlerin tasarımı ve yürütülmesi

Bilinen bileşimine göre, tehlikeli madde kanununa (H1 ila H13) uygun olarak sınıflandırılması ve etiketlenmesi gereken her atık, tehlikeli atık olarak kabul edilir. Ancak, atığın bileşimi bilinmiyorsa veya karmaşıksa genel olarak üç temel amaçla ekotoksikite test sistemleri tasarlanır ve yürütülür.

- H14 kriterine göre Atık Listesi Yönetmeliğindeki muallak atıklar arasındaki tehlikeli atıkları belirlemek
- Atıkların detaylı ekotoksikolojik karakterizasyonunu gerçekleştirmek
- Atık geri kazanım ölçümlerinin risklerini değerlendirmek.

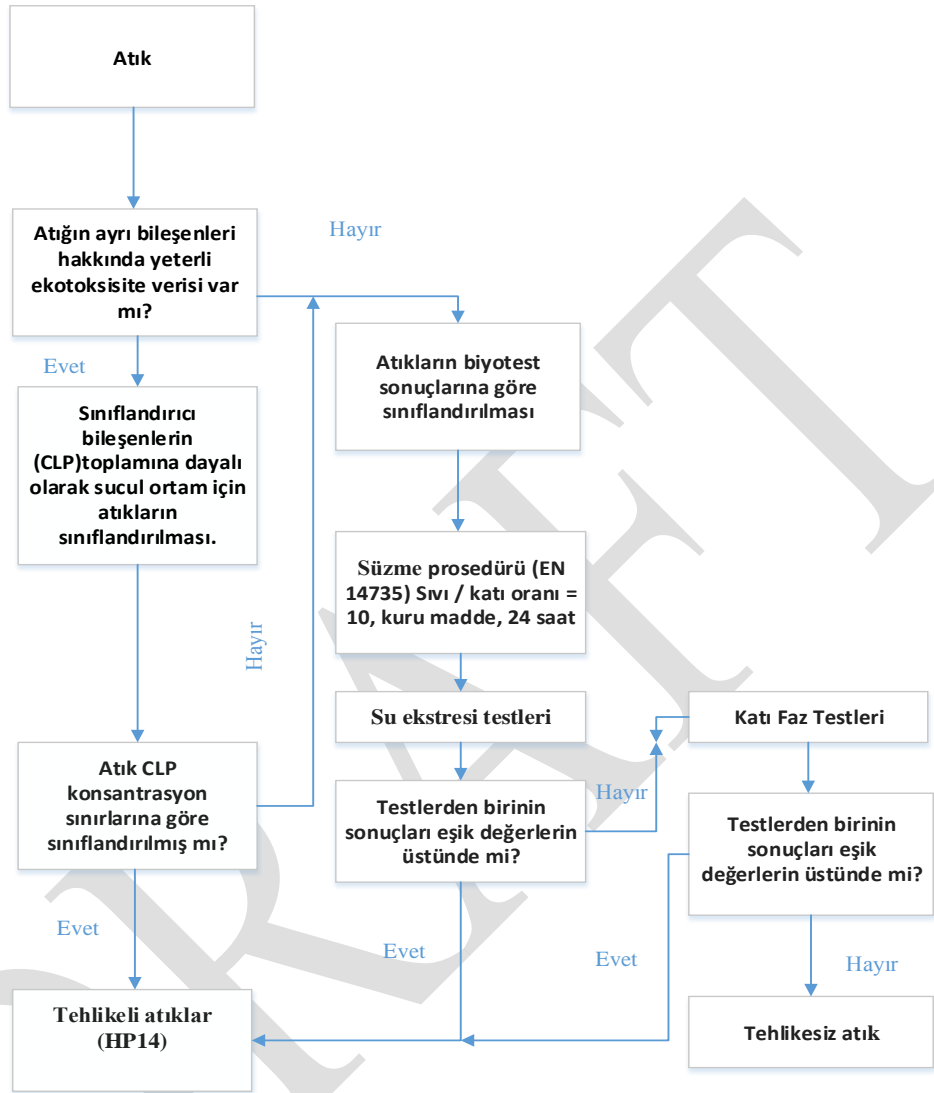
#### 3.1. Muallak atıklar içerisinde ekotoksik atıkların tespiti

Süzüntü veya katı atıkların kimyasal ve fiziksel analizlerle belirlenen derişimleri tehlikeli madde mevzuatı kapsamında sınıflandırmaya izin vermiyorsa, atıkların bileşimi hakkında yeterli bilgi yoksa veya atık bileşenleri tehlikeli maddeler altında sınıflandırılmamışsa H14 tehlike kriteri açısından testlerin yapılması gereklidir. Bu testler birkaç adımda gerçekleştirilmelidir. Atık değerlendirme, erişilebilir bilgilerin kullanılmasıyla başlar, bu da sucul sistemlerde akut ve kronik parametreler için CLP (classification, labeling and packaging) yönetmeliğine uygun bir yönteminin kullanıldığı anlamına gelir. Test sistemi Şekil 2'de gösterilen akış diyagramı kapsamında tasarlanır.

"Ekotoksik olmayan" olarak yapılan bir değerlendirme otomatik olarak tehlikeli olmayan atık olarak sınıflandırmaya neden olmaz, çünkü Atık Listesi Yönetmeliğinde belirtilen tüm diğer tehlike kriterleri, ekotoksikolojik değerlendirmeden bağımsız olarak değerlendirilmelidir.

Ekotoksikolojik testlerde (CEN 14735) süzüntülerin incelenmesi ile başlanır ve bir kontrol grubu ile karşılaştırma yapılır. Elde edilen sonuçlar atık sınıflandırmasını değiştiremez ancak sebep tanımlaması için kullanılır. Test sonuçları ECx (=etkili konsantrasyon) olarak belirlenmektedir. Atık tehlikeli olarak sınıflandırılır ve EC değeri limit derişimin altındaysa, testler durdurulur. EC, limit derişimin üstünde ise

karasal (katı faz) testler yapılır. Tüm test sonuçları limit derişimin altındaysa, atık tehlikeli olmayan olarak sınıflandırılabilir (Römbke ve ark. 2009). Bu nedenle, önerilen test yöntemi sucul ve karasal testleri kapsamalıdır. Ancak uygulanabilirlik açısından ucuz ve daha az zaman aldığı için süzüntü testleri daha fazla tercih edilmektedir. Fazla miktarda eluat gerektirdiği için balık deneyleri bu çalışma kapsamına dahil edilmemiştir.



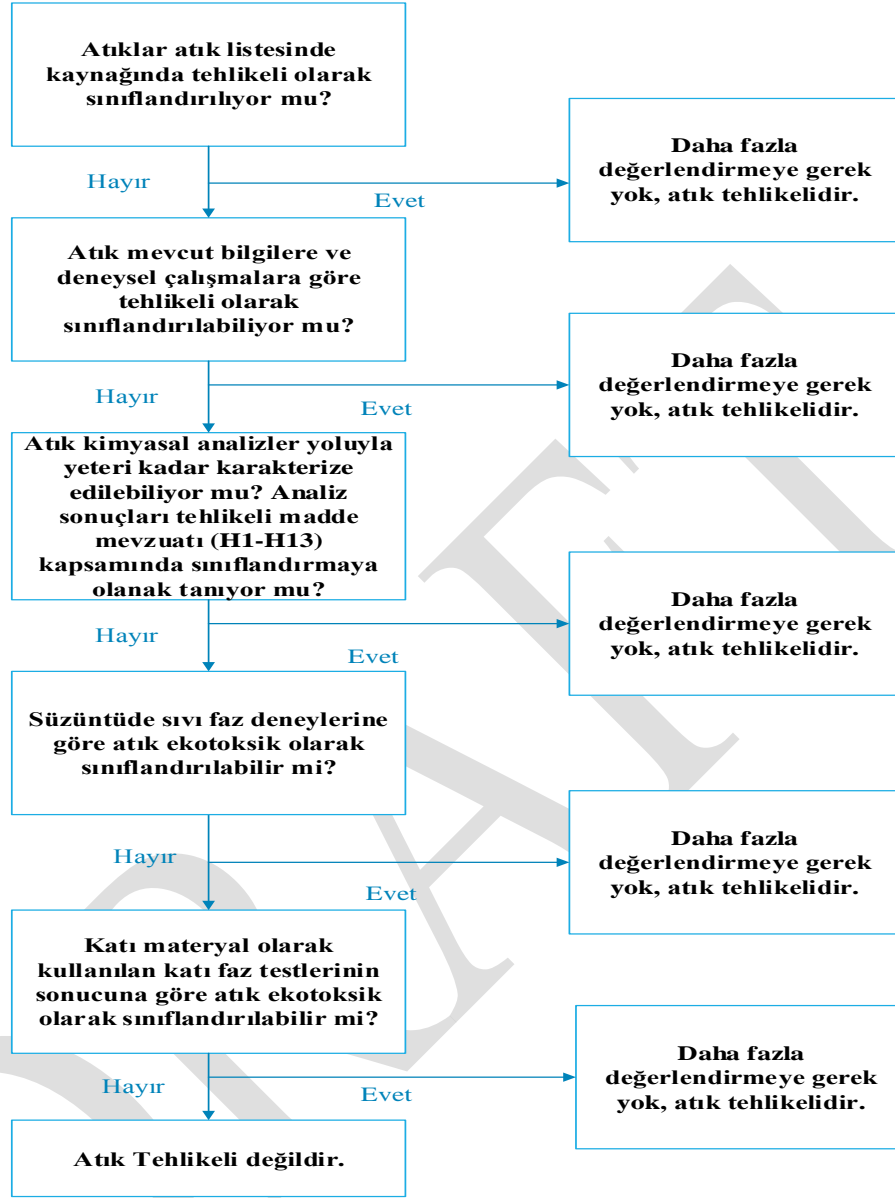
Şekil 2. Atık sınıflandırması için H 14 kriterinin tespiti için iş akış şeması (Pandard ve Römbke 2013)

Henüz standardize edilmemiş özel koşullarda ve lokal canlılar ile yapılabilen yöntemler de bu testlerin yerine veya desteklemek üzere kullanılabilir (Tongur ve ark., 2019; Mtisi ve Gwenz, 2019). Ekotoksikolojik testlerin yapılması için, atık veya atık eluatının fizikokimyasal özelliklerinin, ilgili biyodeneyle ilgili kullanıma izin verecek şekilde olduğu varsayılmaktadır. Güçlü renkli elüatlar veya yüksek besin içeriğine sahip atıklar gibi belirli özellikler, test içeriğinin genişletilmesini gerektirecektir.

Değerlendirme EC50 değerlerinin hesaplanması ile gerçekleştirilir. Atık örneklerinde EC50 değerini belirlemek amacıyla bir dizi seyreltme ile test yürütülür. Yapılan testlerden en az birinde ekotoksik potansiyel gösterildiğinde, test edilen atık tehlikeli olarak sınıflandırılır. Bir test sistemi hakkında spesifik bilgi bulunmadığı sürece  $\leq 10\%$  test-substrat limit konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir (Pandard & Römbke 2013).  $EC50 \leq 10\%$  dilüsyon ise test canlısı üzerinde belirgin bir etki var demektir (UBA, 2013).

Atıkların genotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi, kısmen H11 "mutajenik" kriteri kapsamında ele alınmaktadır. Bununla birlikte, tüm atık numunesini değerlendirmek için kullanılmaz, ancak sadece numunedeki ayrı maddelerin potansiyelini ayırt etmek için kullanılabilir. Örnekte bilinmeyen maddeler ve bu

maddeler arasındaki etkileşimler olabileceğinden, genetik toksik potansiyeli belirlemek için atık süzütüsünde umu testi (ISO 13829) veya Ames testi (ISO 11350) yapılmaktadır. Bu değerlendirme diğer testlerden bağımsız olarak yapılmaktadır (Römbke ve ark. 2009).



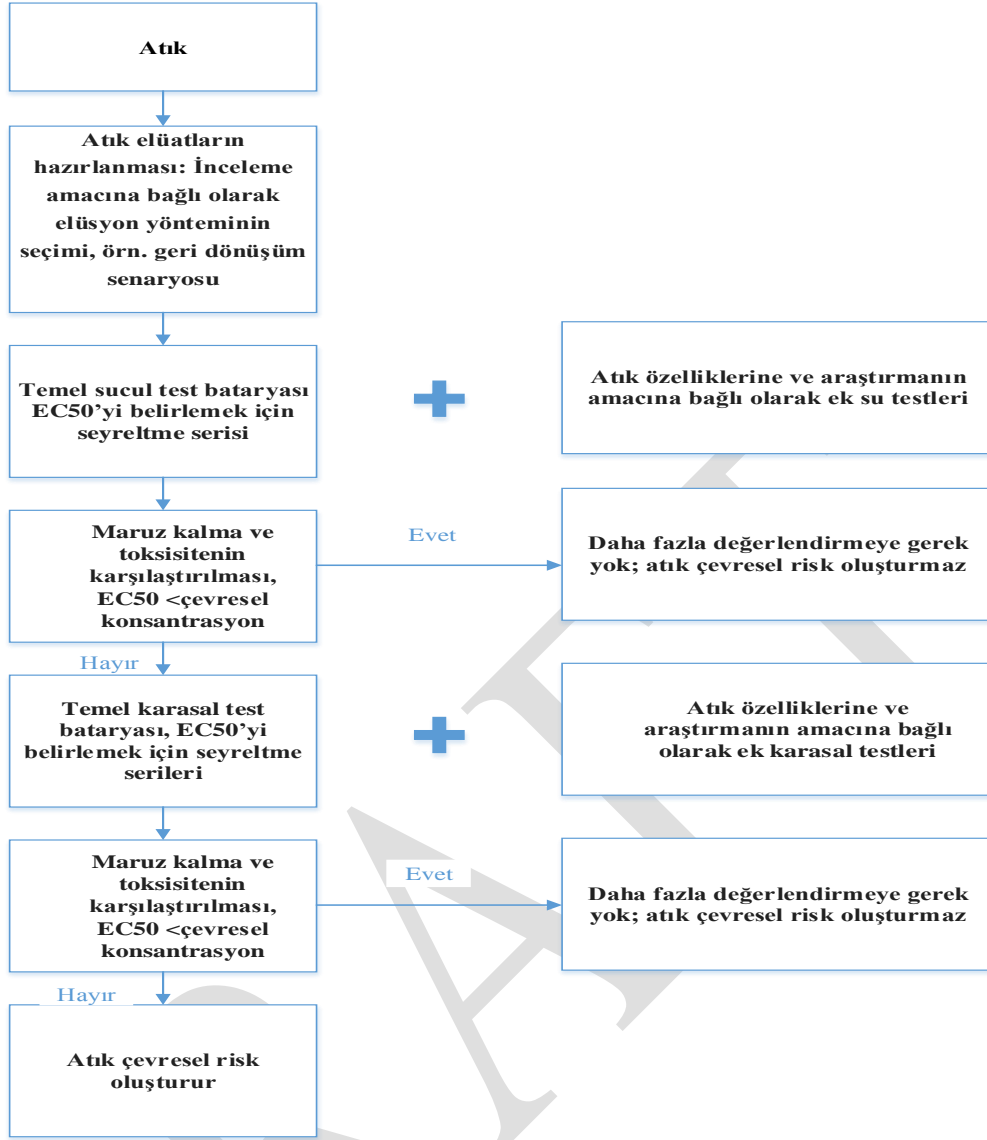
Şekil 3. Tehlikeli atıkların tanımlanması için test stratejisi (UBA, 2013).

### 3.2. Atıkların detaylı ekotoksikolojik karakterizasyonu

Kaynakları veya bileşimleri nedeniyle açıkça tehlikesiz olarak sınıflandırılmayan ve muallak atık sınıfında yer almayan atıkları değerlendirmek ve genel bir ekotoksikite değerlendirmesi sunmak üzere indikatör canlılar ile ekotoksikolojik testler yürütülmektedir (UBA, 2013). Yüksek besin içeriğine sahip atıklar veya çok bulanık süzüntü suları için kullanılabilirler. Atıkların ekotoksikitesi, EC<sub>x</sub> yaklaşımı (doz-yanıt ilişkileri) kullanılarak değerlendirilmelidir. Şekil 3 atıkların genel karakterizasyonu için işlem basamaklarını ortaya koymaktadır. Etki gözlemlenildikten sonra sonlandırmayı temel alan zaman ve maliyet ayarlamalı bir yolla açıklama sunmaktadır.

Önerilen test bataryaları, katı atık testleri için karasal test canlılarını ve elüatlar için akuatik test canlılarını kapsayan yöntemlerdir. Genotoksikiteyi belirlemeye yönelik yöntemler de sucul testlere dahil edilmiştir (UBA, 2013). Temel karakterizasyon için atık örnekleri EC<sub>50</sub> değeri belirlemek üzere bir seri dilüsyon serisi ile test edilir. Yapılan testlerden en az birinde ekotoksik potansiyel gösterildiğinde, test edilen atık tehlikeli olarak sınıflandırılır (Pandard & Römbke 2013). Genotoksik potansiyel içinde aynı durum geçerlidir. Bu test sistemi için yeterli bir bilgi elde edilene kadar limit derişim  $\leq$  %10 test maddesi olacak şekilde kullanılabilir.





Şekil 4. Atıkların çevresel risk değerlendirmelerinde ekotoksikolojik karakterizasyon test sistemi

### 3.3. Atık geri kazanımında risk değerlendirmesinde ekotoksikolojik testler

Biyolojik testler atıkların çevresel zararlarının değerlendirilmesinde kullanılabilir. Testler oldukça standardize ve kapalı alan çalışmaları olmalarına karşın geri dönüşüm proseslerinin çevresel etkilerinin değerlendirilmesinde oluşabilecek risklere karşı uygun hale getirilmelidir. Test yöntemi, temel etkiye kalma yollarını ve uygun süzülme yöntemleri ile biyodeneyleri kullanarak ilgili çevresel etkileri belirlemeyi amaçlamalıdır. Böyle bir test yönteminin tanımlanması, atıkların sınıflandırılması için gerekenden daha fazla bilgi ve tecrübe gerektirir. Test sistemlerinin karmaşıklığı atık tipine ve geri dönüşüm yöntemine bağlıdır (Şekil 4). Atıkların temel ekotoksikolojik karakterizasyonu risk değerlendirmesinden önce yapıldıysa, elde edilen bulgular bu test yöntemine entegre edilebilir. Uygun bir süzme yöntemi seçmek ve biyodeneme serilerini test amacına göre uyarlamak özellikle önemlidir. Atık testine uygun test yöntemleri ISO 14735 Ek B'de derlenmiştir. Gerekli test bataryasının kapsamı ve bileşimi, atıkların gösterge bileşenlerine ve özelliklerine yöneliktir.

Risk değerlendirmelerinde, atıkların, tüm atıklar net bir doz yanıt ilişkisi göstermediği için çok sayıda farklı dilüsyon ile test edilmeleri gereklidir. Bu test sistemleri atıkların değerlendirilmelerinde yalnızca bir parçadır. Çoğu zaman non-ekotoksikolojik atıklar bile güvenli geri kazanım için gereklilikleri karşılamayabilir. Geri dönüşümün çevresel risklerinin değerlendirilmesi için bir test sistemi tasarlanırken, atık sahipleri veya yetkili makamlar tarafından farklı bir yaklaşım izlenebilir. Bu nedenle, bu tür kapsamlı testlerden elde edilen veriler

ilgili birimler ile paylaşılmalıdır. Tablo 2’de, katı atıkların çevresel etkilerini test etmek üzere başarı ile kullanılmakta olan biyolojik test yöntemleri listelenmiştir.

**Tablo 2:** Katı atıkların ekotoksik karakterizasyonu için biyolojik test yöntemleri

<b>Atıklardan elde edilen süzüntüler için test yöntemleri</b>	
<b>Açıklama</b>	<b>Referans</b>
<i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) mobilitesinin inhibisyonunun belirlenmesi - <b>Akut Toksikite Testi</b>	ISO 6341
<i>Desmodesmus subspicatus</i> ve <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ile <b>Tatlı su Algal Büyümesi İnhibisyon Testi</b>	ISO 8692
Su bileşenlerinin ve atık suyun su mercimeği ( <i>Lemna minor</i> ) üzerine toksisitesinin belirlenmesi - <b>Büyüme İnhibisyonu Testi</b>	ISO 20079
Su ve atık suyun genotoksitesinin <b>umu testini</b> kullanarak belirlenmesi	ISO 13829
<i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) üzerine maddelerin uzun süreli toksisitesinin belirlenmesi	ISO 10706
<i>Pseudomonas putida</i> <b>Büyüme İnhibisyonu Testi</b>	ISO 10712
48 saat içinde <i>Brachionus calyciflorus</i> 'a kronik toksisitenin belirlenmesi	ISO 20666
<i>Ceriodaphnia dubia</i> 'ya kronik toksisitenin belirlenmesi	ISO 20665
<b>Katı atıkların test yöntemleri</b>	
<b>Açıklama</b>	<b>Referans</b>
Toprak kalitesini ve kimyasalların davranış üzerine etkilerini test etmek için <b>Kaçınma Testi</b> ( <i>Eisenia fetida</i> ve <i>Eisenia andrei</i> )	ISO17512-1
Kirleticilerin toprak florası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi - Bölüm 2: Kimyasalların <b>yüksek bitkilerin</b> gelişimine etkileri	ISO11269-2
Kirlenmiş topraklar için <i>Arthrobacter globiformis</i> ile toksisite testi	ISO 18187
Kirleticilerin solucanlar üzerine etkileri ( <i>Eisenia fetida</i> ) - Bölüm 2: Üreme üzerine etkilerin belirlenmesi	ISO11268-2
Kirleticilerin solucanlar üzerine etkileri ( <i>Eisenia fetida</i> ) - Bölüm 1: Yapay toprak substratı kullanılarak akut toksisitenin belirlenmesi	ISO11268-1
<i>Collembola (Folsomia candida)</i> 'nın toprak kirleticiler tarafından çoğaltılmasının engellenmesi	ISO 11267
Kirleticilerin <i>Enchytraeidae (Enchytraeus sp.)</i> Üzerine Etkileri - Üreme ve hayatta kalma üzerine etkilerin belirlenmesi	ISO 16387

Atıkların risk değerlendirmesi için yapılan testler, hem eluat hem de katı malzemenin test edilmesi için üç trofik seviyeden (ayrıştırıcılar, tüketiciler ve üreticiler) test canlılarını kapsamalıdır. Testler geri kazanım yöntemine bağlı etkide kalma yollarını içermelidir. Kronik etkileri belirlemek için uzun maruz kalma süreleri olan test yöntemlerinin kullanılması özellikle önemlidir.

Biyolojik analiz sonuçları, ilgili geri kazanım senaryosu bağlamında değerlendirilmelidir. Etki düzeyini belirlemek üzere eşik değerler kullanılabilir. Ancak genel bir limit konsantrasyon uygulanamaz, açık sistemde gerçekleşen geri dönüşüm faaliyetinin değerlendirilmesi için maruz kalma ve ölçülen etkilerle ilişkisi (EC50) belirleyicidir. Araştırılacak olan soruna bağlı olarak, bulgular görece uzun zaman periyotlarını tahmin etmede faydalı olabilir. Bu şekilde uzun vadeli çalışmalar ile kronik etkiler veya ilgili limit konsantrasyonların belirlenmesi sağlanabilir.

## SONUÇ

Katı atıkların toplanması, depolanması ve bertarafı gelişmiş, gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerin temel toplumsal ve ekonomik sorunları arasında yer almaktadır. Atıkların kontrolsüz depolanması durumunda hem katı atıklar, hem de yağışlar ve nem sebebi ile oluşan süzüntü suları ekosistem ve halk sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Atıkların doğru yönetimi için bileşenlerinin ve içeriğinin analiz edilerek doğru şekilde sınıflandırılmaları gereklidir. Mevzuatta atıklar tehlikeli, tehlikesiz ve muallak atıklar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Tehlike tanımı için 15 tehlike kriteri belirlenmiştir. Bunlardan biri ekotoksikite (H14) kriteridir. Atıkların ekotoksik olarak sınıflandırılmalarında fiziksel ve kimyasal testler yetersiz kalmakta ve biyolojik testler ile desteklenmelidir. Uluslararası geçerliliğe sahip çok sayıda standardize yöntem oluşturulmuştur. Standardize yöntemlerin kullanılması üretilen verilerin geçerliliğini, homojenliğini ve kabul edilebilirliğini artırmakta, verilere geniş kullanım alanı sunmaktadır. Yöntemler etkili değerlendirmeler elde etmek üzere farklı seyreltme oranlarındaki kirleticilerin etkilerinin karasal (katı faz) ve sucul ortamlarda (sıvı faz), ayrıca farklı trofik düzeylerde (üreticiler, tüketiciler ve ayrıştırıcılar) yürütülecek şekilde organize

edilmeli, geniş kapsamlı test sistemleri ile tasarlanmalıdır. Ekotoksikolojik testler atıkların ekotoksik etkilerinin belirlenmesi yanında, tehlikeli olup olmadığı bilinmeyen atıkların sınıflandırılmasında ve atık yönetim stratejilerinin etkinliği ile geri dönüşüm işlemlerinin ekolojik risk değerlendirmelerinde de kullanılabilir. Geniş çaplı ve uzun zamanlı planlanan test sistemleri ile ekosistem boyutunda geniş bir etki alanının değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir. Kullanılan atık çeşitliliğine ve test canlısı çeşitliliğine bağlı elde edilen homojen veriler, genel kapsamlı atık yönetim planlarının oluşturulması amacıyla genellenebilmektedir. Evsel ve endüstriyel atıkların yönetiminde mevzuat ile belirlenen deşarj limitlerinin arasında “etkili derişim 50” ve “en düşük etkili derişimlerin (<%10) LID” değerlerinin kullanılması ve maliyeti yüksek uygulaması zor balık akut deneyleri yerine altertanif yöntemlerin yerleştirilmesi çevre sağlığının korunması ve bütüncül bir ekosistem yönetiminin sağlanması için gereklidir.

## KAYNAKLAR

- Alakangas E., (2015). Quality guidelines for wood fuels in Finland VTT-M-04712-15. Technical Research Centre of Finland VTT Ltd. 61 s.
- Atık Yönetimi Yönetmeliği (2015). 02.04.2015 tarih ve 29314 sayılı Resmi Gazete.
- Aydın M.E., Kara G., (2006). Organize sanayi atık sularının zehirliliği. Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi. 21 (3-4), 13-20.
- Ehrlichmann, H., Dott, W., Eisentrager, A., (2000). Assessment of the Water-Extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 73-80.
- Ferrari B.J., Masfarau J.F., Maul A., Ferard J.F., (2006). Predicting uncertainty in the ecotoxicological assessment of solid waste leachates. *Environmental Science and Technology*. 40 (20), 7012-7017.
- Klauck C.R., Rodrigues M.A.S., Silva L.B., (2015). Evaluation of phytotoxicity of municipal landfill leachate before and after biological treatment. *Brazilian Journal of Biology*. 75 (2), 57-62.
- LAGA PN 98 - guidelines for the procedure for physical, chemical and biological investigations in connection with the recycling/disposal of waste. Release 32. Country Working Community waste, Munich (2002).
- Lapa N., Barbosa R., Morais J., Mendes B., Mehu J., Santos Oliveira J.F., (2002). Ecotoxicological assessment of leachates from MSWI bottom ashes. *Waste Management*. 22, 583-593.
- Liang J., Ning X., Kong M., Liu D., Wang G., Cai H., Sun J., Zhang Y., Lu X., Yuan Y., 2017. Elimination and ecotoxicity evaluation of phthalic acid esters from textile-dyeing wastewater. *Environmental Pollution*. 231, 115-122.
- Mtisi M., Gwenzi W., (2019). Evaluation of the phytotoxicity of coal ash on lettuce (*Lactuca sativa* L.) germination, growth and metal uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 170. 750-762.
- Pandard, P., Römbke, J. 2013. Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 9 (4). 665-672
- Römbke J., Moser H., Moser T., (2009). Overview on the Results of the Ring Test. 3-25. (Ed. Moser H., Römbke J., (2009). Ecotoxicological characterization of waste; results and experiences of an international ring test. Springer Science + Business Media, LLC233 Spring Street, New York, USA.
- Römbke J., Jansch S., Meier M., Hilbeck A., Teichmann H., Tappeser B., (2009b). General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the environmental risk assessment of genetically modified plants. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 6 (2). 287-300.
- Tongur S., Yıldız S., Yıldırım R., (2019). Bazı ilaç gruplarının su ortamına olan etkilerinin akut toksisite testleri ile değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 23 (özel sayı). 71-75.
- Tuprakay S.R., Suksabye P., Menchai P., Tuprakay S. (2014). The physical and chemical properties of solid waste from water tourism. Case study: Taling Chan Floating Market, Bangkok, Thailand. *WIT Transactions on Ecology and The Environment*, Vol 180, WIT Press.
- UBA (2013). Umwelt Bundes Amt for our Environment (Almanya Federal Çevre Örgütü). Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes.
- Wilke B.M., Riepert F., Koch C., Kühne T., Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70. 283-293.

## Chemical recycling of waste polyethylene terephthalate bottles with neutral hydrolysis to produce terephthalic acid

Vedat Arda Küçük<sup>1\*</sup>, Barış Şimşek<sup>1</sup>, Mehmet Muhtar Kocakerim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Çankırı, Turkey.

\*ardakucuk@karatekin.edu.tr

### Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is an important and widely used polymer. Ever increasing production and consumption of PET created serious environmental concerns. Chemical recycling of waste PET can be an effective solution to the environmental problems created by PET wastes. In this study chemical recycling of waste PET was conducted with neutral hydrolysis method. Shredded waste PET bottles were depolymerized in a water filled autoclave batch reactor to synthesize terephthalic acid without a catalyst. It was seen that waste PET was fully depolymerized into a white solid product (terephthalic acid). Solid product was analysed with an optical microscope and fourier-transform infrared spectrometer (FTIR). It was concluded that terephthalic acid could be successfully synthesized under specified conditions.

**Keywords:** waste PET bottle, polyethylene terephthalate, terephthalic acid, TPA, hydrolysis, depolymerisation

### INTRODUCTION

Polyethylene terephthalate (PET) is a commonly used industrial polymer. It is used to make textile fibres, sheets, carpets and food containers due to its glass-like transparent appearance and high strength. PET is the preferred material in beverage packaging over traditional glass bottles due to its elasticity (almost non-breakable) and lower weight (much less material is needed to make a durable bottle). Desirable properties of PET led to a significant increase in the production and waste PET generation (Singh et al. 2017). Zero landfill policies gaining importance (Rousta, Richards, and Taherzadeh 2015) so landfilling PET wastes -which is very durable against natural degradation- become less attractive. Recycling of PET wastes can be a useful solution to this problem. There are several methods for waste PET recycling. The most common method is mechanical recycling. Since PET is a thermoplastic it can withstand several extrusions (reforming) albeit with a considerable degradation due to the presence of contaminants (in particular acidic contaminants) and unwanted side reactions like crosslinking and depolymerization (Paci and La Mantia 1998). Lower quality of mechanically recycled PET limits its demand and usage. Another approach to the waste PET recycling is chemical recycling. This method involves depolymerising of PET with the help of solvents to the monomers such as terephthalic acid (TPA) or dimethyl terephthalate (DMT). Methanolysis, glycolysis, aminolysis ammonolysis and hydrolysis are the most common chemical recycling methods (Al-Sabagh et al. 2016; Carta, Cao, and D'Angeli 2003). Hydrolysis of the PET is one of the most preferred methods. It is depolymerisation of PET into to its monomers ethylene glycol (EG) and terephthalic acid (TPA).

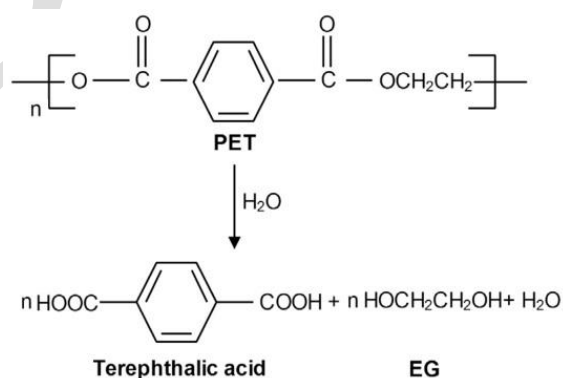


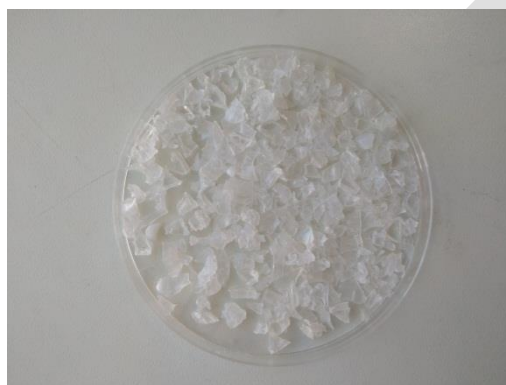
Figure 34. Neutral hydrolysis of PET

PET is synthesized from EG and TPA in commercial processes. Hydrolysis can be regarded as the reversing of this process. Therefore TPA produced by hydrolysis can be used in virgin PET production again. Hydrolysis can be conducted in acidic (Yoshioka, Motoki, and Okuwaki 2001), basic (Karayannidis, Chatziavgoustis, and Achilias 2002) or neutral aqueous medium (Launay, ThomINETTE, and Verdu 1994).

Acidic or basic hydrolysis requires large amounts of chemicals; also reaction products should be neutralized prior to the further steps. Neutralization process requires large amounts of chemicals as well. Therefore neutral hydrolysis was investigated in this study. No additional catalysts were used.

## MATERIALS AND METHODS

Shredded bottle grade PET was supplied from a local recycling center (Image 2). Purified water was prepared with Merck Millipore Elix Essential and had 10-15 M $\Omega$ .cm resistivity.



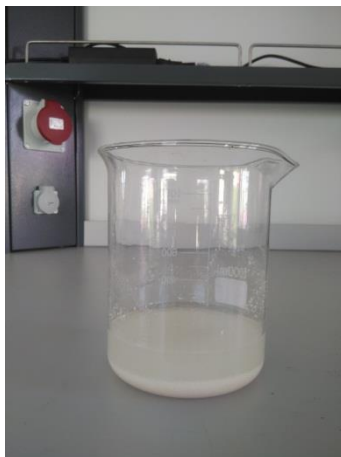
**Figure 2.** Shredded waste PET

20g waste PET and 200mL purified water was loaded into the Parr 4520 series steel autoclave reactor. Stirring speed was set as 400 rpm and reaction temperature was set as 520K, it took about 60 minutes to reach the desired temperature then reactor was run for 15 minutes. After the reaction time heating collar was removed and reactor was cooled to the room temperature (Figure 3).



**Figure 3.** Autoclave reactor

Under these conditions waste PET was completely depolymerized into its monomers, namely TPA and EG. Depolymerisation products were in two phase (Figure 4).



**Figure 4.** Depolymerization products

Liquid phase contained water, EG and other depolymerisation products (Liu, Wang, and Pan 2012). Solid phase were separated from the mixture, washed with 2 litres of pure water and dried in the oven at 90 °C for 12 hours (Figure 5).



**Figure 5.** Dried solid product

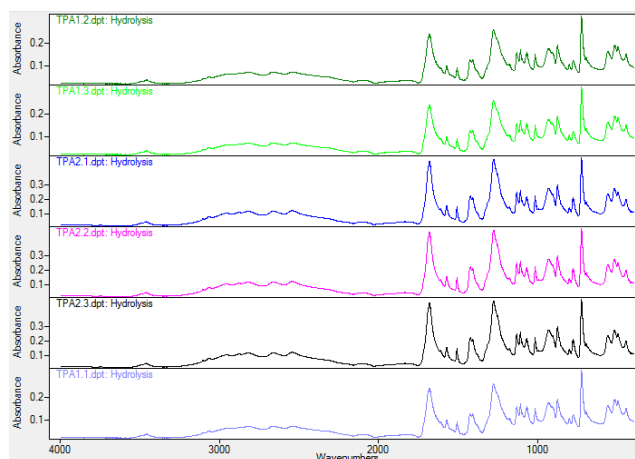
## RESULTS AND DISCUSSION

Dried solid products was analysed with an optical microscope (Figure 6) and it was clearly seen that solid product had crystal structure.



**Figure 6.** Optical microscope image of solid product

Solid products were analysed with Bruker Tensor II Fourier-transform infrared spectrometer (FTIR) to reveal their chemical structure (Figure 7).



**Figure 7.** FTIR spectra of the solid products

Carbonyl ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), hydroxide ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ,  $900\text{ cm}^{-1}$ ), C-H C=C stretchings between  $3100\text{ cm}^{-1}$  and  $3000\text{ cm}^{-1}$  suggest that chemical structure of solid product was strongly correlated with TPA. When the mechanism (Liu, Wang, and Pan 2012) of hydrolysis, crystal structure, FTIR findings and high stability of the TPA (melting point  $>400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) considered it can be said that the structure of solid product is TPA. Findings were found to be consistent with the literature (Hollauer, Mondragon, and Castaño 2001).

## CONCLUSION

Depolymerisation of waste PET with hydrolysis method was studied. It was shown that waste PET could be fully depolymerized into the TPA without using any catalysts under the specified reaction conditions. In the literature hydrolysis reaction of PET was shown to be sluggish (Mancini et al. 2013) under lower temperatures. In this study depolymerisation was completed relatively fast even when heating and the cooling time were included.

## REFERENCES

- Al-Sabagh, AM, FZ Yehia, Gh Eshaq, AM Rabie, and AE ElMetwally. 2016. 'Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate', *Egyptian Journal of Petroleum*, 25: 53-64.
- Carta, Daniela, Giacomo Cao, and Claudio D'Angeli. 2003. 'Chemical recycling of poly (ethylene terephthalate)(PET) by hydrolysis and glycolysis', *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 390-94.
- Hollauer, Eduardo, MA Mondragon, and Victor M Castaño. 2001. 'Fourier transform infrared and Raman spectra, vibrational assignment and ab initio calculations of terephthalic acid and related compounds', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57: 993-1007.
- Karayannidis, GP, AP Chatziavgoustis, and DS Achilias. 2002. 'Poly (ethylene terephthalate) recycling and recovery of pure terephthalic acid by alkaline hydrolysis', *Advances in Polymer Technology: Journal of the Polymer Processing Institute*, 21: 250-59.
- Launay, A, F Thominette, and J Verdu. 1994. 'Hydrolysis of poly (ethylene terephthalate): a kinetic study', *Polymer degradation and Stability*, 46: 319-24.
- Liu, Yingping, Meixian Wang, and Zhiyan Pan. 2012. 'Catalytic depolymerization of polyethylene terephthalate in hot compressed water', *The Journal of Supercritical Fluids*, 62: 226-31.

- Mancini, Sandro Donnini, Alex Rodrigues Nogueira, Elidiane Cipriano Rangel, and Nilson Cristino da Cruz. 2013. 'Solid-state hydrolysis of postconsumer polyethylene terephthalate after plasma treatment', *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 1989-96.
- Paci, Massimo, and FP La Mantia. 1998. 'Competition between degradation and chain extension during processing of reclaimed poly (ethylene terephthalate)', *Polymer degradation and Stability*, 61: 417-20.
- Rousta, Kamran, Tobias Richards, and Mohammad J Taherzadeh. 2015. 'An overview of solid waste management toward zero landfill: a swedish model.' in, *Resource Recovery to Approach Zero Municipal Waste* (CRC Press).
- Singh, Narinder, David Hui, Rupinder Singh, IPS Ahuja, Luciano Feo, and Fernando Fraternali. 2017. 'Recycling of plastic solid waste: A state of art review and future applications', *Composites Part B: Engineering*, 115: 409-22.
- Yoshioka, Toshiaki, Tsutomu Motoki, and Akitsugu Okuwaki. 2001. 'Kinetics of hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) powder in sulfuric acid by a modified shrinking-core model', *Industrial & engineering chemistry research*, 40: 75-79.



## Chemical recycling of waste polyethylene terephthalate bottles with neutral hydrolysis to produce terephthalic acid

Vedat Arda Küçük\*, Barış Şimşek, Mehmet Muhtar Kocakerim

Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Çankırı, Turkey.

\* Corresponding author e-mail: ardakucuk@karatekin.edu.tr

### Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is an important and widely used polymer. Ever increasing production and consumption of PET created serious environmental concerns. Chemical recycling of waste PET can be an effective solution to the environmental problems created by PET wastes. In this study chemical recycling of waste PET was conducted with hydrolysis method. Shredded waste PET bottles were depolymerized in a water filled autoclave batch reactor to synthesize terephthalic acid without a catalyst. It was seen that waste PET was fully depolymerized into a white solid product terephthalic acid. Solid product was analysed with an optical microscope and fourier-transform infrared spectrometer (FTIR). It was concluded that terephthalic acid could be successfully synthesized under specified conditions.

**Keywords:** waste PET bottle, polyethylene terephthalate, terephthalic acid, TPA, hydrolysis, depolymerisation

### INTRODUCTION

Polyethylene terephthalate (PET) is a commonly used industrial polymer. It is commonly used to make textile fibres, sheets, carpets, food containers due to its glass-like transparent appearance and high strength. PET is the preferred material in beverage packaging over traditional glass bottles due to its elasticity (almost non-breakable) and lower weight (much less material is needed to make a durable bottle). Desirable properties of PET led to a significant increase in the production and waste PET generation (Singh et al. 2017). Zero landfill policies gaining importance (Rousta, Richards, and Taherzadeh 2015) so landfilling PET wastes which is very durable against natural degradation become less attractive. One solution to this problem can be the recycling of PET wastes. There are several methods for waste PET recycling. The most common method is mechanical recycling. Since PET is a thermoplastic it can withstand several extrusions (reforming) albeit with a considerable degradation due to the presence of contaminants (in particular acidic contaminants) and unwanted side reactions (Paci and La Mantia 1998). Lower quality of mechanically recycled PET limits its demand and usage. Another desirable recycling method is chemical recycling. This method involves depolymerising of PET with the help of solvents to the monomers with lower molecular weights. Methanolysis, glycolysis, aminolysis ammonolysis and hydrolysis are the most common chemical recycling methods (Al-Sabagh et al. 2016; Carta, Cao, and D'Angeli 2003). Hydrolysis of the PET is one of the most preferred methods. It is depolymerisation of PET into to its monomers ethylene glycol (EG) and terephthalic acid (TPA).

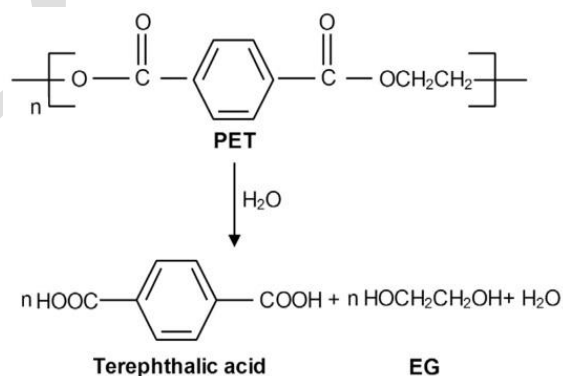


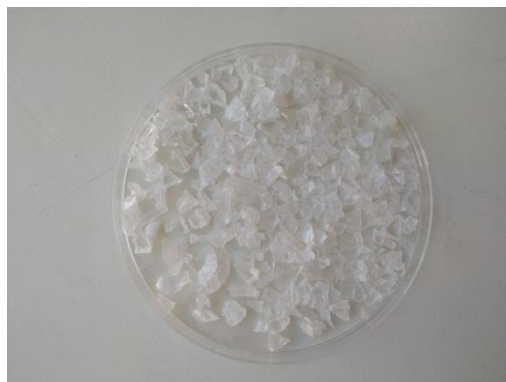
Figure 35. Neutral hydrolysis of PET

PET is synthesized from EG and TPA in commercial processes. Therefore TPA produced by hydrolysis can be used in virgin PET production again. Hydrolysis can be conducted in acidic (Yoshioka, Motoki, and Okuwaki 2001), basic (Karayannidis, Chatziavgoustis, and Achilias 2002) or neutral aqueous medium (Launay, ThomINETTE, and Verdu 1994).

Acidic or basic hydrolysis requires large amounts of chemicals; also reaction products should be neutralized prior to the further steps. Neutralization process requires large amounts of chemicals as well. Therefore neutral hydrolysis was investigated in this work. No additional catalysts were used.

## MATERIALS AND METHODS

Shredded bottle grade PET was supplied from a local recycling center (Image 2). Pure water was prepared with Merck Millipore Elix Essential and had 10-15 M $\Omega$ .cm resistivity.



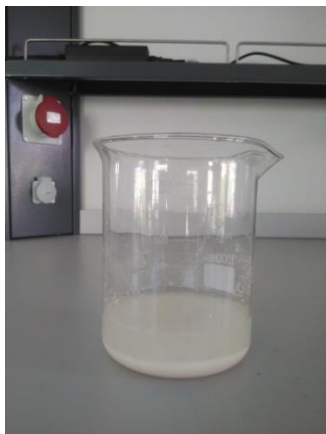
**Figure 2.** Shredded waste PET

20g waste PET and 200mL purified water was loaded into the Parr 4520 series steel autoclave reactor. Stirring speed was set as 400 rpm and reaction temperature was set as 520K, it took about 60 minutes to reach the desired temperature then reactor was run for 15 minutes. After the reaction time heating collar was removed and reactor was cooled to the room temperature (Figure 3).



**Figure 3.** Autoclave reactor

Under these conditions waste PET was completely depolymerized into its monomers, namely TPA and EG. Depolymerisation products were in two phase (Figure 4).



**Figure 4.** Autoclave reactor

Liquid phase contained water, EG and other depolymerisation products (Liu, Wang, and Pan 2012). Solid phase were separated from the mixture, washed with 2 litres of pure water and dried in the oven at 90 °C for 12 hours (Figure 5).



**Figure 5.** Dried solid product

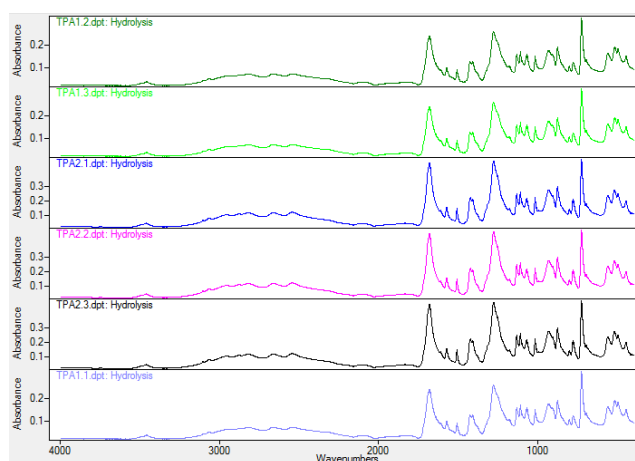
## RESULTS AND DISCUSSION

Dried solid products was analysed with an optical microscope (Figure 6) and it was clearly seen that solid product had crystal structure.



**Figure 6.** Optical microscope image of solid product

Solid products were analysed with Bruker Tensor II Fourier-transform infrared spectrometer (FTIR) to reveal their chemical structure (Figure 7).



**Figure 7.** FTIR spectra of the solid products

Carbonyl ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), hydroxide ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ,  $900\text{ cm}^{-1}$ ), C-H C=H stretchings between  $3100\text{ cm}^{-1}$  and  $3000\text{ cm}^{-1}$  suggest that chemical structure of solid product was strongly correlated with TPA. When the mechanism (Liu, Wang, and Pan 2012) of hydrolysis, crystal structure, FTIR findings and high stability of the TPA (melting point  $>400\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) considered it can be said that the structure of solid product is TPA. Findings were found to be consistent with the literature (Hollauer, Mondragon, and Castaño 2001).

## CONCLUSION

Depolymerisation of waste PET with hydrolysis method was studied. It was shown that waste PET could be fully depolymerized into the TPA without using any catalysts under the specified reaction conditions. In the literature hydrolysis reaction of PET was shown to be sluggish (Mancini et al. 2013) under lower temperatures. In this study depolymerisation was completed relatively fast even when heating and the cooling time were included.

## REFERENCES

- Al-Sabagh, AM, FZ Yehia, Gh Eshaq, AM Rabie, and AE ElMetwally. 2016. 'Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate', *Egyptian Journal of Petroleum*, 25: 53-64.
- Carta, Daniela, Giacomo Cao, and Claudio D'Angeli. 2003. 'Chemical recycling of poly (ethylene terephthalate)(PET) by hydrolysis and glycolysis', *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 390-94.
- Hollauer, Eduardo, MA Mondragon, and Victor M Castaño. 2001. 'Fourier transform infrared and Raman spectra, vibrational assignment and ab initio calculations of terephthalic acid and related compounds', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57: 993-1007.
- Karayannidis, GP, AP Chatziavgoustis, and DS Achilias. 2002. 'Poly (ethylene terephthalate) recycling and recovery of pure terephthalic acid by alkaline hydrolysis', *Advances in Polymer Technology: Journal of the Polymer Processing Institute*, 21: 250-59.
- Launay, A, F Thominet, and J Verdu. 1994. 'Hydrolysis of poly (ethylene terephthalate): a kinetic study', *Polymer degradation and Stability*, 46: 319-24.
- Liu, Yingping, Meixian Wang, and Zhiyan Pan. 2012. 'Catalytic depolymerization of polyethylene terephthalate in hot compressed water', *The Journal of Supercritical Fluids*, 62: 226-31.
- Mancini, Sandro Donnini, Alex Rodrigues Nogueira, Elidiane Cipriano Rangel, and Nilson Cristiano da Cruz. 2013. 'Solid-state hydrolysis of postconsumer polyethylene terephthalate after plasma treatment', *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 1989-96.

- Paci, Massimo, and FP La Mantia. 1998. 'Competition between degradation and chain extension during processing of reclaimed poly (ethylene terephthalate)', *Polymer degradation and Stability*, 61: 417-20.
- Rousta, Kamran, Tobias Richards, and Mohammad J Taherzadeh. 2015. 'An overview of solid waste management toward zero landfill: a swedish model.' in, *Resource Recovery to Approach Zero Municipal Waste* (CRC Press).
- Singh, Narinder, David Hui, Rupinder Singh, IPS Ahuja, Luciano Feo, and Fernando Fraternali. 2017. 'Recycling of plastic solid waste: A state of art review and future applications', *Composites Part B: Engineering*, 115: 409-22.
- Yoshioka, Toshiaki, Tsutomu Motoki, and Akitsugu Okuwaki. 2001. 'Kinetics of hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) powder in sulfuric acid by a modified shrinking-core model', *Industrial & engineering chemistry research*, 40: 75-79.

## ***Lepidocheyla* Volgin akar cinsinin (Acari: Cheyletidae) Türkiye'deki ilk bulunuşu**

Burcu Kabasakal<sup>1\*</sup>, Salih Doğan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye.

<sup>1</sup>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzincan, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: burcu\_a82@hotmail.com

### **Özet**

*Lepidocheyla* Volgin, Cheyletidae familyasında (Acari: Trombidiformes) yer alan cinslerden biridir. Şimdiye kadar dünyada *Lepidocheyla* cinsine ait sadece iki tür bilinmektedir: *L. gracilis* Volgin ve *L. caucasica* Volgin. Bu çalışmada *L. gracilis* türü Türkiye'den yeni bulunmuştur. Bu, aynı zamanda, Türkiye'de *Lepidocheyla* cinsinin varlığının ilk bildirimidir.

**Anahtar kelimeler:** Cheyletidae, *Lepidocheyla*, akar, yeni kayıt, predatör, Türkiye.

### **New occurrence of the mite genus *Lepidocheyla* Volgin (Acari: Cheyletidae) in Turkey**

#### **Abstract**

*Lepidocheyla* Volgin is one of the genera within the family Cheyletidae (Acari: Trombidiformes). Up to now, only two species belonging to the genus *Lepidocheyla* are known in the world: *L. gracilis* Volgin and *L. caucasica* Volgin. With this study, *L. gracilis* is newly-found from Turkey. This is also the first notification of the presence of the genus *Lepidocheyla* in Turkey.

**Keywords:** Cheyletidae, *Lepidocheyla*, mite, new record, predator, Turkey.

### **GİRİŞ**

Keyletid akarlar (Acari: Cheyletidae) dünya çapında bir yayılıma sahiptirler. Bu akarların çoğu bitkiler üzerinde, toprak ve bitki döküntüsünde predatör olarak serbest yaşarken, bazıları böcekler, kuşlar ve memelilerde parazit olarak yaşamaktadır (Bochkov ve Fain, 2001; Akpınar ve ark., 2017). Bu familya dünyada 77 cins ve 500'e yakın tür ile temsil edilmektedir (Doğan ve ark., 2011, 2019; Bochkov and Abramov, 2016; Ardeshtir, 2017; Salarzahi ve ark., 2018, 2019). Ülkemizden ise bu grubun 18 türü bilinmektedir (Akpınar ve ark., 2017).

Çalışmada şu ana kadar iki türü bilinen *Lepidocheyla* Volgin cinsine ait *L. gracilis* Volgin türü Türkiye için yeni kayıt olarak verilmiştir. Ayrıca Türkiye'de *Lepidocheyla* cinsinin varlığı ilk kez bu çalışmayla ortaya konmaktadır. *L. gracilis*'in morfolojik yapısı diğer keyletid türlerinden önemli farklar içermektedir. Özellikle histerozoma plağının uzamış ve kısmen bölünmüş olması ile diğerlerinden ayırt edilmektedir.

### **MATERYAL ve YÖNTEM**

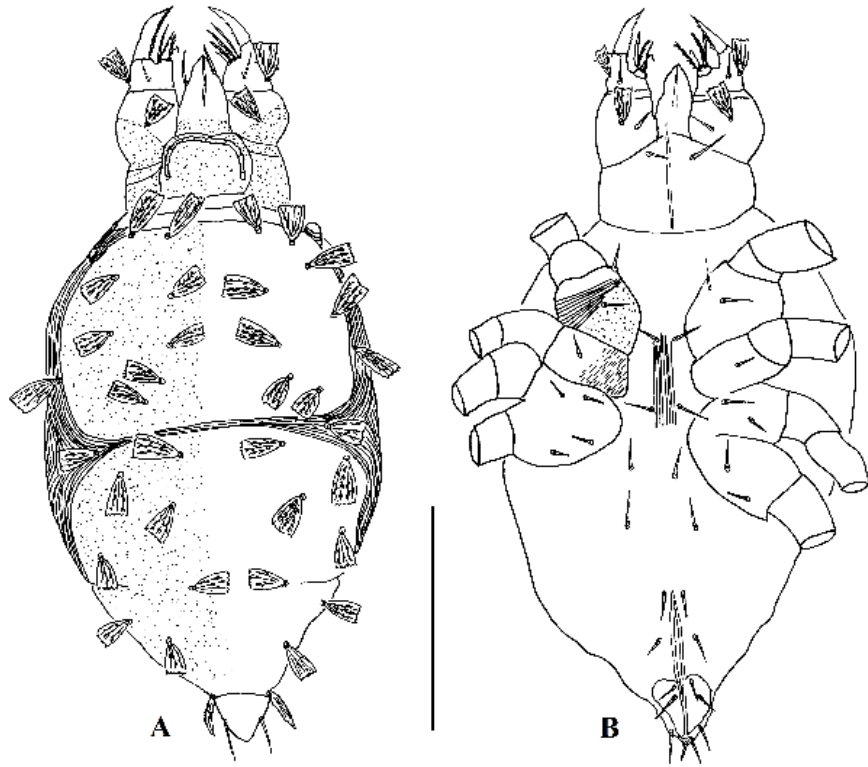
Akar örneklerinin toplanması, ayıklanması, preparasyonu ve saklanması daha önce Doğan (2006) ve Walter ve Krantz (2009) tarafından belirtilen yöntemler izlendi. Akarların genel görünüşü ve ayırt edici karakterlerine ait çizimleri faz-kontrast donanımlı LEICA DM 4000B, fotoğrafıma işlemleri ise Olympus BX63 model ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı. Vücut büyüklüğü ve çeşitli vücut yapılarının ölçümleri ise LAS V 3.8 programı yardımıyla µm cinsinden alındı.

### **BULGULAR**

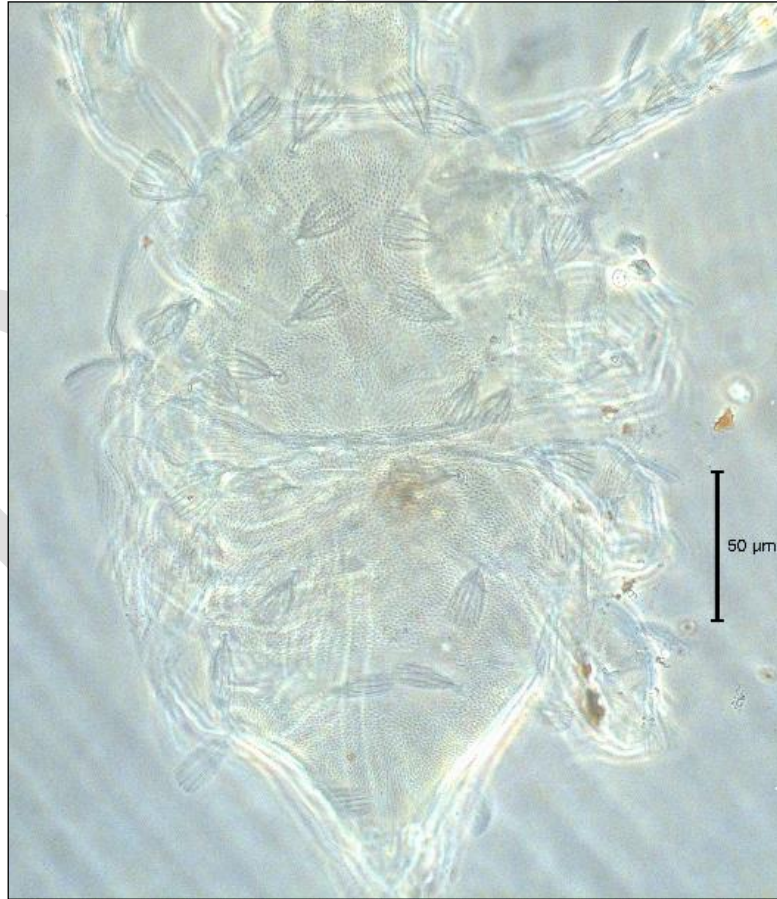
#### ***Lepidocheyla gracilis* Volgin, 1963**

Dişi (Şekil 1-4)

Vücut gnatozoma dâhil (329) µm uzunluğunda, (179) µm genişliğindedir; gnatozoma (77) µm uzunluğunda ve (85) µm genişliğindedir.



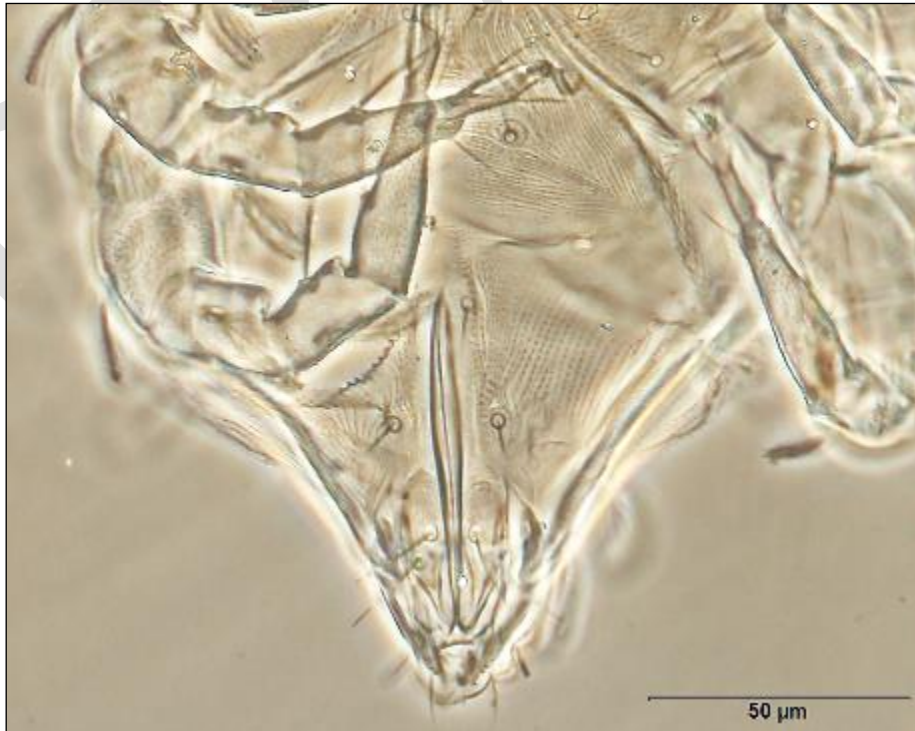
Şekil 1. *Lepidocheyla gracilis* (Dişi). A) Vücut sırttan, B) Vücut karından; ölçek 100 µm.



Şekil 2. *Lepidocheyla gracilis* (Dişi). Vücut sırttan.



Şekil 3. *Lepidocheyla gracilis* (Dişi). Gnatozoma.



Şekil 4. *Lepidocheyla gracilis* (Dişi). Anogenital bölge.



Dorsal kısım iki büyük plak ile kaplıdır ve üzeri tegmen ile aynı desene sahiptir. Gözler mevcuttur ve propodozoma plağının yan kenarlarına karşılıklı olarak yerleşmiştir. Sırt kılları nispeten geniş, yelpaze şeklindedir. Propodozoma plağının yanlarında ve merkezi kısmında dörder çift kıl bulunur. Humeral kıllar propodozoma plağının arka yan kısımlarında bulunur ve diğer propodozomal kıllar ile aynı şekle sahiptir. Propodozoma plağının kıl uzunlukları (20-25) µm arasında değişmektedir. Propodozoma plağının uzunluğu (109) µm, genişliği (126) µm'dir. Histerozoma plağı arka kısma doğru sivrilmiştir ve kısmen ikiye bölünmüş şeklindedir. Histerozoma plağında uzunlukları (21-28) µm arasında değişen sekiz çift kıl bulunur. Bu kılların üç çifti merkezi, beş çifti yanal olarak yerleşmiştir. Bir çift kıl ise orta yan kesimde çizgili integüment üzerinde bulunur. Histerozoma plağının uzunluğu (123) µm, genişliği (130) µm'dir (Şekil 1, 2).

Karında koksaların kaide kısımları noktalanma gösterirken trokantere doğru çizgilenme mevcuttur. Karın kısmı çizgilenme göstermektedir ve 1a, 3a ve 4a kıllarını taşır (Şekil 1). 4a kılının hemen arkasında bir kıl çifti daha yer alır. Koksalar gruplaşmış halde olup I. ve II. koksalar III. ve IV. koksalardan ayrılmış durumdadır. Anogenital bölgede yedi çift kıl mevcuttur. Bu kıllardan iki çifti aggenital, iki çifti genital ve üç çifti ise pseudanal kıl şeklindedir (Şekil 1, 4).

Rostrum kısa ve konik olup bir yanal ve bir de orta kısımda kıl bulundurur. Tegmen ve protegmen noktalıdır. Peritrem boyutları değişen 4 parçalı bir şekilde yerleşmiştir. Rostrum konik yapılıdır ve iki çift adoral kıl taşır. Palp geniştir. Palp turnakları küçük dişlidir ve dişler oldukça küçüktür. Palp femuru üç kıl taşır. Palp genusunda dorsal ve ventral kısmında aynı şekle sahip birer kıl mevcuttur. Palp tibiyasında üç kıl bulunur. Palpin dorsal kısmındaki femur, genu ve tibiyasında bulunan kıllar yelpaze şeklinde ve uzunlukları birbirine yakın iken ventral kısımda basit ve düz kıllar mevcuttur. Palp tarsusunda ikisi tarak ve ikisi de orak şeklinde olmak üzere dört kıl mevcuttur. Subkapitulum kılları düz ve basit yapıdadır. Apodem, subkapitulumun orta hattı üzerinde uzamış ve subkapitulum kılları arasında az çatallı bir yapıya sahiptir (Şekil 3).

### İncelenen Örnek ve Yaşama Alanı

1 ♀, gübreden, Kelkit Vadisi (Gürçeşme yakını, Niksar), 40°35'39"N 36°50'02"D, 285 m, 24.07.2007.

### Yayılışı

Çin, Filipinler, İran, İsrail, Tacikistan ve Ukrayna (Volgin, 1963, 1969; Corpuz-Raros, 1988; Lin ve ark., 1998; Gerson ve ark., 1999; Fain ve Bochkov, 2001; Bochkov ve ark., 2005; Xia, 2010; Baradaran Anaraki ve ark., 2012; Khaleglabadian ve ark., 2015; Ardeshir, 2017; Salarzahi ve ark., 2018).

### TARTIŞMA

*Lepidocheyla* cinsinin *L. gracilis* Volgin ve *L. caucasica* Volgin olmak üzere sadece iki türü bilinmektedir. Bu iki türün dışında ayrıca *Lepidocheyla*'nın cins seviyesinde Mısır, Irak ve İran'dan kaydı bulunmaktadır (Soliman, 1975; Mahmood, 2010; Ardeshir ve ark., 2017).

*Lepidocheyla gracilis* ilk olarak Volgin (1963) tarafından Ukrayna'dan tanımlanmış, daha sonra türün birçok yerden kaydı verilmiştir (Corpuz-Raros, 1988; Lin ve ark., 1998; Fain ve Bochkov, 2001, Bochkov ve ark., 2005; Xia, 2010; Baradaran Anaraki ve ark., 2012; Khaleglabadian ve ark., 2015; Ardeshir, 2017). Bu çalışmada *L. gracilis* türü Türkiye'den ilk defa tanımlanmıştır; bu aynı zamanda, Türkiye'den *Lepidocheyla* cinsinin ilk bildirimidir.

Türün tanımlanmasında gözlerin bulunması, vücudun dorsal kısmının iki plakla örtülü olması genel bir ayırım sağlarken, histerozoma plağının arkaya doğru sivrilmesi türün belirgin bir özelliği olarak görülmektedir. Türkiye örneğinde propodozoma plağının merkezi kısmında dört çift kıl vardır, tip örneğinde ise merkezi kıllar beş çifttir. Türkiye örneği diğer morfolojik özellikleri bakımından türün bilinen örnekleri ile uyum içindedir.

*Lepidocheyla gracilis* türüne ait bireyler ilk olarak eski gübrede bulunmuştur (Volgin, 1963, 1969; Corpuz-Raros, 1988; Gerson ve ark., 1999). Filipin örnekleri döküntüden (Corpuz-Raros, 1988), Çin örnekleri topraktan (Lin ve ark., 1998), İran örnekleri gübre, depolanmış tahıl, değirmen tozu, glayöl ve safran soğanından (Bochkov ve ark., 2005; Baradaran Anaraki ve ark., 2012; Khaleglabadian ve ark., 2015; Ardeshir, 2017), İsrail örnekleri bir kınkanatlıdan (Fain ve Bochkov, 2001) toplanmıştır. Türkiye örneği ise gübrede bulunmuş olup, cinsin diğer türüne ait tip örnekleri de gübrede bulunduğu (Volgin, 1978), bu yaşama alanının bu grup için daha uygun olduğu veya habitat tercihleri arasında olabileceği değerlendirilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın materyalini, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen 107T183 numaralı projeden elde edilen akar örneği oluşturmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Akpınar D, Çobanoğlu S, Öğreten A 2017. Cheyletidae familyasının özellikleri ve biyolojik mücadelede kullanım olanakları. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 4, 9-13.
- Ardeshir F 2017. Cheyletid mites (Acari: Trombidiformes) in stored grains in Iran. Persian Journal of Acarology, 6(1): 11-24.
- Ardeshir F, Yousefi Porshekeh A, Saboori A 2017. A faunistic study and population fluctuations of mites associated with stored wheat in Tehran region, Iran. Journal of Entomological Society of Iran, 27(2): 17-28. [Farsça]
- Baradaran Anaraki P, Arbabi M, Joharchi O, Rahimi H, Hoseini-Nia A 2012. Identification of the mites associated with the corm of gladiolus and saffron in Khorasan Razavi and Markazi Provinces, Iran. 20<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 2012, Shiraz, Iran, p. 516.
- Bochkov AV, Hakimitabar M, Saboori A 2005. A review of the Iranian Cheyletidae (Acari: Prostigmata). Belgian Journal of Entomology, 7: 99-109.
- Bochkov AV, Abramov VV 2016. To fauna of the free-living Cheyletidae (Acariformes: Cheyletoidea) of the European part of Russia. Systematic and Applied Acarology, 21: 335-346.
- Corpuz-Raros LA 1988. Systematic Studies of Philippine cheyletid mites (Acarina). V. New species and new records, with a note on the synonymy of *Tutacheyla* Corpuz-Raros. Philippine Journal of Science, 117(4): 413-427.
- Doğan S, Jalaeian M, Kamali H 2011. New records of two cheyletid mite species (Acari: Cheyletidae) from Iran. Turkish Journal of Zoology, 35: 781-782.
- Doğan S, Doğan S, Mağol J 2019. First record of *Cheletonella* (Acariformes: Cheyletidae) in Poland, with comments on other member of the genus. Acarological Studies, 1(2): in press.
- Fain A, Bochkov AV 2001. A review of some genera of cheyletid mites (Acari: Prostigmata) with description of new species. Acarina, 9: 47-95.
- Gerson U, Fain A, Smiley, RL 1999. Further observations on the Cheyletidae (Acari) with a key to the genera of the Cheyletinae and a list of all known species in the family. Bulletin de L'institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Entomologie, 69: 35-86.
- Khaleghabadian Z, Sadeghi Namghi H, Ardeshir F, Nemati A, Hatefi S 2015. Fauna of predatory mesostigmat and prostigmat mites of (Acari: Mesostigmata, Trombidiformes) associated with stored food products in Mashhad, Iran. Journal of Plant Production, 28(4): 555-564. [Farsça]
- Lin J-Z, Zhang Y-X, Yang M 1998. Two new records of the Cheyletinae from China (Acari: Cheyletidae). Acta Zootaxonomica Sinica, 23(3): 336. [Çince]
- Mahmood SH 2010. New species of *Cheletonella* (Acari: Cheyletidae) with check list of cheyletid mites from middle Iraq. XIII. International Congress of Acarology, 23-27 Ağustos, 2010, Recife-PE; Brezilya, s. 139.
- Salarzahi S, Hajizadeh J, Hakimitabar M, Ueckermann, EA 2018. A contribution to the knowledge of cheyletid mites of Iran with redescription of *Eucheyletia flabellifera* (Michael, 1878) (Prostigmata: Cheyletidae). Acarologia, 58(2): 457-470.
- Salarzahi S, Hajizadeh J, Ueckermann EA 2019. A new species of *Cheletonella* Womersley (Prostigmata: Cheyletidae) from Iran and a key to the species. Acarologia, 59: 188-195.
- Soliman ZR 1975. Three new species of cheyletid mites from Egypt (Acari: Prostigmata) with a key to genera. Acarologia, 17(1): 95-102.

- Xia B 2010. A review of progress on the systematics and biology of the family Cheyletidae in China, with a checklist of the Chinese cheyletids. *Zoosymposia*, 4: 158-164.
- Volgin VI 1963. Two new genera of predatory mites of the family Cheyletidae. *Entomological Review*, 42: 504-508.
- Volgin VI 1969. Acarina of the family Cheyletidae of the world. Akademia Nauk, Leningrad, USSR, 432 [Rusça]. Translated by Rao, P.M. (1987) Amerind Publishing Co., New Delhi, 532.
- Volgin VI 1978. New species of predatory cheyletid mites (Acariformes, Trombidiformes). *Entomologica Review*, 57: 213-217. [Rusça]
- Walter DE and Krantz GW 2009. Collecting, rearing, and preparing specimens. In: *A manual of Acarology*. Third edition. Krantz GW, Walter, DE (Eds). Texas: Teach University Press, USA, 83-96.

## Theoretical (B3LYP, HF) properties [spectroscopic (FT-IR, <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H-NMR), electronic, thermodynamic and geometric] of 2-(3-benzyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-on-4-yl)-azomethine) benzoic acid molecule

Gül Kotan<sup>1\*</sup>, Haydar Yüksek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas University, Kars Vocational School, Kars, Turkey.

<sup>2</sup>Kafkas University, Department of Chemistry, Kars, Turkey

\*Corresponding author e-mail: gulkemer@hotmail.com

### Abstract

2-(3-Benzyl-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-on-4-yl)-azomethine)-benzoic acid molecule has been optimized using the 6-311G(d,p) basis set of DFT (B3LYP) and HF methods. Thus, the most stable geometrical conformer of compound with different methods was obtained. Molecular geometric optimizations (bond angles, bond lengths), Proton/Carbon NMR chemical shifts, thermodynamic parameters, HOMO-LUMO analyses, electronic properties, mulliken charges, vibrational wavenumbers, dipole moment, total energy of the title molecule were studied using Gaussian 09W software package. The calculated results were obtained immersive via GaussView5.0 program. All quantum chemical computations were performed with HF and B3LYP functional in DFT method at the 6-311G(d,p) basis set. Proton Nuclear Magnetic Resonance (<sup>1</sup>H-NMR) and Carbon-13 Nuclear magnetic Resonance (<sup>13</sup>C-NMR) spectral values was calculated in gas phase and in DMSO solvent according to GIAO method. Theoretical and experimental values were plotted according to  $\delta_{exp} = a + b \cdot d$  calc. Theoretical spectral values of molecule were calculated and compared with experimental values. Using the separate methods in the veda4f program were calculated at the harmonic vibrational frequencies which were scaled with definite factor. In addition, thermodynamics properties (heat capacity  $CV^0$ , entropy  $S^0$  and enthalpy  $H^0$ ),  $E_{LUMO} - E_{HOMO}$  energy gap ( $\Delta E_g$ ) and electronic properties were calculated and the molecular surfaces such as the electron spin potential (ESP), molecular electrostatic potential (MEP), the total density, the electron density, the electrostatic potential of the molecule were visualized.

**Keywords:** B3LYP, HF, HOMO-LUMO, Veda4f, GIAO.

### INTRODUCTION

1,2,4-Triazole derivatives are known for several biological applications (Asiri et al., 2013; Ma et al., 2016; Nair et al., 2006; Yadav et al., 2001; Wang et al., 2001; Dash et al., 1984; Xia et al., 2014). Otherwise, Schiff bases have been used as bacteriocides, insecticides, pesticides, fungicides (Aydoğan et al., 2001; Azam et al 2007). In the last year, theoretical properties of Schiff bases were investigated on a computer. In this study, we investigated theoretical features of molecule. All theoretical calculations for the target compound were calculated with the Gaussian 09W quantum chemistry program (Frisch et al., 2009). Firstly, molecule was optimized by using the DFT and HF methods (Frisch et al., 2009; Wolinski et al 1990). The theoretical calculations <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR were performed by using DFT(B3LYP)/HF 6-311G++(d,p) and isotropic shift values were calculated by the method of GIAO (Wolinski et al., 1990). The visualization of all results has been performed using GaussView 5 (GaussView, 2009). Theoretical and experimental values were inserted into the graphic according to equation of  $\delta_{exp} = a + b \cdot \delta_{calc}$ . The standard error values were found via SigmaPlot program with regression coefficient of a and b constants. Experimental data obtained from the literature (Yüksek et al., 2006). Then, from this form, dipole moments, LUMO-HOMO, total energy, bond lengths, mulliken charges and bond angles, electronic properties;  $E_{LUMO} - E_{HOMO}$  energy gap ( $\Delta E_g$ ), electronic and thermodynamics properties were calculated. In addition, finally, the veda4f program was used in defining IR data (Jamroz, 2004). The theoretical vibrational spectra were calculated at the B3LYP /HF 6-311G++(d,p) basis sets in the gas phase and these data are scaled with factors (Merrich et al., 2007) for 6-311G++(d,p) basis set. Theoretical IR spectra were obtained from these scaled values.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental

IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 3315 (NH), 1726, 1702 (C=O), 1613 (C=N), 764 (1,2-disubstituted benzene ring), 753, 697 (monosubstituted benzene ring). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):  $\delta$  ppm 4.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>, J=7.40 Hz), 7.18-7.31 (m, 5H, ArH), 7.57-7.68 (m, 2H, ArH) 10.38 (s, 1H, N=CH), 11.98 (s, 1H, NH), 12.06 (s, 1H, COOH). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  ppm 30.95 (CH<sub>3</sub>), 125.25, 126.51, 126.61, 128.34(2C), 128.68(2C), 130.18, 130.72, 131.91, 133.52, 135.65 (arom-C), 146.23(triazole C3), 151.18 (N=CH), 152.25 (triazole C5), 167.76 (C=O).

### Theoretical

The calculations were carried out with density functional theory (DFT) and Hartree-Fock (HF) methods using 6-311G++(d,p) basis sets at the Gaussian 09W program package on a computing system (Frisch et al., 2009). Firstly, the compound was optimized by using the DFT(B3LYP)/HF methods and 6-311G++(d,p) basis set (Frisch et al., 2009; Wolinski et al., 1990). Then, <sup>13</sup>C/ <sup>1</sup>H-NMR isotropic shift values were calculated with method of GIAO (Wolinski et al., 1990). The veda4f program was used in defining IR data (Jamroz, 2004). Theoretically calculated IR data are scaled with appropriate scale factors (Merrick et al., 2007). Scaled dft and hf values are formed using theoretical infrared spectrum. Besides, the HOMO-LUMO energy, bond angles, bond lengths, thermodynamic parameters, E<sub>LUMO</sub>-E<sub>HOMO</sub> energy gap ( $\Delta E_g$ ), electronic properties, total energy, dipole moment and mulliken charges were calculated on the computer.

## RESULT AND DISCUSSION

### Computational Details

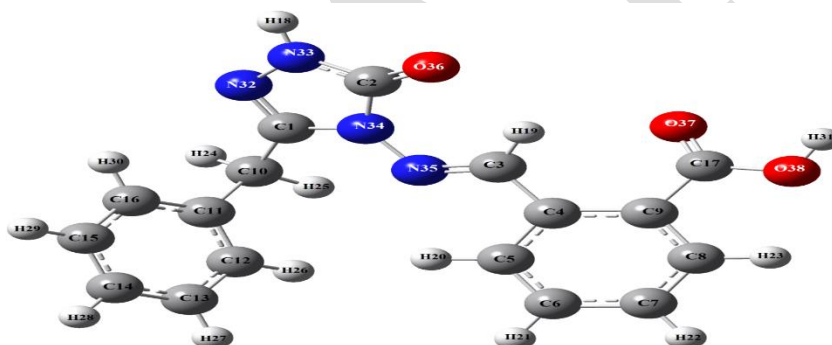


Figure 1. The Gaussview structure of the molecule.

Table 1. <sup>1</sup>H/ <sup>13</sup>C-NMR(DMSO) isotropic chemical shifts ( $\delta$ /ppm)

No	Experimental	B3LYP/6311d,p	Differ B3LYP	HF/6311d,p	Differ HF
C1	146,23	153,06	-6,83	161,08	-14,85
C2	151,18	152,89	-1,71	159,69	-8,51
C3	152,25	155,73	-3,48	165,19	-12,94
C4	133,52	143,09	-9,57	149,16	-15,64
C5	126,61	132,3	-5,69	138,79	-12,18
C6	131,91	138,2	-6,29	146,6	-14,69
C7	130,18	134,7	-4,52	139,46	-9,28
C8	130,72	136,7	-5,98	144,12	-13,4
C9	126,25	130,98	-4,73	134,9	-8,65
C10	30,95	35,41	-4,46	35,86	-4,91
C11	135,65	142,14	-6,49	146,53	-10,88
C12	128,68	134,22	-5,54	141,15	-12,47
C13	128,34	132,51	-4,17	139,14	-10,8
C14	126,51	130,99	-4,48	137,59	-11,08
C15	128,34	132,49	-4,15	139,22	-10,88
C16	128,68	131,97	-3,29	139,19	-10,51
C17	167,76	170,12	-2,36	171,69	-3,93
H18	11,98	8,19	3,79	7,33	4,65
H19	10,38	11,43	-1,05	10,33	0,05
H20	7,62	8,60	-0,98	8,03	-0,41

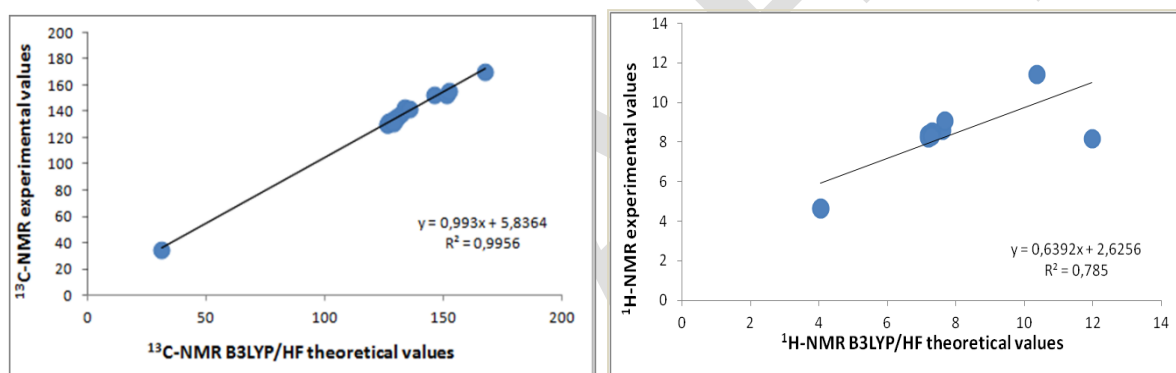
H21	7,3	8,52	-1,22	8,37	-1,07
H22	7,27	8,43	-1,16	8,18	-0,91
H23	7,67	9,09	-1,42	8,87	-1,20
H24	4,04	4,62	-0,58	4,02	0,02
H25	4,04	4,66	-0,62	3,98	0,06
H26	7,28	8,41	-1,13	8,08	-0,80
H27	7,2	8,38	-1,18	8,06	-0,86
H28	7,19	8,22	-1,03	7,03	0,16
H29	7,2	8,26	-1,06	7,98	-0,78
H30	7,28	8,31	-1,03	8,05	-0,77
H31	12,06	6,91	5,15	6,21	5,85

### The relation between R values of the compound

There is such a relationship between R<sup>2</sup>-values of the compound. B3LYP/6-311G++(d,p) (DMSO): <sup>1</sup>H: 0,702712, <sup>13</sup>C: 0,970569; HF/6-311G++(d,p) (DMSO): <sup>1</sup>H: 0,645054, <sup>13</sup>C: 0,965226. These values for compound were seen in the table 2. Theoretical and experimental carbon/proton chemical shifts ratios between according to a, b values, R<sup>2</sup> linear a correlation were observed.

**Table 2.** The correlation data for chemical shifts

	<sup>13</sup> C				<sup>1</sup> H			
	R <sup>2</sup>	S. hata	a	b	R <sup>2</sup>	S. hata	a	b
B3LYP	0,97056	3,56821	0,9900	5,11220	0,7027	1,1305	0,9422	1,2621
HF	0,96528	3,87863	0,9321	4,96372	0,6450	1,2353	0,8644	1,2577



**Figure 2.** The correlation graphs for B3LYP/HF 6-311G++(d,p) /DMSO chemical shifts

### The vibration frequency of the compound

Theoretically IR values were calculation veda 4f programme and scala values were obtain. The calculated harmonic vibrational frequency values were scaled with 0.9671 for B3LYP level, 0.9489 for HF/6-311++G(d,p) level (Merrick et al., 2007). The positive frequency in the data was found. IR spectrums were drawn with obtained values according to DFT/HF methods. Theoretically IR values were compare with experimentally IR values and found corresponding with each other of values.

**Table 3.** Significant vibrational frequencies (cm<sup>-1</sup>)

vibrational frequencies	Experimental (cm <sup>-1</sup> )	B3LYP/HF 6-311G++(d,p)	
	IR	Scaled B3LYP	Scaled HF
v (NH)	3315	3556	3556
v (C=O)	1726, 1702	1760	1777
v (C=N)	1613	1576	1679
v (COO)	1197	1333	1357

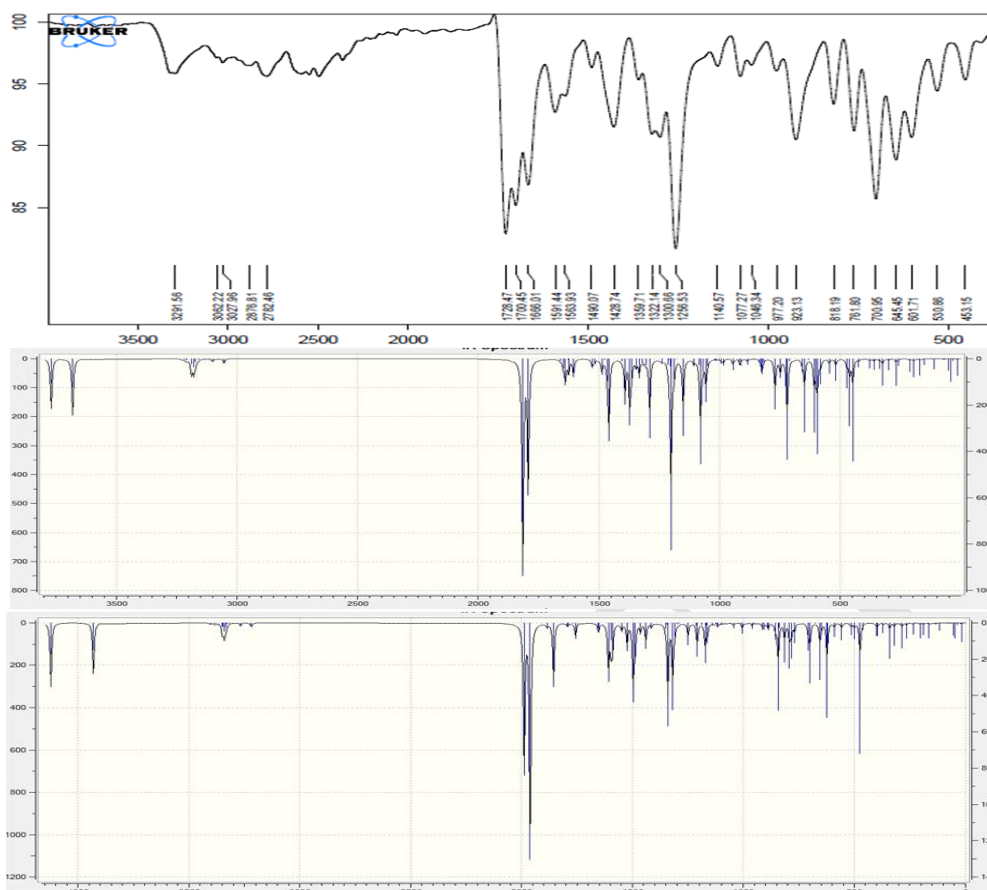


Figure 3. Experimental Theoretical IR spectrums simulated with B3LYP/HF 6-311G ++(d,p)

## Molecular Geometry

The molecular geometric parameters such as bond angles, Mulliken atomic charges, bond lengths calculated by using the HF method and B3LYP functionals in DFT method with 6-311G++(d,p) basis set and data are summarized in Table 4-6. According to this result, the highest bond length is between C(10)-C(11) atoms that this values are 1.522/1.520 Å for B3LYP/HF 6-311G++(d,p). Besides, respectively, the bond lengths in the triazole ring N32-N33, N32-C1, C2-O36, C2-N34, N34-C1 are calculated 1,379/1.369; 1,296/1.297; 1.213/1,194; 1.422/1.389 Å for B3LYP/HF 6-311G++(d,p) basis sets (table 4). In the literature, the N-N, N=C, C=O bond lengths are measured as 1.404 , 1.280, 1.212 Å (Ocak et al., 2003; Ustabaş et al., 2007). The calculated bond length values are consistent with literature values.

The highest bond angle is between N33-C2-O36 atoms, which is 130.110/129.555° for B3LYP/HF 6-311G++(d,p) basis sets (table 5). The calculated Mulliken atomic charges (Mulliken, 1955) calculated by using the HF and B3LYP methods with 6-311G++(d,p) basis sets. The electronegative oxygen (O) and nitrogen (N) atoms have negative atomic charge values. The carbon atoms surrounded by electronegative atoms have negative atomic charge values. The C1 atom surrounded by two electronegative atoms (N32, N34) and C2 atom which is surrounded by three electronegative atoms (N33, N34, O36) have negative charges values. All hydrogen atoms of the compound (H18-H31) have positive atomic charge values (table 6).

Table 4. The calculated bond lengths with B3LYP/ HF 6-311G ++(d,p)

Bond Lengths	DFT	HF	Bond Lengths	DFT	HF
C(1)-N(32)	1.296	1.297	C(15)-H(29)	1.084	1.075
C(1)-N(34)	1.387	1.377	C(15)-C(16)	1.392	1.383
C(1)-C(10)	1.492	1.495	C(16)-H(30)	1.084	1.075
N(32)-N(33)	1.379	1.369	N(35)-C(3)	1.285	1.256
N(33)-H(18)	1.005	0.990	C(3)-H(19)	1.081	1.070
N(33)-C(2)	1.370	1.347	C(3)-C(4)	1.475	1.487
C(2)-N(34)	1.422	1.389	C(4)-C(5)	1.402	1.389
C(2)-O(36)	1.213	1.194	C(5)-H(20)	1.082	1.072
N(34)-N(35)	1.368	1.365	C(5)-C(6)	1.387	1.382

C(10)-H(24)	1.093	1.083	C(6)-H(21)	1.084	1.075
C(10)-H(25)	1.091	1.082	C(6)-C(7)	1.393	1.382
C(10)-C(11)	1.522	1.520	C(7)-H(22)	1.083	1.074
C(11)-C(12)	1.396	1.386	C(7)-C(8)	1.388	1.381
C(12)-H(26)	1.084	1.075	C(8)-H(23)	1.081	1.071
C(12)-C(13)	1.394	1.386	C(8)-C(9)	1.401	1.389
C(13)-H(27)	1.084	1.075	C(9)-C(17)	1.490	1.491
C(13)-C(14)	1.392	1.383	C(17)-O(37)	1.208	1.184
C(14)-H(28)	1.084	1.075	C(17)-O(38)	1.356	1.327
C(14)-C(15)	1.393	1.385	O(38)-H(31)	0.968	0.945

**Table 5.** The calculated bond angles with B3LYP/ HF 6-311G++(d,p)

Bond Angles	B3LYP	HF	Bond Angles	B3LYP	HF
N(32)-C(1)-N(34)	111.411	111.318	H(29)-C(15)-C(16)	119.730	119.728
N(32)-N(33)-H(18)	120.469	121.018	H(30)-C(16)-C(11)	119.383	119.566
H(18)-N(33)-C(2)	125.090	125.289	C(1)-N(34)-C(2)	108.276	108.121
N(33)-C(2)-O(36)	130.110	129.555	N(34)-N(35)-C(3)	118.851	119.194
O(36)-C(2)-N(34)	128.819	128.646	N(35)-C(3)-H(19)	122.645	123.008
N(33)-C(2)-N(34)	101.069	101.797	H(19)-C(3)-C(4)	119.521	119.123
N(34)-C(1)-C(10)	124.031	124.050	C(3)-C(4)-C(5)	118.828	118.422
C(1)-C(10)-H(24)	106.274	106.237	C(3)-C(4)-C(9)	122.765	122.853
C(1)-C(10)-H(25)	109.127	108.920	C(4)-C(5)-H(20)	118.151	118.772
H(24)-C(10)-C(11)	109.800	109.854	H(20)-C(5)-C(6)	120.518	120.244
H(25)-C(10)-C(11)	109.493	109.852	C(4)-C(5)-C(6)	121.321	120.980
C(1)-C(10)-C(11)	114.083	113.705	C(5)-C(6)-H(21)	119.691	119.594
H(24)-C(10)-H(25)	107.852	108.076	H(21)-C(6)-C(7)	120.184	120.180
C(10)-C(11)-C(12)	120.626	120.650	C(5)-C(6)-C(7)	119.556	120.233
C(11)-C(12)-H(26)	119.471	119.655	C(6)-C(7)-H(22)	120.478	120.518
H(26)-C(12)-C(13)	119.844	119.695	H(22)-C(7)-C(8)	119.965	119.970
C(12)-C(13)-H(27)	119.777	119.718	C(7)-C(8)-H(23)	120.251	120.031
H(27)-C(13)-C(14)	120.100	120.106	H(23)-C(8)-C(9)	118.776	119.206
C(13)-C(14)-C(15)	119.563	119.529	C(7)-C(8)-C(9)	120.968	119.125
C(13)-C(14)-H(28)	120.228	120.264	C(9)-C(17)-O(37)	125.982	125.082
H(28)-C(14)-C(15)	120.209	120.207	O(37)-C(17)-O(38)	121.386	121.708
C(14)-C(15)-H(29)	120.057	120.074	C(17)-O(38)-H(31)	105.838	107.881

**Table 6.** The calculated mulliken charges datas B3LYP/ HF 6-311G++(d,p)

	DFT	HF		DFT	HF
<b>C1</b>	0.353	0.484	<b>H20</b>	0.130	0.133
<b>C2</b>	0.531	0.722	<b>H21</b>	0.103	0.109
<b>C3</b>	0.115	0.192	<b>H22</b>	0.103	0.107
<b>C4</b>	-0.086	-0.073	<b>H23</b>	0.113	0.123
<b>C5</b>	-0.037	-0.054	<b>H24</b>	0.152	0.151
<b>C6</b>	-0.084	-0.068	<b>H25</b>	0.136	0.137
<b>C7</b>	-0.080	-0.088	<b>H26</b>	0.088	0.093
<b>C8</b>	-0.021	-0.010	<b>H27</b>	0.093	0.097
<b>C9</b>	-0.163	-0.238	<b>H28</b>	0.095	0.098
<b>C10</b>	-0.154	-0.117	<b>H29</b>	0.096	0.097
<b>C11</b>	-0.116	-0.138	<b>H30</b>	0.101	0.093
<b>C12</b>	-0.073	-0.091	<b>H31</b>	0.257	0.281
<b>C13</b>	-0.098	-0.085	<b>N32</b>	-0.218	-0.282
<b>C14</b>	-0.087	-0.104	<b>N33</b>	-0.313	-0.380
<b>C15</b>	-0.090	-0.077	<b>N34</b>	-0.383	-0.497
<b>C16</b>	-0.039	-0.064	<b>N35</b>	-0.196	-0.234
<b>C17</b>	0.398	0.611	<b>O36</b>	-0.376	-0.521
<b>H18</b>	0.251	0.256	<b>O37</b>	-0.333	-0.456
<b>H19</b>	0.165	0.186	<b>O38</b>	-0.333	-0.423



### Frontier molecular orbital analysis

Frontier molecular orbitals (FMO) designated kinetic stability, the electronic transitions, electric and optical properties (Fukui, 1982). HOMO-LUMO energy values of compound was calculated with three computational levels and these values are 4.147/10.776 e.v. for B3LYP/HF basis sets (figure 4). Using HOMO-LUMO energy gap electron affinity (A), global hardness ( $\eta$ ), electronegativity ( $\chi$ ), chemical potential ( $\mu$ ), softness (S), ionization potential (I), chemical potential (Pi), electrophilic index( $\omega$ ), Nucleophilic index (IP) for the compound was calculated and are showed in table 7.

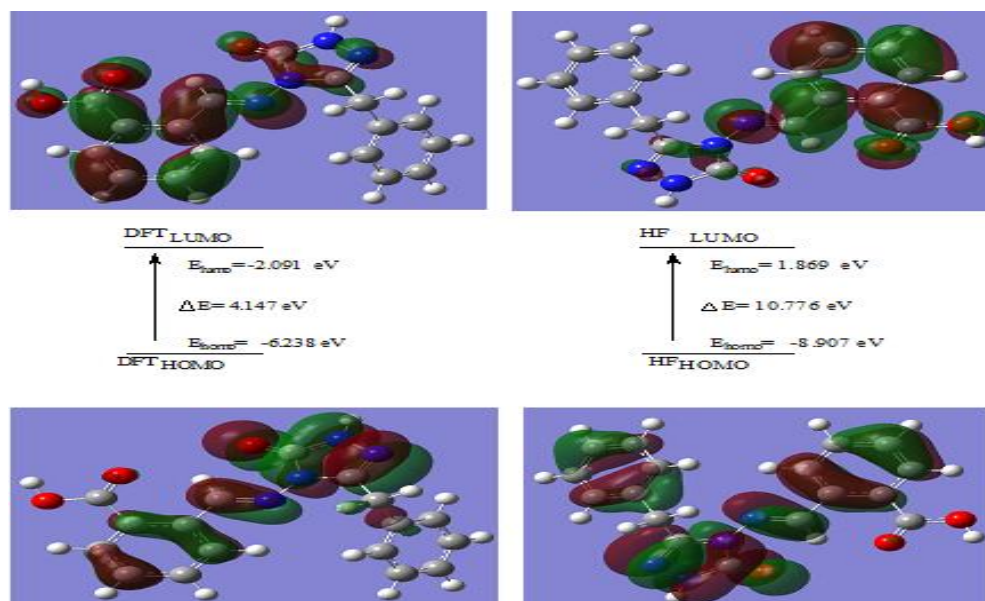


Figure 4. HOMO-LUMO energy of the molecule (6-311G++(d,p))

Table 7. The calculated electronic structure parameters of the molecule

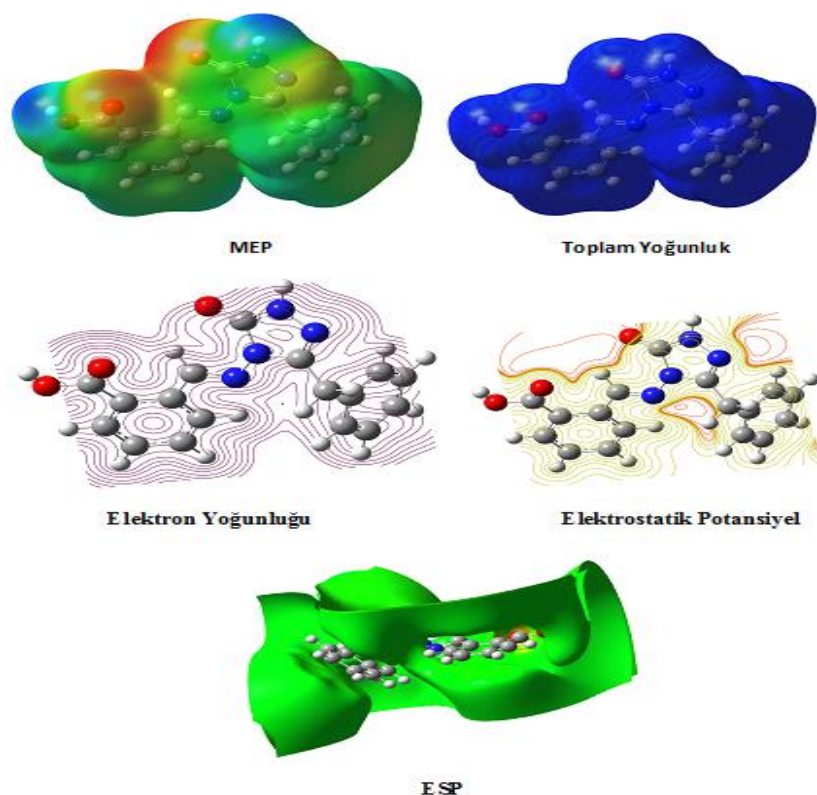
		Hatree	ev	kcal/mol	KJ/mol
	LUMO	-0,07685	-2,09114	-48,2236	-201,77
	HOMO	-0,22926	-6,23833	-143,861	-601,922
A	elektron ilgisi	0,07685	2,09114	48,2236	201,77
I	iyonlaşma potansiyeli	0,22926	6,23833	143,861	601,922
ΔE	energy gap	0,15241	4,14718	95,6377	400,152
χ	electronegativity	0,153055	4,16473	96,0425	401,846
Pi	chemical potential	-0,153055	-4,16473	-96,0425	-401,846
ω	electrophilic index	0,000892583	0,02429	0,5601	2,34348
IP	Nucleophilic index	-0,01166356	-0,31737	-7,31892	-30,6227
S	molecular softness	13,1225	357,072	8234,41	34453,1
η	molecular hardness	0,076205	2,07359	47,8189	200,076

Table 8. The calculated dipole moments datas of the molecule

	μ <sub>x</sub>	μ <sub>y</sub>	μ <sub>z</sub>	μ <sub>Toplam</sub>
Dft	-3.7616	1.6815	2.1200	4.6337
Hf	-4.2502	2.3556	2.2943	5.3737

Table 9. The calculated total energy datas of the molecule

Energy(a.u.)	B3lyp	Hf
	-1101.18759	-1094.54518



**Figure 5.** The calculated molecular surfaces of the molecule

### Thermodynamics properties

Thermodynamics parameters were calculated with (B3LYP) functionals in DFT method and HF method at the 6-311G++(d,p) basis set at 298.150 K and under 1 atm pressure.

**Table 10.** The calculated thermodynamics parameters of the molecule

Rotational temperatures (Kelvin)	DFT	HF
A	0.01619	0.01638
B	0.00763	0.00774
C	0.00549	0.00561
Rotational constants (GHZ)		
A	0.33734	0.34129
B	0.15903	0.16123
C	0.11447	0.11698
Thermal Energies E(kcal/mol)		
Translational	0.889	0.889
Rotational	0.889	0.889
Vibrational	192.772	205.817
Total	194.550	207.595
Thermal Capacity CV(cal/mol-K)		
Translational	2.981	2.981
Rotational	2.981	2.981
Vibrational	70.867	65.277
Total	76.828	71.239
Entropy S(cal/mol-K)		
Translational	43.205	43.205
Rotational	35.214	35.167
Vibrational	76.489	71.022
Total	154.908	149.394
Zero-point correction (Hartree/Particle)	0.289965	0.311966
Thermal correction to Energy	0.310035	0.330823
Thermal correction to Enthalpy	0.310979	0.331767
Thermal correction to Gibbs Free Energy	0.237377	0.260785
Sum of electronic and zero-point Energies	-1100.897632	-1094.233162
Sum of electronic and thermal Energies	-1100.877562	-1094.214304
Sum of electronic and thermal Enthalpies	-1100.876618	-1094.213360
Sum of electronic and thermal Free Energies	-1100.950220	-1094.284342
Zero-point vibrational energy (Kcal/mol)	181.95598	195.76144

## CONCLUSION

In this work, spectroscopic, electronic and geometric parameters of molecule are calculated by HF and B3LYP functionals of DFT method with the 6-311G++(d,p) basis sets at the program package Gaussian G09W. FT-IR vibrational frequencies and spectrums were obtained. The FT-IR data was found positive. This result showed that the structure of the compound was stable. The chemical shifts in the calculations FT-IR and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR vibrational frequencies are found to be compatible with the experimental data. Theoretical and experimental proton-carbon chemical shifts ratios between according to a, b values and R<sup>2</sup> linear a correlation were observed. Obtained spectroscopic parameters are compared with experimental data and with each other. In addition, the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) and the highest occupied molecular orbital (HOMO), bond angles, bond lengths, Mulliken charges, E<sub>LUMO</sub>-E<sub>HOMO</sub> energy gap ( $\Delta E_g$ ), electronic parameters, thermodynamics properties, dipole moments, total energy were calculated with different methods and 6-311G++(d,p) basis set. Result, obtained all data basis set were compared and these values were consistent with each other.

## REFERENCES

- Asiri A.M & Khan S.A. 2013. *J. Photochem Photobiol B*, 120, 82.
- Aydogan F., Ocal N., Turgut Z., Yolacan C. 2001. Transformations of aldimines derived from pyrrole-2-carboxaldehyde. Synthesis of thiazolidino-fused compounds, *Bull. Korean Chem. Soc* 22 (5), 476-480.
- Azam F., Singh S., Khokhra S.L., Prakash O. 2007. Synthesis of Schiff bases of naphtha [1, 2d] thiazol-2-amine and metal complexes of 2-(20-hydroxy) benzylideneaminonaphthothiazole as potential antimicrobial agents, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8 (6), 446-452.
- Dash B., Mahapatra P.K., Panda D., Patnaik J.M. 1984. *J. Indian Chem.Soc.*, 61, 1061.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Mennucci B., Petersson G.A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X. et al. 2009. *Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT.*
- Fukui K., Yonezawa T., Shingu H.J. 1952. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons, *J. Chem. Phys.* 20, 722-725.
- GaussView 5.0, *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2009.
- Jamróz M.H. (2004). Vibrational Energy Distribution Analysis: VEDA 4 program, Warsaw.
- Ma D-Y., Zhang L-Y., Wu T-L., Li D-H., Xie X-Q., Guo H-F., Qin L. 2016. *J. Coord Chem*, 66,3261.
- Merrick J.P., Moran D., Radom L. 2007. An Evaluation of Harmonic Vibrational Frequency Scale Factors. *Journal of Physical Chemistry*, 111(45), 11683-11700.
- Mulliken R.S. 1955. Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions I. *J. Chem Phys.* 23, 1833-1840.
- Nair R., Shah A., Baluja S. 2006. *J. Serb Chem*, 71, 733.
- Ocak N., Çoruh U., Kahveci B., Şaşmaz S., Vazquez-Lopez EM., Erdönmez A. 2003. 1- Acetyl-3-(p-chlorobenzyl)-4-(p- chlorobenzylidenamino)- 4,5-dihydro-1H-1, 2, 4- triazol-5-one. *Acta Cryst. Sec. E*. 59(6), 750-752.
- Ustabas R., Çoruh U., Sancak K., Ünver Y., Vazquez-Lopez EM. 2007. 1-(benzoylmethyl)-4-[(2,4-dichlorobenzylidene)amino]-3-(2- thienylmethyl)4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one. *Acta Cryst. Sec. E*. 63, 2982- 3051.
- Wang M., Wang L.F., Li Y.Z., Li Q.X., Xu Z.D., Qu D.M. 2001. *Trans Met. Chem*, 26, 307.
- Wolinski K. Hilton J.F. and Pulay P.J. *Am. Chem. Soc.*, 1990. 112, 512.
- Xia Z.P., Wang X.D., Wang P.F., Zhou Y., Zhang J.W., Zhang L., Zhou J., Zhou S.S., Ouyang H., Lin X.Y., Mustapa M., Reyinbaike A., Zhu H.L. 2014. *Eur. J. Med. Chem.*, 80, 92-100.
- Yadav L.D.S., Singh S. 2001. *Indian J. Chem.*, 40 B, 440.
- Yüksek H., Akdeniz F., Bahçeci Ş. 2006. Bazı Potansiyel biyolojik aktif 4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on Türevlerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması. Kimya 2006, XX. Ulusal Kimya Kongresi, Kayseri, Bildiri Özetleri Kitabı, OKS-03.

## Aydın ilinden izole edilmiş termofilik bakterilerde selülag enzim aktivitelerinin tayini

Mehmet AYTAR<sup>1\*</sup>, Sinem EVLİ<sup>2</sup>, Bülent BOZDOĞAN<sup>3,4</sup>, Gamze BAŞBÜLBÜL<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, AYDIN, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, AYDIN, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, REDPROM Araştırma Merkezi, AYDIN, TÜRKİYE

<sup>4</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, AYDIN, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: maytar90@gmail.com

### Özet

Günümüzde termofilik mikroorganizmalardan üretilen enzimler ekstrem koşullardaki uygulamalar için oldukça önemlidir. Bu enzimlerden biri olan selülag, selülagu hidrolize edebilen bir enzimdir ve endüstride; deterjan katkısında, toner uzaklaştırmada, biyotaylamada, yem sanayinde, biyodizel ve biyoetanol üretiminde ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Selülag  $\beta$ -1,4 bağlarıyla birbirlerine bağlı glikoz ünitelerinden oluşmaktadır. Selülag enzimleri üç ana enzim tipinden oluşmaktadır: Endoglukanazlar, Sellobiyohidrolazlar,  $\beta$  Glikozidazlar. Bu çalışmada, Aydın ilinden izole edilmiş termofilik, endospor oluşturan bakterilerde bir selülag enzimi olan  $\beta$ -1,4 endoglukanazın nitel ve nicel olarak aktivite tayini yapılmıştır. Substrat olarak CMC (karboksimetil selülag) kullanılmıştır.

Agar spot yöntemi kullanılarak kolleksiyonumuzda bulunan 102 termofilik bakteri izolatında selülag aktivitesi CMClı besiyerinde kalitatif olarak tayin edilmiştir. Zon oluşumu görülen 49 pozitif izolat Triptik Soy Broth'a ekilerek 50 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Petride en büyük zon oluşturan 30 izolatın selülag enzim aktivitesine Dinitrosalisilik Asit(DNS) yöntemi ile bakılmıştır. 50 °C'de 5 dk boyunca birlikte inkübe edilen süpernatantlar ve %2 lik CMC örneklerinin 540nm'de absorbansları ölçülmüştür. Enzim aktivitesi ile ilgili ölçülen değerlerin pozitif yakın ve pozitif değerin üstünde olduğu saptanmıştır. (Enzim-substrat ilişkisinden oluşan ürün olan glukoz), CMC, maltoz ve glukoz ile karşılaştırmalı şekilde ince tabaka kromatografisi yapılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda kullandığımız termofilik bakteriler farklı aktivitelere sahip ekstrasellüler selülag enzimi üretimine sahiptir ve endüstriyel kullanım için potansiyel taşımaktadırlar.

**Anahtar Kelimeler:** Termofilik bakteri, Selülag,  $\beta$ -1,4 endoglukanaz, Karboksimetil selülag(CMC)

### Abstract

Today, enzymes produced by the thermophilic microorganisms are important for the application of extreme conditions. Cellulase is one of these enzymes that can hydrolyze cellulose. It is used as a detergent additive, removing toner, biostoning, food industry, producing biodiesel and bioethanol at the industries. Cellulose consists of glucose units that are bonded together by  $\beta$ -1,4 bond. Cellulases consist of three main enzymes: endoglucanases, cellobiohydrolases and  $\beta$ -glucosidases.

In this study, thermophilic bacteria that have endospores were isolated from Aydın province. The activity of  $\beta$ -1,4 glucanase enzyme was measured both as qualitative and quantitative. CMC (carboxymethyl cellulose) was used as a substrate.

Cellulase activity was determined as qualitative on CMC media by using agar spot method with 102 thermophilic bacteria from our sample collected. 49 positive isolates that consist of zones were incubated by inoculating it into TSB (tryptic soy broth) at 50 °C overnight. On the solid media, activity of enzyme of 30 isolates having bigger zone diameter was measured using DNS (dinitrosalisylic acid) method. The crude enzymes and substrate (%2 CMC) were incubated for 5 minutes at 50 °C simultaneously.

Their absorbances were measured at 540 nm on the spectrophotometer machine. Values that were measured dealing with enzyme activity are both near the absorbance value of the positive sample and some are distance away. (Glucose that is produced from enzyme-substrate reaction), CMC, maltose and glucose have been used comparatively for thin layer chromatography.

As a result, the thermophilic bacteria that we used in this study consist of extracellular cellulase enzyme products that are of different enzyme activity. However, they have the potentials for industrial applications.

**Keywords:** Thermophilic Bacteria, Cellulase,  $\beta$ -1,4 glucanase, CMC (carboxymethyl cellulose)

## GİRİŞ

Termofilik mikroorganizmalar ılımlı termofiller (45-65 °C) ve hipertermofiller (85 °C) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bakterilerin ürettiği enzimler bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre daha stabil, fazla üretilebilir ve ucuz olarak elde edilmektedirler. Termostimler, termofilik olmayanlara nazaran protein yapısı bakımından daha stabildir. Termofilik olmayanlar protein konformasyonu açısından esnek bir yapıya sahiptir. Bu yüzden termofilik enzimler ekstrem şartlarda mukavemetini, stabilitesini rahatlıkla koruyabilmektedir. Ayrıca ekstremofilik enzimlerin endüstriyel işlemlerde kullanılması yüksek sıcaklıkta bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini azaltmaktadır (Bruins, 2001; Güven, 2011).

Pek çok bakteri ve fungus selülozu deşredere edebilmektedir. Doğada selülozik biokütlenin deşredasyonu selülaş olarak bilinen hidrolitik enzimlerin karışımı ile gerçekleşmektedir. Selülaşlar, endo etkili (endoglukanaşlar) ve ekzo etkili (sellobiyohidrolaşlar) enzimlerdir. Bu enzimler biyokütle parçalayıcı mikroplarda sinerjistik bir şekilde çalışmaktadır (Dashtban ve ark., 2009; Dashtban ve ark., 2010). Selülaş enzimleri üç ana enzim tipinden oluşmaktadır: Endoglukanaşlar, Sellobiyohidrolaşlar,  $\beta$  Glikozidaşlar (Criquet, 2002).

Bu enzimlerin substratı olan selüloşlar  $\beta$ -1,4 glukozidik bağlarıyla birbirine bağlı anhidroglukopiranoş moleküllerinin lineer polimerleridir. Hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, Van der waal's kuvvetleri tarafından ayarlanmış selüloş zinciri çiftlemeleri, mikrofibril olarak bilinen kristalin yapıların paralel dizilenmesini sağlamaktadır (Dashtban ve ark., 2009).

Selülaş enzim aktivitesini tespit etmede kullanılan yöntemler, farklı çalışmalar ile sınıflandırılmıştır. Sharrock, selülaş çalışmalarını iki farklı yaklaşım içinde gruplandırmıştır: (1) Bireysel selülaş aktivitesi belirleme (endoglukanaşlar, ekzoglukanaşlar,  $\beta$  glukosidaşlar) ve (2) Ham selülaş sisteminin total hidroliz aktivitesinin ölçümüdür. (Sharrock, 1988). Halbuki Zhang ve ark., bütün selülaş enzimi aktivitesi çalışmalarını üç ana grupta sınıflandırmışlardır: (1) hidroliz sonrası ürünlerin birikiminin hedeflendiği çalışmalar, (2) substrat miktarındaki düşüşün izlendiği çalışmalar ve (3) substratın fiziksel özelliklerindeki değişimin ölçüldüğü çalışmalar (Zhang ve ark., 2006). Selüloş-selülaş sistemlerinin karmaşıklığı yüzünden ve başlangıç hidroliz reaksiyonunun kinetik özellikleri ile hidroliz süreleri arasındaki farklar yüzündendir ki, selülaş aktivite analizleri ya ilk hidroliz hızına dayanarak yapılmaktadır ya da son nokta hidrolizini kullanarak ifade edilmektedir. İlki, kısa sürede bireysel selülaş aktivitesini ölçerken tercih edilmektedir. Ancak sonucusu, belli zaman içindeki total enzim aktivitesi için tercih edilen bir yöntemdir (Wu ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2006).

Selülaş aktivitesi temel olarak selüloş hidroliz aktivitelerinin son ürünlerini ölçmek için indirgeyici şeker tayini kullanılarak değerlendirilmektedir. Bu yüzden, böyle tayinlerin sonuçları tipik bir şekilde enzimlerin hidroliz kapasitesi olarak ifade edilmektedir (Wu ve ark., 2006).

Bu çalışmada, selülaş enzimi olan  $\beta$ -1,4 endoglukanaşın aktivite ölçümü için CMC substratı kullanılmıştır ve spektrofotometrik olarak absorbanş ölçümleri yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan malzemeler şu şekilde sıralanmıştır: TSB (tryptic soy broth) besi yeri, kongo red boyası, DNS (dinitrosalisilik asit), CMC (karboksimetil selüloş), maltoş, glukoz, NaCl, distile su, santrifüjleme cihazı, spektrofotometre cihazı, etüv, ependorf, otomatik pipet, su banyosu, 96'lık plaka, ince tabaka kromatografisi, bütanol, sülfürik asit, çeker ocak.

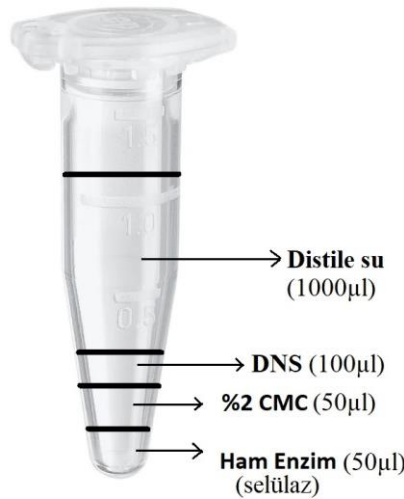
### Enzim aktivitesinin nitel olarak belirlenmesi

Çalışmamızda 102 termofilik bakteri kullanılmıştır. Bakteriler CMC'li agar besiyerinde 50 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petriyeler %0,1'lik kongo red boyası ile 15-20dk muamele edilmiştir. Sonra 1M NaCl ile 15-20dk boyunca yıkanmıştır. Çoğu araştırmacı selülaş aktivitesi görüntüleme için CMC yöntemini kullanmışlardır (Kasana ve ark., 2008; Rathore ve ark., 2014). İşlem sonunda zon oluşumu görüldüğü için selülaş enzim aktivitesi

bakımından pozitif olan 49 izolat seçilmiştir. Bunlar arasından büyük zon çapına sahip olan 30 izolat enzim aktivitelerine nicel olarak bakmak için ayrılmıştır.

### Enzim aktivitesinin nicel olarak belirlenmesi

Büyük zon çapına sahip 30 izolat 5ml TSB içine inokule edilmiştir ve 50°C’de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir izolattan 1ml alınarak steril ependorflara konulmuş ve 10000xg’de 1dk santrifüj edilmiştir. Ekstraselüler üretilen ham selüloz enzimi olarak süpernatant alınmıştır. Her bir izolattan 50µl ham enzim ile substrat (%2 CMC) 50µl ayrı bir ependorfa alınarak enzim-substrat reaksiyonu 5dk boyunca 50°C’de inkübe edilmiştir. Sonra oluşan ürünün (glukoz) spektrofotometrik olarak ölçülebilmesi için ependorfa 100µl DNS eklenerek 5dk kaynar suda bekletilmiştir ve renk değişimi gözlenmiştir. Glukoz ürünü görünür hale geldikten sonra her bir ependorfa 1ml distile su eklenmiştir (şekil 1). Spektrofotometrik olarak ölçüm için 96’lık plakaya 200’er µl yüklenmiştir. Her bir örnek iki tekrarlı olacak şekilde ayarlanmıştır. Pozitif (glukoz 4mg/ml) ve negatif (kör) kontrol eklenmiştir. Bütün örnekler plakaya yüklendikten sonra 540nm’de absorbans ölçümü spektrofometre cihazında yapılmıştır (şekil 2).



Şekil 13 Enzim substrat reaksiyonu ve DNS yöntemi için kullanılan metod



Şekil 14 DNS yöntemi ile renk oluşumu ve 96’lık plakada absorbans ölçümü

Selüloz aktivitesi ölçümü için CMC substratı kullanılmıştır. DNS metodu ile absorbans ölçümü yapılmış ve oluşan ürün olan glukozun konsantrasyonu kullanılarak enzim aktivitesi U/ml cinsinden hesaplanmıştır (Ghose, 1987; Koç, 2015). Enzim aktivitesi ölçümü için enzimden 50µl substrattan (CMC) 50µl kullanılmıştır (Potprommanee ve ark., 2017), (şekil 1).

## İnce Tabaka Kromatografisi

Selülazın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizini belirlemek için ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. İnce tabaka plaklarının (Alugram® Sil G/UV 254 0,2mm, 5x10 cm, Germany) alt kısmından 0,5 cm'lik bir boşluk olacak şekilde çizgi çizilmiştir. Sonra glukoz (1 mg/mL), maltoz (1 mg/mL), CMC (1 mg/ml) ve selülaz enzimi ile hidroliz edilmiş CMC çözeltisi örneklerinden 10 µL alınarak birer santim aralıklarla plaklara uygulanmıştır ve havada kurutulmuştur. Hareketli faz için n-bütanol:etanol:su (5:3:2) karışımı hazırlanmıştır. İnce tabaka kromatografi tankına (eni:25 cm, boyu 50 cm) (Sigma, Germany) bu karışımdan 15 ml eklendikten sonra kurutulan plaklar tanka yerleştirilmiştir, örneklerin yürütülmesi sağlanmıştır. Yürütme işleminden sonra plaklar havada kurutulmuştur. Boyama işlemi için sülfirik asit:metanol (1:9) karışımında hazırlanmış % 0,2'lik ornisol kullanılmıştır. Sonra plaklar üzerine boya çözeltisi püskürtülüp 100°C'lik etüvde 10 dk tutularak renk değişimi gözlenmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Enzim Aktivitesi Ölçümü

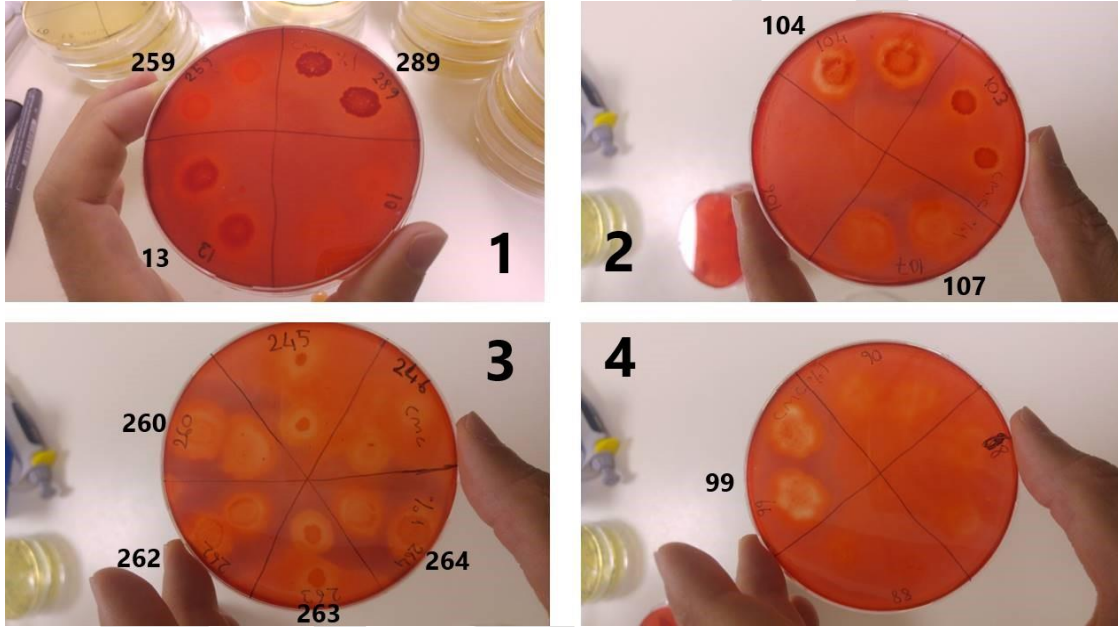
Yapılan çalışmada, 102 termofilik bakteri kullanılmıştır. CMC'li agar besiyerinde selülaz enzim aktivitesi bakımından pozitif olan 49 izolat seçilmiştir. Bunlar arasından büyük zon çapına sahip olan 30 izolat enzim aktivitelerine bakmak için ayrılmıştır.

Tablo 15 Selülaz enzimi aktivitesi tespit edilmiş zon çapları

Suş No	Koloni Çapı	Zone Çapı	Fark
HBB-13	0,9	1,3	0,4
HBB-20	1,2	1,9	0,7
HBB-21	1,3	2	0,7
HBB-24	1,2	1,6	0,4
HBB-30	0,9	1,2	0,3
HBB-32	1,8	2	0,2
HBB-78	1,6	1,9	0,3
HBB-91	1	1,6	0,6
HBB-94	1,2	1,5	0,3
HBB-99	1,3	2,1	0,8
HBB-104	1,2	1,8	0,6
HBB-107	1,3	2	0,7
HBB-111	1	1,5	0,5
HBB-124	1,4	2	0,6
HBB-126	0,9	1,3	0,4
HBB-128	1,2	1,8	0,6
HBB-129	1,1	1,5	0,4
HBB-175	0,8	1,2	0,4
HBB-197	0,8	1,4	0,6
HBB-198	1,3	2,1	0,8
HBB-259	0,9	1,3	0,4
HBB-260	1,2	1,9	0,7
HBB-261	1,2	1,7	0,5

HBB-262	0,9	1,5	0,6
HBB-264	1	1,8	0,8
HBB-265	0,9	1,5	0,6
HBB-284	0,9	1,3	0,4
HBB-286	0,9	1,4	0,5
HBB-288	0,8	1,1	0,3
HBB-289	1,1	1,3	0,2

Kongo red boyama metodu ile tespit edilen enzim aktiviteleri zon çapı açısından değerlendirildiğinde en yüksek aktiviteye sahip suş 0,8cm zon farkı ile HBB-99 nolu termofilik bakteri suşudur. Diğer suşların zon çapları yukarıdaki tabloda görülmektedir (Tablo 1). Bütün suşların total zon çapı ile koloni çapı ölçülmüştür ve aradaki fark hesaplanmıştır. Bu farkın büyüklüğü enzim aktivitesinin yüksekliği olarak kabul edilebilmektedir.



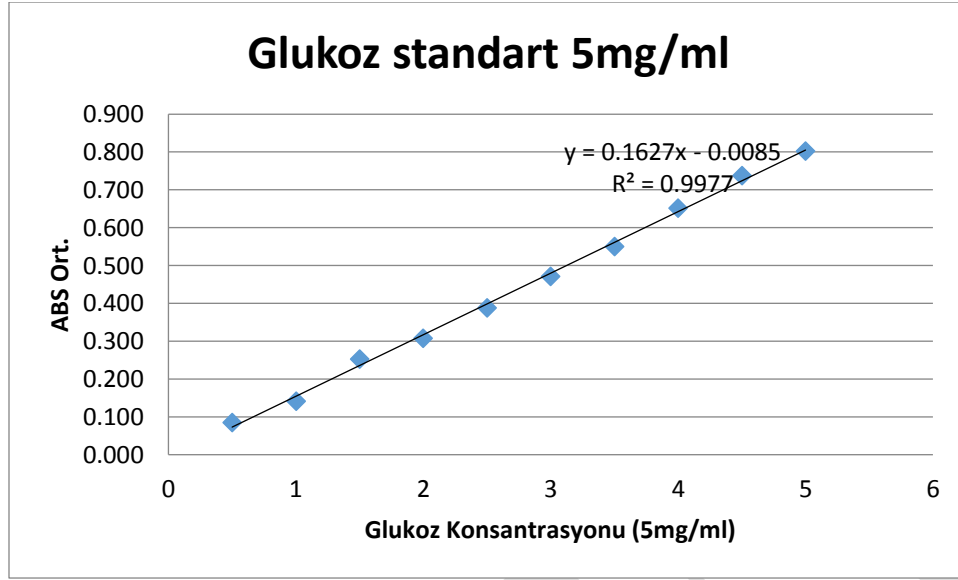
Şekil 15 Selülaz aktivitesine sahip izolatların CMC'li agardaki zon oluşumu

Kongo red ile 15-20dk boyama ve 1M NaCl ile 15-20dk yıkama işleminden sonra oluşan zon şekil 3'de görülmektedir.

Enzim aktivitesini nicel olarak ölçmek için yukarıda bahsedilen ve uygulanan yöntem sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

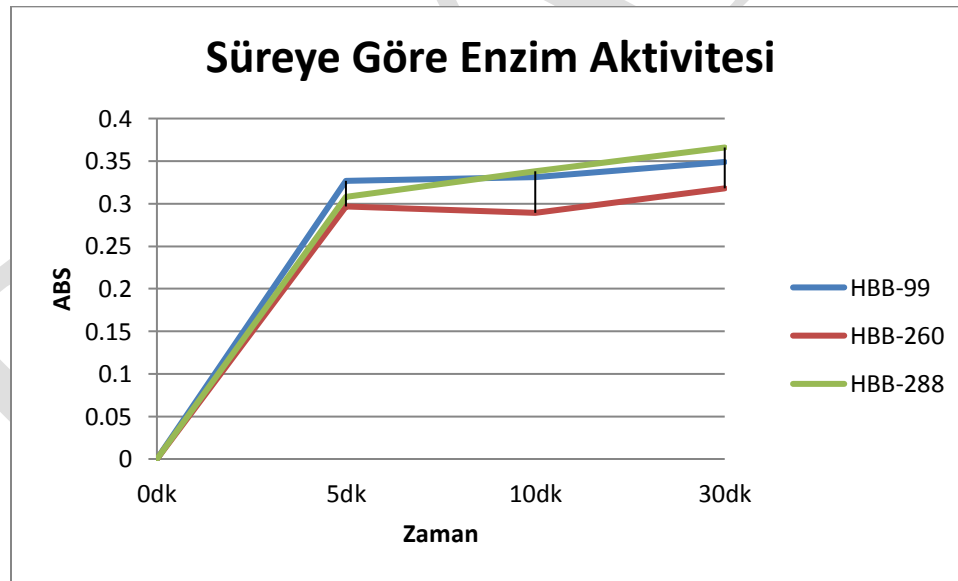


Tablo 16 Glukoz standart grafiği



Glukoz standart grafiği 5mg/ml glukoz çözeltilerinden 500-5000 arası konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak DNS yöntemi ile spektrofotometrede 540 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır ve ABS-Glukoz konsantrasyonu standart grafiği çizilmiştir (Tablo 2).

Tablo 17 Süreye Göre Enzim Aktivitesi Grafiği



Çalışmamızda kullanılan izolatların ürettikleri ham selüloz enzimlerinin hangi sürede aktivite gösterdiğini tespit etmek için HBB-99, HBB-260 ve HBB-288 suşlarının 5-10-30dk sürelerde gösterdikleri enzim aktivitesi absorbans değerlerine bakılmıştır. Bu değerler arasında kayda değer bir fark olmadığı için bütün izolatların enzim aktivitelerinin tespiti için enzim-substrat reaksiyon süresi 5dk olarak belirlenmiştir (Tablo 3).

**Tablo 18 Suşların enzim aktivitelerinin; zon çapı, glukoz konsantrasyonları ve volüm aktivitesi açısından karşılaştırılması**

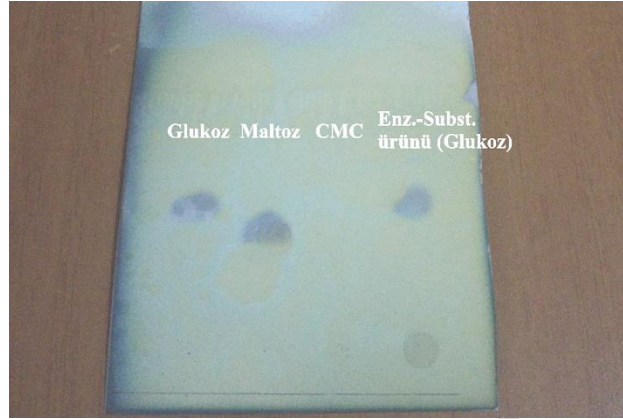
Suş No	Zon Farkı(cm)	ABS Ort.	mg/ml (glukoz)	µM/ml(glukoz)	Volüm Aktivite u/ml
HBB-13	0,4	0,103	0,69	3,80	1,52
HBB-20	0,7	0,284	1,80	9,98	3,99
HBB-21	0,7	0,341	2,15	11,92	4,77
HBB-24	0,4	0,132	0,86	4,79	1,92
HBB-30	0,3	0,195	1,25	6,94	2,78
HBB-32	0,2	0,032	0,25	1,38	0,55
HBB-78	0,3	0,081	0,55	3,04	1,21
HBB-91	0,6	0,314	1,98	10,99	4,39
HBB-94	0,3	0,080	0,54	3,00	1,20
HBB-99	0,8	0,354	2,23	12,37	4,95
HBB-104	0,6	0,325	2,05	11,38	4,55
HBB-107	0,7	0,298	1,88	10,44	4,18
HBB-111	0,5	0,256	1,62	9,01	3,60
HBB-124	0,6	0,293	1,85	10,27	4,11
HBB-126	0,4	0,176	1,13	6,29	2,52
HBB-128	0,6	0,255	1,62	8,99	3,60
HBB-129	0,4	0,240	1,53	8,48	3,39
HBB-175	0,4	0,303	1,91	10,63	4,25
HBB-197	0,6	0,287	1,82	10,08	4,03
HBB-198	0,8	0,333	2,10	11,63	4,65
HBB-259	0,4	0,270	1,71	9,50	3,80
HBB-260	0,7	0,294	1,86	10,32	4,13
HBB-261	0,5	0,319	2,01	11,16	4,46
HBB-262	0,6	0,284	1,79	9,96	3,98
HBB-264	0,8	0,307	1,94	10,75	4,30
HBB-265	0,6	0,337	2,12	11,79	4,71
HBB-284	0,4	0,260	1,65	9,16	3,66
HBB-286	0,5	0,325	2,05	11,36	4,54
HBB-288	0,3	0,310	1,96	10,87	4,35
HBB-289	0,2	0,078	0,53	2,95	1,18

Büyük zona sahip suşların ekstraselular olarak ürettiği ham selüloz enzimlerinin spektrofotometrik olarak glukoz absorbansı ölçümleri yapılmıştır. Glukoz absorbansı açısından en yüksek absorbans değeri 0,354 ve enzim aktivitesi 4,95 U/ml ile HBB-99 numaralı suş tespit edilmiştir. Aynı suşun ürettiği enzim CMC ile girdiği reaksiyondan 1ml'de 12,37µM glukoz üretimi tespit edilmiştir (Tablo 4).

#### **İnce Tabaka Kromatografisi**

Araştırmamızda oluşan enzim substrat ürünü glukozu; 1mg/ml glukoz, 1mg/ml maltoz ve 1mg/ml CMC ile karşılaştırma yapmak için ince tabaka kromatografisi yapılmıştır. Enzim-substrat ilişkisinden oluşan glukoz ürünü pozitif glukoz ürünü ile aynı molekül boyutunda olduğu ve enzim substrat ilişkisinden elde edilen ürünün glukoz olduğu tespit edilmiştir. Buna kıyasla maltozun oluşturduğu lekenin glukozunkinden aşağıda olması, maltozun

daha ağır moleküllü olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca CMC, diğer monosakkaritlere göre polisakkarit bir yapıdadır. Diğerlerinin içinde en ağır molekül yapısına sahip olduğundan en aşağıda kalmıştır ve hiç yürümemiştir (Şekil 4).



**Şekil 16 İnce tabaka kromatografisi görüntüsü (Soldan sağa sırasıyla; glukoz, maltoz, CMC, enzim-substrat ürünü glukoz)**

Selülaaz enzim aktivitesi ölçümü ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan konumuzla yakından alakalı olanlarından birkaçı aşağıda verilmiştir:

Nagano ve ark. deniz ökaryotlarında süpernatanttan ekstraselular selülaaz enzim aktivitesine bakmışlardır ve substrat olarak CMC kullanmışlardır. Kullandıkları 19 suştan 14'ünde CMC hidrolizi görülmüştür. Enzim aktivitesi tespit edilen suşlar; *Aplanochytrium*, *Botryochytrium*, *Oblongichytrium*, *Parietichytrium*, *Schizochytrium*, *Sicyoidochytrium*, *Thraustochytrium* ve *Ulkenia* cinslerine aittir. Enzim aktivitesi üçüncü günden itibaren tespit edilmiş ve hücre gelişmesiyle artmıştır. Bu çalışmada enzim aktivitesinin süreye göre artışı izlenmiştir (Nagano ve ark. 2011). Bizim çalışmamızda bundan farklı olarak enzim aktivitesi durdurulduktan sonra absorbans ölçümü yapılmıştır.

Asha ve ark. tarafından yapılan çalışmada *Paenibacillus barcinonensis* suşundan elde edilen selülaaz enziminin karakterizasyonu yapılmıştır. CMC substratı 65°C'de 20dk boyunca hidroliz edilmiştir. Ham enzim aktivitesi 11,02 U/ml'dir (Asha ve ark., 2012).

Potprommanee ve arkadaşlarının termofilik selülaaz enzimi karakterizasyonu çalışmasında *Geobacillus* sp. suşundan üretilen termofilik selülaazın aktivitesi incelenmiştir. Optimum enzim aktivitesi, CMC substratı ile 50°C'de 20dk reaksiyon sonucu 54,38 U/ml (en yüksek aktivite) ve zon ile koloni çapı arasındaki fark 2,20cm (en büyük fark) olarak tespit edilmiştir (Potprommanee ve ark., 2017). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde en yüksek enzim aktivitesi (4,95 U/ml) en büyük zon çapının görüldüğü suşta gözlenmiştir ve zon ile koloni çapı arasındaki fark 0,8cm'dir. Karşılaştırmalı olarak incelendiğinde bu çalışma ile kendi çalışmamızın sonuçları arasında doğru orantılı bir bağlantı vardır.

İbrahim ve El-diwany tarafından yapılan çalışmada sıcak su kaynaklarından izole edilen termofilik bakterilerin ürettikleri selülaaz enzim aktiviteyi incelenmiştir. En yüksek selülaaz aktivitesi *Anoxybacillus flavithermus* suşunda 65,56U/ml'dir. Substrat olarak CMC kullanılmıştır. Enzim substrat reaksiyonu 70°C'de 20dk sürmüştür (İbrahim ve El-diwany, 2007).

Yılmaz tarafından yapılan tez çalışmasında termofilik *Myceliophthora hinnulea* suşunun selülaaz aktivitesine filter kağıdı birimi açısından (FPU/ml) bakılmıştır. Substrat olarak CMC kullanılmıştır. En yüksek selülaaz enzim aktivitesi 24 saatlik kültür şartlarında, pH 6,1, 38°C'de 0,216 FPU/ml olarak tespit edilmiştir (Yılmaz, 2015).

Jadhav ve ark. tarafından yapılan çalışmada farklı karbon kaynakları kullanılmıştır (Pirinç kabuğu, muz kabuğu ve buğday kepeği). Bu substratlar kullanılarak elde edilen selülaaz enzim aktivite değerleri sırasıyla 12,2 U/ml, 12,4 U/ml ve 9,2 U/ml'dir (Jadhav ve ark., 2013). Karbon kaynağının enzim aktivitesi üzerinde etkili olduğu görülmektedir.

Ramanathan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mezofilik *Fusarium oxysporum*' dan elde edilen selülaaz (CMCase) enzim aktivitesinin optimum 1,94 U/ml olduğu tespit edilmiştir. Maximum enzim aktivitesi seviyesine

8 gün sonunda ulaşılmıştır. Substrat olarak salisin kullanılmıştır. Enzim substrat reaksiyonu 60°C'de gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayini DNS metodu ile yapılmıştır (Ramanathan ve ark., 2010).

Yu ve arkadaşları 6 adet ticari selülozün total enzim aktivite ölçümü için filtre kağıdı tayinine (FPA) bakmışlardır. Çalışmada kullanılan ticari enzimlerin (Youtell, RCconc, R-10, Lerkam, Yishui and Sinopharm) aktiviteleri sırasıyla 67.9, 46.0, 46.1, 27.4, 7.6 ve 8.0 IU/ml'dir (Yu ve ark., 2016).

## SONUÇ

Bu çalışmada kullandığımız termofilik bakteri izolatları içinde en yüksek selüloz aktivitesi 4,95 U/ml ile HBB-99 nolu izolata aittir. Çalışılan diğer suşlar da önemli düzeyde aktiviteye sahiptir. Farklı aktivitelerde olan ekstraselüler enzimi üretimine sahip olan bu suşların selüloz enzimleri endüstride; deterjan katkısında, toner uzaklaştırmada, biyotaşlamada, yem sanayinde, biyodizel ve biyoetanol üretiminde ve gıda endüstrisinde kullanım için potansiyel taşımaktadırlar.

## KAYNAKLAR

Asha, B. M., Revathi, M., Yadav, A., & Sakthivel, N. (2012). Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(11), 1501-1509.

Bruins, M.E., Jansen, A.E.M., Boom, R. M. (2001). Thermozyms and Their Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 90, 155-186.

Criquet, S. (2002). Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *Journal of microbiological methods*, 50(2), 165-173.

Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*, 5(6), 578.

Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical reviews in biotechnology*, 30(4), 302-309.

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.

Güven, R. G. (2011). Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9, 1-10.

Ibrahim, A. S. S., & El-diwany, A. I. (2007). Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4), 473-478.

Jadhav, A. R., Girde, A. V., More, S. M., More, S. B., & Khan, S. (2013). Cellulase production by utilizing agricultural wastes. *Res. J. Agri. For. Sci*, 1(7), 6-9.

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), 503-507.

Koç, Ö. (2015). *Aspergillus fumigatus* HBF125 ekstraselüler  $\alpha$ -amilazının üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bölümleri Enstitüsü*, Sayfa 52

Nagano, N., Matsui, S., Kuramura, T., Taoka, Y., Honda, D., & Hayashi, M. (2011). The distribution of extracellular cellulase activity in marine eukaryotes, thraustochytrids. *Marine biotechnology*, 13(2), 133-136.

Potprommanee, L., Wang, X. Q., Han, Y. J., Nyobe, D., Peng, Y. P., Huang, Q., ... & Chang, K. L. (2017). Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. *PLoS one*, 12(4), e0175004.

Ramanathan, G., Banupriya, S. ve Abirami, D. (2010), "Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporu* by submerged fermentation" *Journal of Scientific & Industirial Research*, **69**, 454-459.

Rathore, S. S., Mannivannan, A., & Narendhirakannan, R. T. (2014). Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. *J. Adv. Sci. Res*, 5(3), 23-30.

Sharrock, K. R. (1988). Cellulase assay methods: a review. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 17(2), 81-105.

Yılmaz Y. (2015). Termofilik *Myceliophythora hinnulea*'dan Selülaz Enzimi Üretimi. *Anadolu Üniversitesi Fen Bölümleri Enstitüsü*

Yu, X., Liu, Y., Cui, Y., Cheng, Q., Zhang, Z., Lu, J. H., ...& Ren, X. (2016). Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), S93-S98.

Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., & Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, 24(5), 452-481.

Wu, B., Zhao, Y., & Gao, P. J. (2006). A new approach to measurement of saccharifying capacities of crude cellulase. *BioResources*, 1(2), 189-200.

## Serum oxidative stress biomarkers in rat models acutely and chronically exposed to electromagnetic fields

Şadiye Açıkgöz<sup>1\*</sup>, Elvan Şahin<sup>1</sup>, Derya Güzel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Sakarya University, Sakarya, Turkey

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Sakarya University, Sakarya, Turkey

\*sadiyeacikgoz@sakarya.edu.tr

### Abstract

Low dose electromagnetic field (EMF) can lead to oxidative stress by shifting oxidant/antioxidant balance in organism. The aim of this research is to evaluate the systemic effects of EMF exposure period on oxidative balance.

**Materials and Methods:** Twenty-four Wistar albino rats were used in three groups: sham-control (Group I), acutely EMF-exposed (Group II) and chronically EMF-exposed (Group III) (n=8 in each). Sham-control group did not receive EMF. Acutely-EMF exposed group received 900 MHz EMF only for one day during 24 hours without interruption. Chronically-exposed EMF group received 900 MHz EMF for 1 hour per day during 30 days. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and total thiol were assessed in serum samples and oxidative stress index (OSI) was calculated. **Results:** OSI value was significantly higher in Group III than that in Group I. No statistical significant difference was found between other parameters.

**Keywords:** Electromagnetic field, Malondialdehyde, Oxidative stress, Rat, Serum, Superoxide dismutase, Total antioxidant status, Total oxidant status

### INTRODUCTION

Every day more than 3 million people worldwide are regularly exposed to electromagnetic fields and waves. Wi-fi, bluetooth and microwave (Fragopoulou 2010, Erdogan 2019). The radiofrequency field in the 10 kHz-300 GHz range caused by these devices identifies low-dose electromagnetic field (EMF) (Repacholi 1998). Low-dose EMF leads to harmful effects in cell biology (Şahin E 2018). EMF exposure causes negative effects on endocrine system, cardiovascular system, nervous system and reproductive functions due to cytotoxicity and genotoxicity (Singh 2014). A significant number of researches have demonstrated that these effects occur owing to reactive oxygen species (ROS) formation (Tkalec 2007). Cells have enzymatic and non-enzymatic antioxidants that destroy ROS (Erel 2005). Lipid peroxidation of membranes, DNA degradation, oxidative modification of proteins and enzymes and polypeptide fragmentation are the main mechanisms of free radical damage (Kumar 2000). Malondialdehyde (MDA), the final product of lipid peroxidation, leads to changes in membrane components (Cighetti 2002). The first defense against free radicals in the organism is carried out with superoxide dismutase (SOD) enzyme. SOD converts the superoxide group causing cell damage to hydrogen peroxide and oxygen (Halliwell 1999). Thiol has a crucial role in obviating the oxidative status by destroying ROS and other free radicals with enzymatic and nonenzymatic mechanisms (Cadenas 1989). Total oxidant status (TOS) is obtained by measuring the total oxidant capacity of a sample. Total antioxidant status (TAS) is obtained by measuring the total antioxidant capacity of a sample. Oxidative stress index (OSI) is an indicator parameter of the oxidative stress level (Erel 2005). We investigated the effect of electromagnetic wave exposure period on the oxidant / antioxidant balance in serum.

### MATERIALS AND METHODS

Three groups were designed using 8 rats in each group: sham-control (Group I), acutely EMF-exposed (Group II) and chronically EMF-exposed (Group III). Sham-control rats did not receive EMF. Acutely-EMF exposed group received 900 MHz EMF by using a GSM simulator device during 24 hours continuously just for one day. Chronically-exposed EMF group received 900 MHz EMF for an hour a day during 30 days. Under the anesthesia, blood samples were collected from rats by exsanguination. Blood samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C after completion of coagulation at room temperature, and stored in ependorf tubes at -20°C until the day of

analysis. TAS, TOS, SOD, MDA and total thiol in serum samples were measured using commercially available kits. OSI was calculated by ratio of TOS levels to TAS levels.

## RESULTS

In this study, no significant difference was found between the experimental groups in terms of TAS, TOS, SOD, MDA and total thiol levels in serum ( $p>0.05$ ). However, a significant difference was determined when OSI values were compared with each other. OSI in the chronically EMF-exposed group was significantly higher than that in the control group ( $p=0.023$ ) (Table 1).

**Table 1.** Comparison of mean values of serum biochemical parameters

Experimental groups (n=8)	TAS (mmol Trolox Eq/L)	TOS ( $\mu$ mol Eq/L)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	OSI (unit)	SOD (U/ml)	MDA ( $\mu$ mol/ml)	Total Thiol ( $\mu$ mol/L)
Control (Group I)	1.490 $\pm$ 0.403	8.834 $\pm$ 3.077		0.607 $\pm$ 0.178	13.658 $\pm$ 2.423	11.870 $\pm$ 3.962	407.499 $\pm$ 127.674
Acute EMF exp. (Group II)	1.379 $\pm$ 0.253	9.258 $\pm$ 4.1622		0.693 $\pm$ 0.341	15.241 $\pm$ 4.7502	10.704 $\pm$ 3.521	384.844 $\pm$ 97.989
Chronic EMF exp. (Group III)	1.311 $\pm$ 0.357	11.315 $\pm$ 2.470		0.930 $\pm$ 0.381	13.999 $\pm$ 3.035	13.697 $\pm$ 4.362	404.821 $\pm$ 123.108
<i>Pairwise comparisons</i>				0.023(I-III)			

EMF: Electromagnetic Field, exp: exposure, TAS: Total Antioxidant Status, TOS: Total Oxidant Status, OSI: Oxidative Stress Index, SOD: Superoxide Dismutase, MDA: Malondialdehyde. Mean  $\pm$  SD  $p\leq 0.05$ .

## DISCUSSION

In this study, the effects of EMF exposure period on the oxidant / antioxidant balance in serum was evaluated. Although changes in serum markers in this context do not make a significant difference, it indicates that the balance shifts to the oxidative state by increasing in exposure period. It was also observed that OSI value increased in chronically EMF-exposed group compared to sham-control group.

These results coincide with other studies results. In a study investigating the effect of low dose EMF on antioxidant and oxidative stress parameters in rats' blood, no significant difference was found between groups in terms of MDA levels in blood after 20 days of exposure (Demirel 2012). Similarly in another previous studies, it was found that testicular MDA levels did not make a significant difference in rats exposed to low dose EMF for 1-1.5 hours per day for 11-12 weeks compared to control (Lee et al. 2010, Ribeiro et al. 2007). Serum total thiol, TAS and SOD values were not statistically different compared to the control group in a study that rats were exposed to low dose EMF for 1 hour a day for 30 days and OSI values were significantly higher in the EMF group compared to control group (Acikgoz 2019). When MDA level and SOD activity were evaluated in terms of exposure time in the literature, conflicting results were shown (Balci et al.2007, Dasdag et al. 2003, Ribeiro et al. 2007). MDA and SOD levels were found to be lower in rats after exposure to low dose EMF for 1 hour per day for 30 days (Odaci and Ozyilmaz 2015). In another study MDA was found increased in the blood of guinea pigs exposed EMF for 12 hours a day for 1 month (Meral 2007). After exposure of rats to low dose EMF (1 h/day during 21 consecutive days), it was found that EMF decreased the SOD and thiol levels and increased the MDA level in liver and kidney (Salah 2013).

After exposed low dose EMF 1 hour a day for five days of a week during 1 year, in rats it was shown that TOS plasma level increased whereas there was no statistical difference in the mean plasma level of TAS (Yuksel 2016). It was shown that low dose EMF exposure for 1 hour per day for 2 months significantly decreased TAS level and

significantly increased TOS and OSI levels in the frontal cortex, brain stem and cerebellum in rats (Eser et al. 2013). In rats exposed low dose EMF for 2 hours a day for 2 months it was shown that TAS level decreased and MDA, TOS levels and OSI increased in brain (Alkis 2019). In a similar study after exposed low dose EMF for 3 hours a day for 1 month in rats a significant increase was observed in pancreas MDA, TOS and OSI levels, whereas TAS levels decreased (Topsakal 2017). It was found that rats exposed to low dose EMF for 1 hour per day for 4 to 6 weeks had lower testicular TAS levels compared to the control group (Ozorak 2013). It was found that talking with more than 1 hour of mobile phone decreased the TAS level in the saliva compared to less than 20 minutes of talking (Arbabi-Kalati et al. 2014). In a similar study, no correlation was found between short-term low dose EMF exposures such as 15-30 minutes and oxidant / antioxidant status of saliva (Khalil et al. 2014). TOS, TAS and OSI appear to be more reliable markers in the literature due to their more consistent results in studies in evaluating oxidative status after low dose EMF exposure.

## CONCLUSION

The shifting of the oxidant / antioxidant balance to the oxidative state in serum and other tissues is associated with an increase in EMF exposure period. More time-dependent studies are needed to determine the exact duration of the low dose EMF exposure that shifts the balance to the oxidative state.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to Prof. Dr. Osman Cerezci (Uskudar University) providing GSM simulator device for the study.

## REFERENCES

- Acikgoz S. 2019. Effects of experimental low dose electromagnetic field on rat testis and semen tissues and investigation of antioxidant role of caffeic acid phenethyl ester. Published Specialization Thesis, Supervisor: Prof. Dr. Elvan Şahin, Medical Faculty of Sakarya University, Sakarya.
- Arbabi-Kalati F, Salimi S, Vaziry-Rabiee A, Noraei M. 2014. Effect of mobile phone usage time on total antioxidant capacity of saliva and salivary immunoglobulin A. *Iranian Journal of Public Health*, 43, 480-484.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 79-110.
- Demirel S, Doganay S, Turkoz Y, Dogan Z, Turan B, Firat PGB. 2012. Effects of third generation mobile phone-emitted electromagnetic radiation on oxidative stress parameters in eye tissue and blood of rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 31, 89-94.
- Erdogan M, Sahin E, Dincel S. 2019. Are the devices that creates electromagnetic area as innocent as we thought? *Journal of Human Rhythm*, 5, 41-53.
- Erel O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38, 1103-1111.
- Eser O, Songur A, Aktas C, Karavelioglu E, Caglar V, Aylak F, et al. 2013. The effect of electromagnetic radiation on the rat brain: an experimental study. *Turkish Neurosurgery*, 23, 707-715.
- Fragopoulou AF, Koussoulakos SL, Margaritis LH. 2010. Cranial and postcranial skeletal variations induced in mouse embryos by mobile phone radiation. *Pathophysiology*, 17, 169-177.
- Halliwell B and Gutteridge J. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, p. 1-231, 353-425.
- Khalil AM, Abu Khadra KM, Aljaberi AM, Gagaa MH, Issa HS. 2014. Assessment of oxidant/antioxidant status in saliva of cell phone users. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 33, 92-97.
- Kumar V, Cotran R, Robbins S. 2000. *Temel Patoloji (Çeviri)*. Çev. Ed. Çevikbaş U. Istanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 133-174.
- Lee HJ, Pack JK, Kim TH, Kim N, Choi SY, Lee JS, Kim SH, Lee YS. 2010. The lack of histological changes of CDMA cellular phone-based radio frequency on rat testis. *Bioelectromagnetics*, 31, 528-534.
- Meral I, Mert H, Mert N, Deger Y, Yoruk I, Yetkin A, Keskin S. 2007. Effects of 900-MHz electromagnetic field emitted from cellular phone on brain oxidative stress and some vitamin levels of guinea pigs. *Brain research*, 1169, 120-124.



- Odaci E and Ozyilmaz C. 2015. Exposure to a 900 Mhz electromagnetic field for 1 hour a day over 30 days does change the histopathology and biochemistry of the rat testis. *International Journal of Radiation Biology*, 91, 547-554.
- Ozorak A, Naziroğlu M, Çelik Ö, Yüksel M, Özçelik D, Özkaya MO, Çetin H, Kahya MC, Köse SA. 2013. Wi-fi (2.45 Ghz)-and mobile phone (900 and 1800 Mhz)-induced risks on oxidative stress and elements in kidney and testis of rats during pregnancy and the development of offspring. *Biological Trace Element Research*, 156, 221-229.
- Repacholi MH. 1998. Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, 19, 1-19.
- Ribeiro EP, Rhoden EL, Horn MM, Rhoden C, Lima LP, Toniolo L. 2007. Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. *The Journal of Urology*, 177, 395-399.
- Sahin E, Guzel D, Acikgoz S, Tufan N. 2018. Effects of acute and chronic exposure to 900 Mhz electromagnetic field on the rat liver microarchitecture. *Proceedings*, 2, 1585.
- Salah MB, Abdelmelek H, Abderraba M. 2013. Effects of olive leave extract on metabolic disorders and oxidative stress induced by 2.45 GHz WIFI signals. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 826-834.
- Singh S and Kapoor N. 2014. Health implications of electromagnetic fields, mechanisms of action, and research needs. *Advances in Biology*, 2014, 1-24.
- Sepehrimanesh M, Nazifi S, Saeb M, Kazemipour N. Effect of 900 MHz radiofrequency electromagnetic field exposure on serum and testicular tissue antioxidantenzymes of rat. *Online Journal of Veterinary Research* 2016, 20(9), 617-624.
- Topsakal S, Ozmen O, Cicek E, Comlekci S 2017. The ameliorative effect of gallic acid on pancreas lesions induced by 2.45 GHz electromagnetic radiation (Wi-Fi) in young rats. *Journal of radiation research and applied sciences*, 10(3), 233-240.
- Tkalec M, Malarić K, Pevalek-Kozlina B. 2007. Exposure to radiofrequency radiation induces oxidative stress in duckweed *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment*, 388, 78-89.
- Yuksel M, Naziroglu M, Ozkaya MO. 2016. Long-term exposure to electromagnetic radiation from mobile phones and Wi-Fi devices decreases plasma prolactin, progesterone, and estrogen levels but increases uterine oxidative stress in pregnant rats and their offspring. *Endocrine*, 52(2), 352-362.

## Doğal ve hızlandırılmış yaşlandırma testlerinin ahşap kaplamanın yüzey özelliklerine etkisi

Şebnem S. Arpacı\*, Eylem Dizman Tomak

Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: sebnem.arpaci@btu.edu.tr

### Özet

Ahşap kaplamalar, dış mekan uygulamalarında, fotodegradasyona uğrayarak yüzeylerinde bozunmalar meydana gelmektedir. Bu etkileri araştırmak, kaplamaların ticari değerini tanımlamak için önemlidir. Bu çalışmada, 1512 saat hızlandırılmış ve 150 günlük doğal hava koşullarına maruz kalan kayın kaplama örneklerinde, yüzey pürüzlülüğü, renk değişimi ve parlaklık değişimi gibi yüzey özelliklerine etkiler incelenmiştir. Hızlandırılmış yaşlandırma testine ait örneklerde 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 ve 168 saat sonunda ölçümler yapılmış, daha sonraki ölçümler testin sonuna kadar haftada 2 kez alınmıştır. Böylece bu örneklerde toplam 37 kez periyodik ölçümler yapılmıştır. Doğal dış ortam yaşlandırmada ise örnekler 4 saat, 1, 2, 3, 5, 7 gün sonunda ölçülmüş, daha sonra bu ölçümler ilk 2 ay boyunca her hafta ve sonrasında ise 2 haftada bir gerçekleştirilerek toplamda 24 ölçüm alınmıştır. Hızlandırılmış yaşlandırma testi sonuçları, örneklerde  $\Delta L^*$  değerinin 24. saatte belirgin olarak koyulaştığını göstermektedir. Doğal yaşlandırma testi boyunca görülen en belirgin  $\Delta L^*$  değeri 35. günde gözlenmiştir. Örneklerdeki parlaklık değerlerinde azalmalar test süresi boyunca devam etmiştir ama belirgin değişiklik verdiği gözlenmemiştir. Örneklerin yüzey pürüzlülük değerleri, hem doğal hem hızlandırılmış yaşlandırmaya tabi tutulma süresi boyunca artış göstermiştir. Yaşlandırma testleri ile yüzey renginin önemli ölçüde değiştiği, parlaklığın kaybolduğu ve daha pürüzlü yüzeyler elde edildiği gözlenmiştir. Kayın kaplama örneklerinin yüzey özelliklerinde, laboratuvar koşullarındaki hızlandırılmış yaşlandırma testinin, doğal dış ortam testine göre daha fazla değişime neden olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile kayın kaplamasının herhangi bir işlem görmeden dış ortam koşullarında degradasyonu incelenmiş ve hizmet ömrünün artırılması için dış etkenlere karşı kaplamasının kimyasal değişimini azaltabilecek yüzey işlemleri ya da emprenye maddeleri ile korunması önerilmiştir.

**Anahtar Kelime:** Kayın kaplama, hızlandırılmış yaşlandırma, doğal yaşlandırma, renk değişimi, parlaklık, yüzey pürüzlülüğü

### Effect of Natural and Artificial Weathering on Surface Properties of Wood Veneer

Şebnem S. ARPACI<sup>1\*</sup>, Eylem DİZMAN TOMAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bursa Technical University, Faculty of Forestry, Forest Industry Engineering, Bursa, Turkey

### Abstract

Photodegradation occurs on wood veneer surfaces when exposed to outdoor conditions. Investigating its' effect is important for commercial value of veneers. In this study, the effect of surface roughness, color change and gloss change on the beech veneer samples was investigated after exposing to natural weathering for 150 days and accelerated weathering for 1512 hours. For the samples exposed to accelerated weathering test, measurements were made at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 and 168 hours, after subsequent measurements were taken twice a week until the end of the test. Thus, periodic measurements were made totally 37 times on these samples. Natural weathering samples were measured at the end of 4 hours, 1, 2, 3, 5, 7 days, then, these measurements were performed every week for the first 2 months and then every 2 weeks, totally 24 measurements were taken. Accelerated weathering test results indicate that the  $\Delta L^*$  value of samples was significantly darkened at the end of 24 hours. The most significant  $\Delta L^*$  value observed during the natural weathering test was observed on day 35. Decreases in gloss values of the samples continued throughout the test period, but no significant changes were observed. The surface roughness values of the samples increased during both natural and accelerated weathering test period. It has been observed that the surface color changed significantly with the weathering tests, the gloss lost and the rougher surfaces were obtained. It has been found that accelerated weathering test in laboratory conditions causes more changes on surface properties of beech veneer

samples than natural weathering test. Results showed that veneers should be protected by surface treatments or impregnating agents in order to increase the service life.

**Keywords:** Beech veneer, accelerated weathering, natural weathering, color change, gloss change, surface roughness

## GİRİŞ

Ahşap malzeme estetik görünüşü ve yapısal özellikleri nedeniyle, mühendislik ve yapısal uygulamalar için uzun zamandır kullanılan ve en önemli doğal malzemelerden biridir [1, 2]. Ahşap, koruyucu kimyasal maddeler ile işlem görmediği takdirde, güneş ışığı ve su (yağmur, çığ, kar) etkilerinden dolayı dış ortamda kullanımı sırasında hızlı bir yüzey bozulmasına uğramaktadır [3]. UV ve su etkilerinin yanı sıra, bağıl nemdeki değişiklikler, rüzgarla gelebilecek kum ve /veya diğer parçacıkların da ahşabın bozulmasını hızlandırmada aktif rol oynadığını söylemek mümkündür [4]. Ancak bu durum, belirli bir süre aşırı nem ve havanın varlığında etkili olan organizmalardan (mantarlardan) kaynaklanan ahşabın bozulmasıyla (çürümesi) karıştırılmamalıdır. Mantarların çürüme etkisi için uygun koşullar altında, ahşap malzeme hızla bozulabilir, mekanik özellikleri düşer ve oluşan sonuç doğal dış hava koşullarında gözlenenden çok farklıdır [5]. Norveç'te incelenen 1000 yıllık ahşap örnekleri, dış ortam koşullarına maruz kalmasına karşılık yapısal olarak bozulması görülmemiş, bu nedenle hava koşullarının mekanik özelliklere etkileri az olduğunu belirtmiştir [3]. Ahşabın dış ortam koşullarına maruz kalması temel olarak, ağaç liflerinin yüzeyden yavaşça ayrılmasına neden olan bir yüzey olayıdır [4]. Güneş ışığı su, ısı, çevresel kirleticiler, oksijen ve / veya ozon gibi oksidatif maddeler ile birlikte, ahşap hücre çeperinde ligninin ve selülozun radikal kaynaklı depolimerleşmesine yol açarak, ahşap malzemenin temel kimyasal bileşenlerinin bozulmasını sağlamaktadır [6, 7]. Ahşap UV ışığını emdiğinde, ligninin yapısında bulunan birincil ve ikincil hidroksil gruplar, karbonil gruplar, karboksil gruplar, aromatik ve fenolik gruplar gibi bölgelerde, dehidrojenasyon, dehidroksilasyon, dehidroksimetilasyon ve demethoksilasyon gibi kimyasal değişiklikler görülmektedir [3]. Bu durum zincir bölünmesine yol açan fenoksi serbest radikallerin oluşumu ile tetiklenir. Foto parçalamanın sonucunda, ahşap yüzeylerinin renk değişimine (sararmasına) neden olan orto ve para-kinon yapılar meydana gelmektedir [8] ve yağmurun etkisiyle ahşap malzemedeki fotodegradasyona uğramış lignin ve lif parçaları yüzeyi pürüzlü hale getirerek rengin gri olmasına neden olmaktadır [9]. Evans (1989), yaptığı çalışmada 2 yıl doğal hava koşullarının ardından, ahşap malzemedeki ağırlık kaybının, öncelikle orta lamelinin parçalandığını, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile göstermiştir. Dış ortamda kullanılabilir işlem görmüş ve görmemiş ahşap malzemelerin dayanıklılığını değerlendirmek için hızlandırılmış yaşlandırma yöntemleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 2400 saatlik hızlandırılmış yaşlandırma testi 4-5 yıllık doğal iklim koşullarına denk geldiği belirtilmiştir [10]. Rütther ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, ahşap panoların hem dış mekanda hem de test laboratuvarında renk değişimlerini araştırılmıştır, renk değişimleri ile iki iklimsel test ortamı arasında niceliksel bir ilişki bulunamamıştır. Ancak laboratuvar ortamında gerçekleştirilen yaşlandırmanın, dış ortam etkilerine yakın tasarladığında faydalı bir araç olacağı raporlanmıştır. Farklı ahşap türlerinin ışığa dayanıklılığını değerlendirmek için doğal yaşlandırma ve hızlandırılmış yaşlandırma yapılarak, aydınlatma kaynağı tipinin (doğal veya filtrelenmiş güneş ışığı, ksenon lambaları gibi farklı kaynaklardan gelen suni ışık, farklı dalga boylarında lazer ışınımı), odun fotodegradasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır [8, 11]. Timar ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, 6 farklı tür ahşap örneklerinin, hızlandırılmış UV radyasyonu (UVB-UVA-Vis, 295-600 nm, UVA-Spot 400T) maruz kalma süresinden sonra en yüksek sarılık, çamda ve ardından köknar ve dişbudak olarak gözlenirken, en düşük sarılık, kiraz ve karaçam örneklerinde görüldüğünü belirtmiştir. Ahşap malzemenin bozulmasını azaltmak için önerilen en önemli ve etkili yöntemlerden biri, ahşabın çevre dostu kimyasallarla emprenye edilmesi önerilmektedir [12].

Bu çalışmada, kayın kaplama örnekleri 1512 saat hızlandırılmış yaşlandırma ve 150 gün doğal yaşlandırmaya tabi tutulmuştur. Hızlandırılmış yaşlandırma testine ait örneklerde 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 ve 168 saat sonunda ölçümler yapılmış, daha sonraki ölçümler testin sonuna kadar haftada 2 kez ölçülerek toplamda 37 ölçüm, doğal yaşlandırma testine maruz kalan örneklerde 4 saat, 1, 2, 3, 5, 7 gün sonunda ölçülmüş, daha sonra bu ölçümler ilk 2 ay boyunca her hafta ve sonrasında ise 2 haftada bir gerçekleştirilerek toplamda 24 ölçüm alınarak, kaplamalarda meydana gelen renk ve parlaklık değişimi ile yüzey pürüzlülüğü incelenmiştir.

## **MATERYAL ve METOD**

### **Ağaç Malzeme**

Çalışmada endüstride yaygın olarak tercih edilen ahşap malzeme olan kayın kaplamaları kullanılmıştır. Kaplamalar Sülekler Orman Ürünleri A.Ş tarafından temin edilerek, 0,5 x 7,5 x 14 cm ölçülerinde boyutlandırıldıktan sonra, 2 hafta %65 bağıl nem ve 20°C'da bekletilerek kondisyonlanması ve denge rutubetine getirilmesi sağlanmıştır.

### **Doğal Dış Ortam Testi**

Doğal dış ortam koşullarına bırakılan örnekler, güney yönünde zemin ile 45°'lik açı yapan, yerden 50cm yükseklikte ve korozyona uğramayan bir malzemedan yapılmış dış ortam test düzeneğine yerleştirilerek ASTM G7 ve EN 927-3 standartları göz önüne alınarak Bursa ilinde 13.11.2018- 18.04.2019 tarihleri arasında 5 ay açık hava koşullarına maruz bırakılmıştır. Doğal dış ortam yaşlandırma örneklerin yüzey özellikleri 4 saat, 1, 2, 3, 5, 7 gün sonunda ölçülmüş, daha sonra bu ölçümler ilk 2 ay boyunca her hafta ve sonrasında ise 2 haftada bir gerçekleştirilmiştir.

### **Hızlandırılmış yaşlandırma Testi**

Hızlandırılmış dış ortam testi (yapay dış ortam testi) Atlas Marka UV test cihazında dış ortam yaşlandırmasını simüle etmek için ASTM G154 standardı esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler cihaza içerisinde UV ışığı ve nemin değişken döngülerine 1512 saat süresince maruz bırakılmıştır. Test, 340 nm lambalar kullanılarak 0,89 W/m<sup>2</sup>/nm ışınımında, 60(±3)°C'de 8 saat UV ışığı ve ardından 50(±3)°C'de 4 saat kondenzasyon işlem döngüsünde gerçekleştirilmiştir. Hızlandırılmış yaşlandırma testine ait örneklerde 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 ve 168 saat sonunda ölçümler yapılmış, daha sonraki ölçümler testin sonuna kadar haftada 2 kez alınmıştır.

### **Renk Analizi**

Renk ölçümleri ASTMD2244'de belirtilen esaslara göre CIE L\* a\* b\* renk sistemi kullanılarak belirlenmiştir. L\* açık renklilik, a\* ve b\* ise kromatik koordinatları göstermektedir (+a\* kırmızı için, -a\* yeşil için, +b\* sarı için, -b\* mavi için kullanılmaktadır). Renk farkı olarak isimlendirilen ( $\Delta E$ ), renk alanı içindeki iki renk (nokta) arasındaki mesafedir. Ölçümler 8 mm çapındaki sensör ve 10°'lik gözlemci açısı ile yapılmıştır, değerleri Spectra Magic NX programı yardımı ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

### **Parlaklık Analizi**

BYK Micro-Tri-Gloss marka parlaklık ölçüm cihazı ile 60° ölçüm geometrisinde belirlenmiştir.

### **Yüzey pürüzlülük Analizi**

Yüzey pürüzlülük testleri DIN 4768 standartlarında Mitutoyo Sj-310 marka pürüzlülük ölçer cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm cihazında R<sub>a</sub>, R<sub>y</sub> ve R<sub>z</sub> değerleri ölçülmüştür. R<sub>a</sub>, ortalama pürüzlük değerini; R<sub>q</sub>, kuadratik ortalama pürüzlük değerini; R<sub>z</sub>, maksimum pürüzlük derinlik değerini simgelemektedir. Yüzey pürüzlülüğü 0,5 µm hassasiyet ile ölçülmüştür ve ölçümler lif yönlerine paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

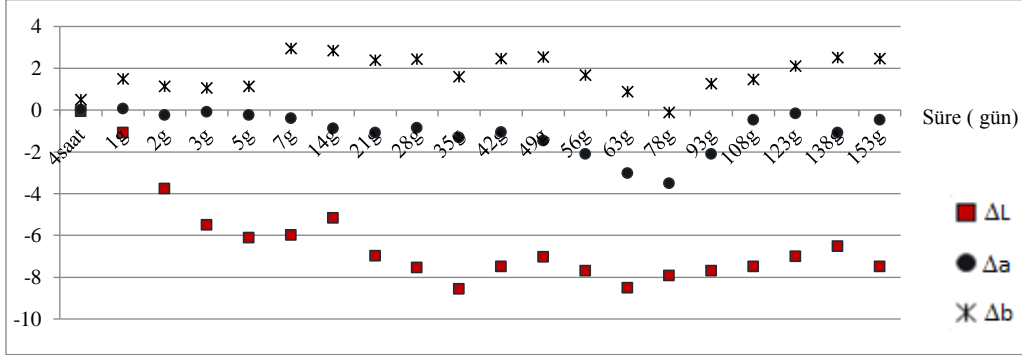
## **BULGULAR**

### **Renk Değerlerine Ait Bulgular**

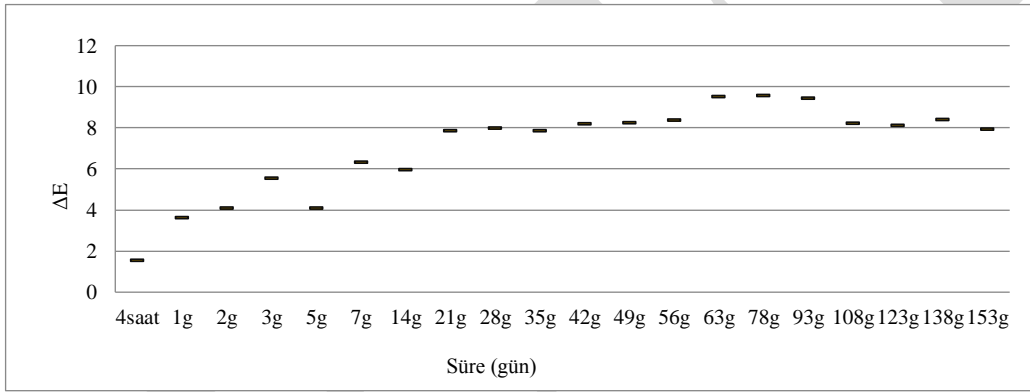
Doğal yaşlandırma test faktörleri örneklerin yüzeyinde koyu renge neden olmuştur. Koyu renk test süresince devam etmiştir. Örneklerin 150 gün sonrasında  $\Delta L^*$  değerinin -7,50 olduğu görülmektedir. Örneklerde en esmer koyu renk 35. günde alınan ölçümlerde görülmektedir. Bu durumun, dış ortam koşullarına bırakılan ahşap yüzeylerini, UV ışınlarının oksijen ve ozon gibi oksidatif faktörler ile sıcaklık ve rutubetin etkisi sonucunda lignin ve karbonhidratları depolimerize etmesidir [1, 12-14].

$\Delta a^*$  değeri 150 günün sonunda -0,47 olarak görülmektedir. Örneklerde 78. gün sonuna kadar yeşil renk indeksi hakim iken süre sonuna doğru kırmızımsı renk indeksi artmaya başlamıştır. Ekstraktların fotooksidasyon nedeniyle yüzeyde kırmızılığı arttırdığını Persze ve Tolvaj (2012) yaptıkları çalışmada belirtmektedir. Doğal dış ortam test süresi sonrasında alınan  $\Delta b^*$  değeri 2,48 görülmektedir. Örneklerde yaşlandırma nedeniyle yüzeyler daha sarımsı renk almıştır. Örneklerde ilk 5 günde sarılaşma eğilimi gözlenmiş, 7. gün sonunda en sarı yüzeyler elde edilmiş

ve yüzeylerdeki  $\Delta b^*$  parametresi 35. güne doğru biraz azalmıştır. Daha sonra artan bir eğilim ve 78. gün sonunda yine azalma gözlenmiş,  $\Delta b^*$  değerleri test sonuna kadar artarak devam etmiştir. Bu durum, lignin fotogradasyonu esas olarak sararmadan sorumlu olması nedeniyle açıklanmaktadır [15]. Örneklerde  $\Delta E$  değerinin en yüksek olduğu gün 78. gün olarak görülmektedir. Test süresi boyunca toplam renk değişiminde ( $\Delta E^*$ ) önemli bir artış görülmektedir.  $\Delta E^*$ 'nin düşük değerde olması, rengin değişmediği ya da çok az değişim olduğunu, değerinde artış olması ise belirgin olarak başlangıç renginde değişim olduğunu göstermektedir [16].

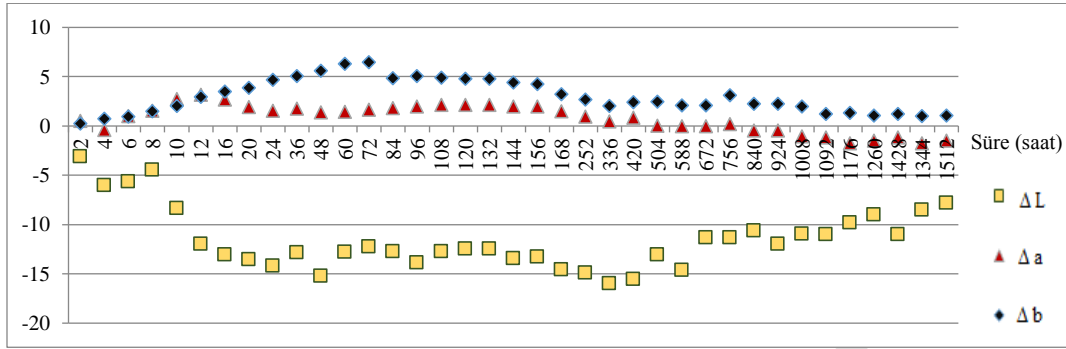


Şekil 1: Doğal yaşlandırma test örneklerine ait renk değişimi ( $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ )

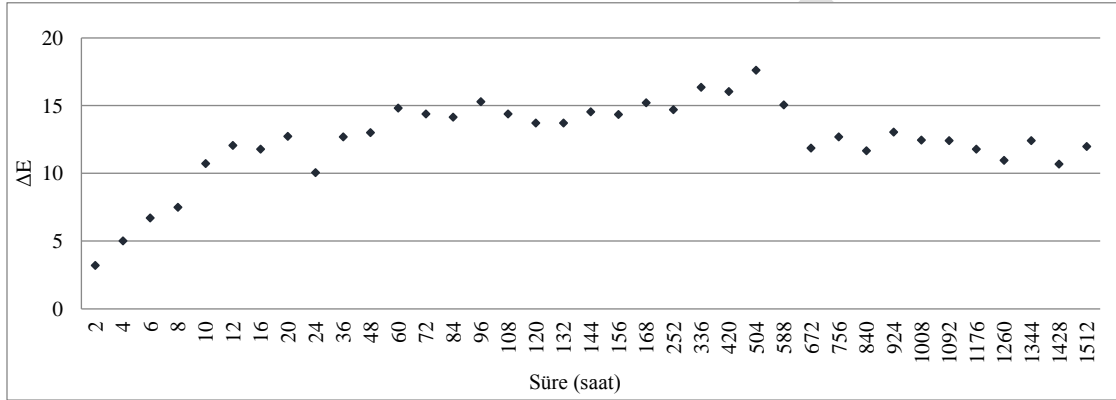


Şekil 2: Doğal yaşlandırma test örneklerine ait renk değişimi ( $\Delta E$ )

Hızlandırılmış yaşlandırma örneklerinin 1512 saat sonrasında  $\Delta L^*$  değeri -7,84 olarak belirlenmiştir. Örneklerin ilk saatten itibaren koyulaşmaya başladığı görülmektedir. Koyulaşma 588. saat boyunca devam etmiştir. Daha sonra yüzeylerde koyu renk açılmaya başlamıştır. Ahşap malzeme dış ortam koşullarına maruz kaldığı sürece bozulmaya uğramış kısımlarda erozyon devam eder [17], yüzey rengi açılır ve gümüş rengi görünümü verir ve tekrar koyu renge dönmektedir [4].  $\Delta a^*$  ve  $\Delta b^*$  değerleri test sonunda sırasıyla, -1,19 ve 1,02 bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda kayın kaplamaların UV ışığı ve kondenzasyon işlem döngüsünde sonrasında yüzey renginde koyulaşmanın yanı sıra  $\Delta a^*$  eğrisi incelendiğinde 756. saatten sonra yeşil renk parametresi görülmektedir.  $\Delta b^*$  değerinde ilk 72. güne kadar sarılaşma görülmekte, sonra test süresine kadar azalma eğilimi göstermiş. Bu durum, lignin parçalanmasında rastgele bölünme görülmemesine, n'inci sıra dizilimini izlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [1].  $\Delta L^*$ 'deki azalma  $\Delta b^*$  eğrisinin artmasına,  $\Delta L^*$  artışında ise yüzeyde açık renk indeksi artmaya başlar ve bu durum  $\Delta b^*$  değerindeki azalmaya neden gösterilmektedir [9]. Hızlandırılmış yaşlandırma testine maruz kalan örneklerin  $\Delta E^*$  değerinde 504. saatte en yüksek değer belirlenmiştir. Test sonunda  $\Delta E^*$  değeri ile başlangıç  $\Delta E^*$  değeri arasındaki fark, örneklerin test süresi boyunca renginin önemli derece değiştiğini göstermektedir.



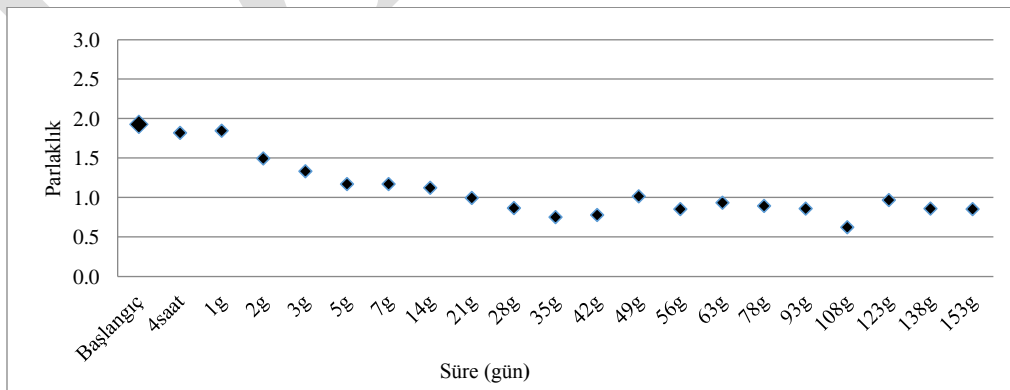
Şekil 3: Hızlandırılmış yaşlandırma test örnekleri  $\Delta L$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  değerleri



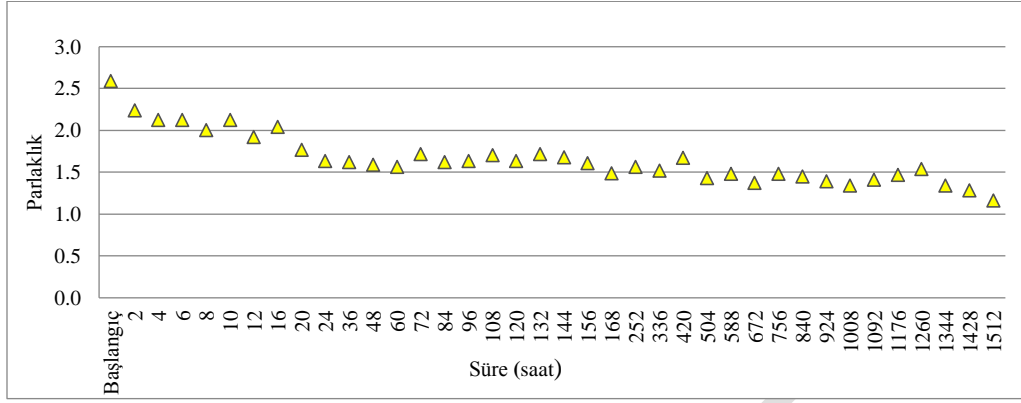
Şekil 4: Hızlandırılmış yaşlandırma test örnekleri  $\Delta E$  değeri

### Parlaklık Değerlerine Ait Bulgular

Hem doğal yaşlandırma, hem de hızlandırılmış yaşlandırma testine maruz kalan örneklerin parlaklık değerlerinde azalmalar görülmüştür. Doğal yaşlandırmaya maruz kalan örneklerde parlaklık değerlerinde azalma 42. güne kadar devam etmekte, sonrasında hafifçe yükselip test sonuna kadar devam etmektedir. Başlangıçta 1,93 seviyesinde olan değer 150 gün sonunda 0,86 seviyesine kadar azalmaktadır. Hızlandırılmış yaşlandırmaya maruz kalan örneklerde de parlaklık değerlerinde test süresi boyunca azaldığı görülmektedir. Başlangıçta 2,59 alınan değer, 1512 saat sonunda 1,16 değerine azalmaktadır. Yaşlandırma testleri sonucu oluşan çatlakların, ahşap malzemenin parlaklık indekslerini olumsuz etkilediği belirtilmiştir [18]. Dış ortam koşullarına maruz kalan örneklerde test sonunda daha düşük parlaklık değeri görülmüştür.



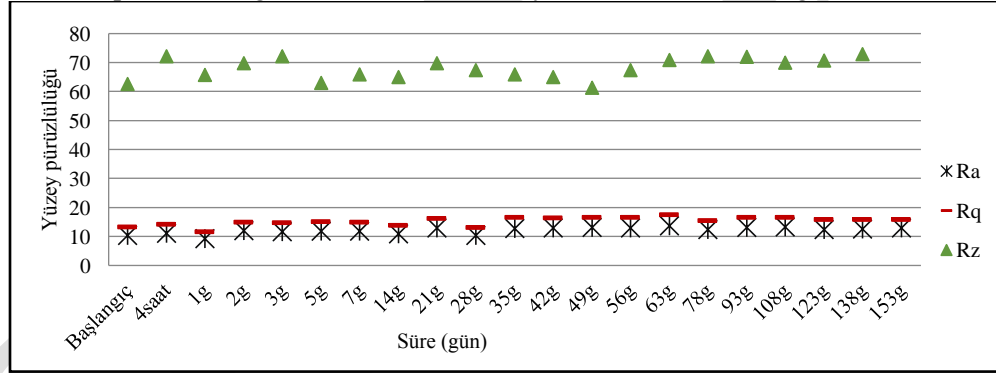
Şekil 3: Kayın kaplamalarına ait doğal yaşlandırma testi sonucunda oluşan parlaklık değerleri



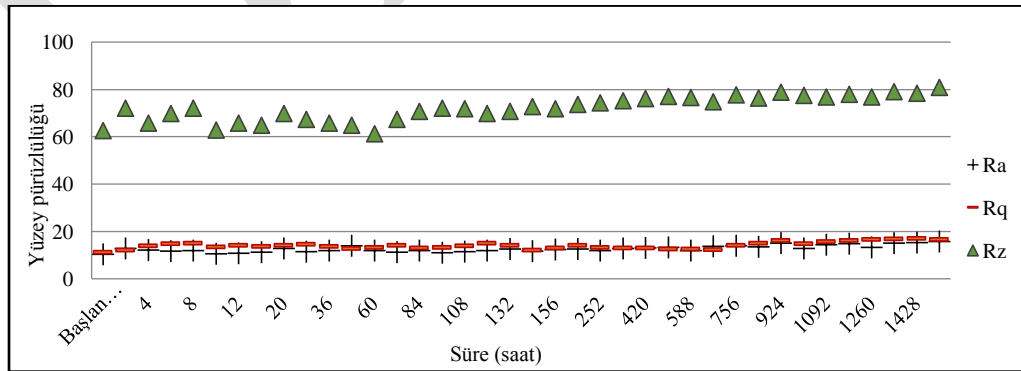
Şekil 4: Kayın kaplamalarına ait hızlandırılmış yaşlandırma testi sonucunda oluşan parlaklık değerleri

### Yüzey Pürüzlülüğüne Ait Bulgular

Örneklerin yüzey pürüzlülük değerleri hızlandırılmış yaşlandırma ve doğal dış ortam test süreleri boyunca artış göstermiştir. Doğal dış ortam koşullarına maruz kalan örneklerin maksimum pürüzlülük derinlik değeri (Rz) başlangıçta 62,61 iken test süresi sonunda 72,89 yükselmiştir. Hızlandırılmış yaşlandırma örneklerinin test başında Rz değeri 60,98, test süresi sonunda 80,91 olarak görülmektedir. UV, sıcaklık ve nemin etkisi ile yüzey tabakasında meydana gelen deformasyonların etkisi yüzeydeki pürüzlülüğü arttırmaktadır. UV radyasyonu, foto-oksidasyona, termal yaşlanmaya ve hidrolize sebebiyet vererek [25] ahşap kaplamanın kimyasal yapısında bulunan doğal polimer bağlarını kırılabilir ve bunun sonucu olarak mikro-makro çatlaklar oluşmaktadır ve bu değişimlerde pürüzlülüğü arttırmaktadır. İki farklı yaşlandırmaya maruz kalan test örneklerinin Ra ortalama pürüzlülük değeri ve Rq kuadratik ortalama pürüzlülük değerlerinde test süresi boyunca önemli bir artış gözlenmemiştir.



Şekil 4: Kayın kaplama test örneklerinin doğal yaşlandırmaya ait yüzey pürüzlülük değerleri



Şekil 5: Kayın kaplama test örneklerinin hızlandırılmış yaşlandırmaya ait yüzey pürüzlülük değerleri

## SONUÇ

Ticari açıdan ülkemiz için önemli yer kaplayan Kayın kaplama örnekleriyle yapılan çalışmada tüm bulgular göz önüne alındığında, herhangi bir kimyasal korunma sağlanmadan dış ortam koşullarına maruz kalan malzemenin bozulmasına neden olan çevresel etkiler aktif hale gelerek, renk ve parlaklık değişimi ile, yüzey pürüzlülüğünün artışı görülmektedir. Yapılan çalışmada dış ortama maruz kalan örneklerde test süresi sonunda koyu renk almış, 78. gün sonuna kadar yeşil renk parametresi gözlemlenirken, test sonuna doğru kırmızimsı renk almaya başlamış, yine 78. gün sonunda sarı renk parametresinde azalma gözlenmiştir. Dış ortama maruz kalan örnekler için ilk 78. günde, yüzey kimyasal yapısında değişimler olduğu düşünülebilir. Benzer şekilde hızlandırılmış yaşlandırma örneklerinin yüzeyi de test süresi sonunda koyu renk almıştır, fakat bu örneklerin  $\Delta a^*$  değeri test sonunda yeşil renk parametrelerini göstermektedir.  $\Delta b^*$  değerinde ilk 72. güne kadar sarılaşma görülürken, sonrasında test süresine kadar azalma eğilimi göstermiştir. Hızlandırılmış yaşlandırma testine maruz kalan örneklerin, dış ortam koşullarına bırakılan örneklere göre kimyasal yapısının özellikle lignin gruplarının daha fazla bozulduğu düşünülmektedir. Dış ortam testi örnekleri süre sonunda kırmızimsı hal alırken, hızlandırılmış yaşlandırma örneklerinin yeşilimsi görülmesini ilişkilendirebilmek için alınan ölçümler modelleme tekniğiyle ölçüm süreleri arasında bağlantı kurulmalıdır. Genel olarak belirtildiğinde hem dış ortam test örnekleri, hem de hızlandırılmış yaşlandırmaya maruz kalan örneklerin parlaklık ve yüzey pürüzlülük değerleri incelendiğinde, test süresi sonunda parlaklıkta azalma, yüzey pürüzlülük değerlerinin de arttığı görülmüştür. Ahşap malzemeyi daha uzun süre dış ortamda kullanabilmek için koruyucu kimyasal maddelerle muamele etmek önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma 1180759 nolu TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir. Çalışmada ölçümlerin yapılmasında Merve Cambazoğlu'na teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Feist, W. C. (1988). *Outdoor Wood Weathering And Protection*. In *Archaeological Wood: Properties, Chemistry, And Preservation*. Advances In Chemistry Series 225. Proceedings Of 196th Meeting Of The American Chemical Society (Pp. 25-28).
2. Turkoglu, T., Baysal, E., & Toker, H. (2015). *The Effects Of Natural Weathering On Color Stability Of Impregnated And Varnished Wood Materials*. Advances In Materials Science And Engineering, 20-15.
3. Evans, P. D., Michell, A. J., & Schmalzl, K. J. (1992). *Studies Of The Degradation And Protection Of Wood Surfaces*. Wood Science And Technology, 26(2), 151-163.
4. Williams, R. S., Knaebe, M. T., Sotos, P. G., & Feist, W. C. (2007). *Erosion Rates Of Wood During Natural Weathering. Part I. Effects Of Grain Angle And Surface Texture*. Wood And Fiber Science, 33(1), 31-42.
5. Feist, W. C., & Hon, D. N. S. (1984). *Chemistry of weathering and protection*. In *The chemistry of solid wood*. 401-451.
6. Kiguchi, M., Evans, P. D., Ekstedt, J., Williams, R. S., Kataoka, Y. (2001). *Improvement Of The Durability Of Clear Coatings By Grafting Of UV-Absorbers On To Wood*. Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions, 84(4), 263.
7. Lesar, B., Pavlič, M., Petrič, M., Škapin, A. S., Humar, M. (2011). *Wax Treatment Of Wood Slows Photodegradation*. Polymer Degradation And Stability, 96(7), 1271-1278.
8. Pandey KK, Vuorinen T (2008). *Comparative Study Of Photodegradation Of Wood By A UV Laser And A Xenon Light Source*. Polymer Degradation And Stability. 93:2138–2146.
9. Kataoka, Y., Kiguchi, M., Williams, R. S., & Evans, P. D. (2007). *Violet Light Causes Photodegradation of Wood Beyond the Zone Affected By Ultraviolet Radiation*. Holzforschung, 61(1), 23-27.
10. Anderson, E. L., Pawlak, Z., Owen, N. L., & Feist, W. C. (1991). *Infrared Studies Of Wood Weathering. Part I: Softwoods*. Applied Spectroscopy, 45(4), 641-647.
11. Tolvaj, L., & Mitsui, K. (2005). *Light Source Dependence Of The Photodegradation Of Wood*. Journal Of Wood Science, 51(5), 468-473.
12. Temiz, A. (2005). *The Effect Of Simulated Weathering On Preservative Treated Wood* (Doctoral Dissertation, Ph. D Thesis, Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey).
13. Temiz, A., Terziev, N., Eikenes, M., & Hafren, J. (2007). *Effect Of Accelerated Weathering On Surface Chemistry Of Modified Wood*. Applied Surface Science, 253(12), 5355-5362.



14. Williams, R.S. (2005). *Weathering of wood*, Handbook of wood chemistry and wood composites, Florida: CRC Press.
15. Müller, U., Rätzsch, M., Schwanninger, M., Steiner, M., & Zöbl, H. (2003). *Yellowing And IR-Changes Of Spruce Wood As Result Of UV-Irradiation*. Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology, 69(2), 97-105.
16. Söğütü, C., & Sönmez, A. (2006). *Değişik Koruyucular İle İşlem Görmüş Bazı Yerli Ağaçlarda Uv Işınlarının Renk Değiştirici Etkisi*. Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 21(1).
17. Hirose S, Hatakeyama H., (1986). *A kinetic study on lignin pyrolysis using the integral method*. Mokuzai Gakkaishi 32:621–625
18. Bucur, V., & Martin, P. A. (2011). *Delamination in wood, wood products and wood-based composites*, Dordrecht: Springer. 402.
19. Bozkurt, A.Y. & Erdin N. (2000). *Odun Anatomisi*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi.
20. Cakıcıer, N., Korkut, S., Korkut, D. S., Kurtoğlu, A., & Sönmez, A. (2011). *Effects Of QUV Accelerated Aging On Surface Hardness, Surface Roughness, Glossiness, And Color Difference For Some Wood Species*. International Journal Of Physical Sciences, 6(8), 1929-1939.
21. Evans, P., Chowdhury, M. J., Mathews, B., Schmalzl, K., Ayer, S., Kiguchi, M., & Kataoka, Y. (2005). *Weathering And Surface Protection Of Wood*. In Handbook Of Environmental Degradation Of Materials (Pp. 277-297).
22. Evans, P: D. (1988). *A Note On Assessing The Deterioration Of Thin Wood Veneers During Weathering*. Wood Fiber Science. 20(4):487-492.
23. Mitsui, K. (2004). *Changes in The Properties of Light-Irradiated Wood with Heat Treatment*. Holz als Roh- und Werkstoff, 62(1), 23-30.
24. Timar, M. C., Varodi, A. M., & Gurău, L. (2016). *Comparative Study Of Photodegradation Of Six Wood Species After Short-Time UV Exposure*. Wood Science And Technology, 50(1), 135-163.
25. Demirci, Z., Sonmez, A., & Budakçı, M. (2013). *Effect of thermal ageing on the gloss and the adhesion strength of the wood varnish layers*. BioResources, 8(2), 1852-1867.

## Nanoparticle containing coating of timber in outdoor applications

Eylem Dizman Tomak\*, Sebnem Sevil Arpaci

Bursa Technical University, Department of Forest Industry Engineering Mimar Sinan Campus, 16310 Bursa, Turkey

\*Corresponding author e-mail: eylem.dizman@btu.edu.tr

### Abstract

Timber as a construction and building material represents warmth, naturalness and provides a comfortable natural climate. The service life of timber in outdoor applications is influenced by both timber-inherent properties and environmental factors. Coatings are shown to be effective to protect timber against degradation agents. However, coatings without ultraviolet light absorbers and radical scavengers start to crack and peel in service lifetime of 1 or 3 years. In the last years, organic-inorganic hybrid materials containing of nano metal particles and organic coatings have received significant interest in timber protection industry.

In this study, it is aimed to improve weathering resistance of Scots pine samples by opaque coating containing zinc oxide nanoparticles. Samples were coated with nanoparticle containing coatings, and then were exposed to artificial weathering for 1512 h. Gloss, color and surface roughness changes were evaluated periodically during the test in comparison to initial stage of samples. At the end of the test, control samples had erosion, cracks and checks on the surface, furthermore, they all showed remarkable change in color and surface roughness measurements. In the case of coated samples no visible surface degradations were recorded during the test. In addition, nanoparticle containing coating protected samples against color changes. Smooth surfaces were also recorded for coated samples. Results showed that nanoparticle addition to coating improved surface performance of samples against outdoor degradation agents. It is recommended to use zinc nanoparticles in wood coating systems for better weathering performance and to extend the service life of timber constructions in outdoors.

**Keywords:** Weathering, timber, nano zinc oxides, coatings, color change

### INTRODUCTION

It has been known for a long time that wood is a naturally durable material that has been identified for its versatile, appealing engineering and structural properties [1]. Unfortunately, the surface of wood exposed to outdoor conditions results in a loss of initial color due to complex reactions [2]. The combined effect of solar radiation and other environmental factors like water, moisture, temperature, wind, sand and/or dust severely affect the life of timber under outdoor applications [3]. The solar ultraviolet (UV) radiation is the most damaging factor of the outdoor agents, and causes chemical, physical and mechanical changes on timber surfaces [4]. UV and visible radiation degrade wood polymers, especially to lignin, and cause photodegradation [5]. Application of a coating on wood surface can reduce the effects of outdoor conditions, and thus increase the lifespan of timber. Therefore, opaque coatings are often used to protect wood for outdoor applications against solar radiation, humidity and oxidation. Pigments can absorb the energy of solar radiation, restrict the wood photodegradation [6]. Transparent coatings usually do not ensure enough protection against UV because light penetrates into the coating and degrade wood under it [7]. For a long time, it is defined that hindered amine light stabilizers (HALS) and addition of ultraviolet light absorbers (UVAs) which interact with radicals and delay the photooxidative degradation of polymers [8]. UVAs filter out the harmful wavelengths of the light spectrum, therefore reduce the energy of solar radiation rate [9]. Recently, organic-inorganic UVAs consisting of metal oxide nanoparticles are received major interest. Among the inorganic UV absorbers, titanium dioxide, zinc oxide and cerium oxide have been commonly used for UV protection of wood coatings [10]. Nano-silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>), nano-titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) and nano-zinc oxide (ZnO) were used for the use of nanoparticles with the surface treatment agents, and nano ZnO provided better efficiency [11]. It has been also found that impregnation of wood with zinc oxide nanoparticles increases the resistance to solar ultraviolet radiation [12].

The aim of this study was to increase the resistance of Scots pine samples against outdoor conditions with opaque coating containing zinc oxide nanoparticles. The samples were treated with nanoparticle containing coatings and exposed to artificial weathering for 1512 hours. During the test period gloss, color and surface roughness changes were evaluated.

## MATERIALS AND METHOD

### Materials

Samples of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) 11 mm (radial) x 75 mm (tangential) x 152 mm (longitudinal) were prepared according to ASTM D 358-98 standard. Samples without any visible cracks and knots were the conditioned at 20°C and 65% relative humidity (RH) for 2 weeks before the treatments. Commercially available nano zinc (20nm; BYK3820) was supplied from Feza Companies, Istanbul Turkey. Opaque coating containing 5% nano metal oxide was prepared for coating the surfaces.

### Method

All test and control samples were exposed to an artificial weathering test (Atlas UV Test, USA) for 1512h according to ASTM G154 standard [13]. The weathering cycle comprised a continuous UV of 8h at 60°C afterwards a condensation for 4h at 50°C. Samples were measured at 24h intervals during the first 168h, thereafter at every 168h until the end of 1512h. A total of 15 color, gloss, surface roughness and macroscopic evaluations were made periodically.

Color measurements were done using the CIE L \* a \* b \* color system. L \* light chroma, a \* and b \* show chromatic coordinates (+ a \* for red, -a \* for green, + b \* for yellow, -b \* for blue). Measurements were done with 8 mm diameter sensor and 10° observer angle. The values were transferred to computer environment with Spectra Magic NX program. The gloss of wood samples was determined using a Micro-TRI-Gloss glossmeter according to ASTM D523-08 standard with 60° measurement geometry. Surface roughness was performed with Mitutoyo SJ-310 according to ISO 4287 standard.

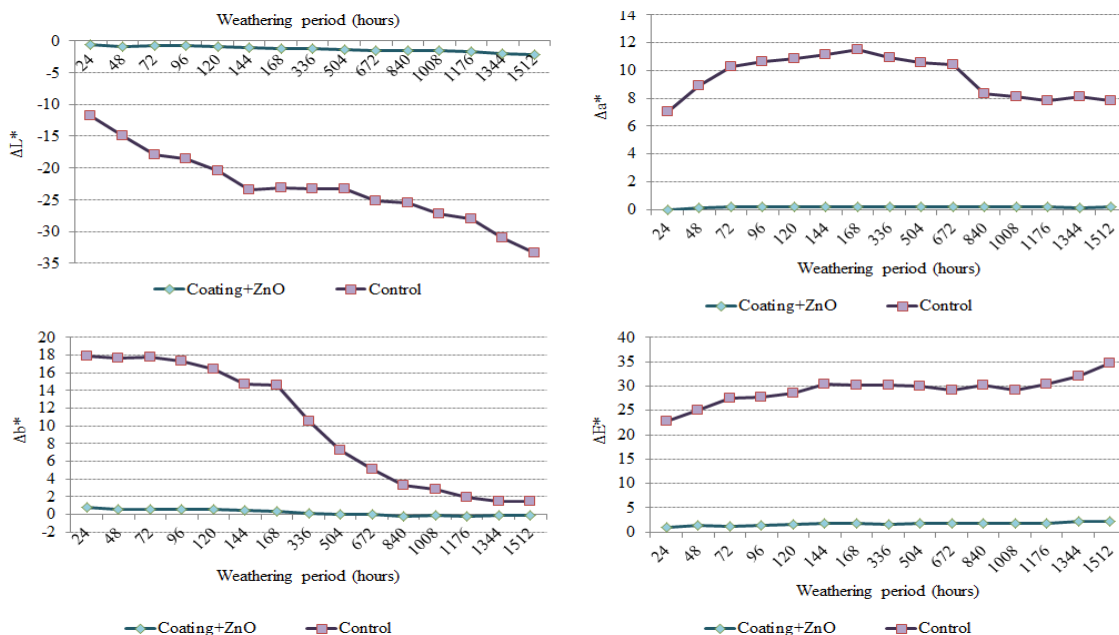
## RESULTS AND DISCUSSION

### Color Changes after Artificial Weathering

Figure1 presents the change of  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  and  $\Delta E$  for test and control samples after the weathering test. ZnO coated samples had a slight dark color ( $-\Delta L^*$ ) at the end of the test in comparison to initial periods. For values  $\Delta a^*$  and  $\Delta b^*$ , the coated wood showed nearly no color change throughout the total artificial weathering cycle. Wood used in outdoor conditions was effectively protected from yellowing using opaque coating containing zinc oxide nanoparticles. In the case of  $\Delta E$  of test samples, it is appeared a slight increase at the end of the test in comparison to initial periods. It is clearly seen than ZnO particles protected wood against color changes. Zinc oxide has a capability of ultraviolet and infrared absorption [16].

The  $\Delta L$  value of control samples increased from the initial period to 144 hours, then was almost constant, and after 672 hours, the darkening continued until the end of the test. The  $\Delta a$  value of control samples increased from the initial period to 72 hours, then was almost constant until 168 hours where  $\Delta a$  value slightly increased then decreased to almost same value to the 144 hours at 336 hours then remain constant until 672 hours. At 840 hours,  $\Delta a$  value almost decreased to initial value and remains constant until the end of the test. The  $\Delta b$  value of control samples constantly decreased from the initial period to 144 hours then was almost constant, and after 168 hours, and decreased dramatically at the 336 hours and continued to decrease constantly until the end of the test. Yellowing ( $\Delta b$ ) is the main color change caused by the photodegradation of lignin [20]. The  $\Delta E$  value of control samples increased from the initial period to 144 hours, then was almost constant until 1176 hours, after 1176 hours  $\Delta E$  value increased until the end of the test. Research on the chemical degradation of weathered wood has defined

that a radical-induced depolymerization of wood components occurs due to the absorption of UV light by lignin [17, 18]. Color of test samples was nearly stayed stable in comparison to controls during the test period.



**Figure 1:** Value of  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a$ ,  $\Delta b$  and  $\Delta E$  of control and test samples

As seen in Figure 2, no cracks were observed on the surface of the test samples. These samples showed a good stability to artificial weathering agents.

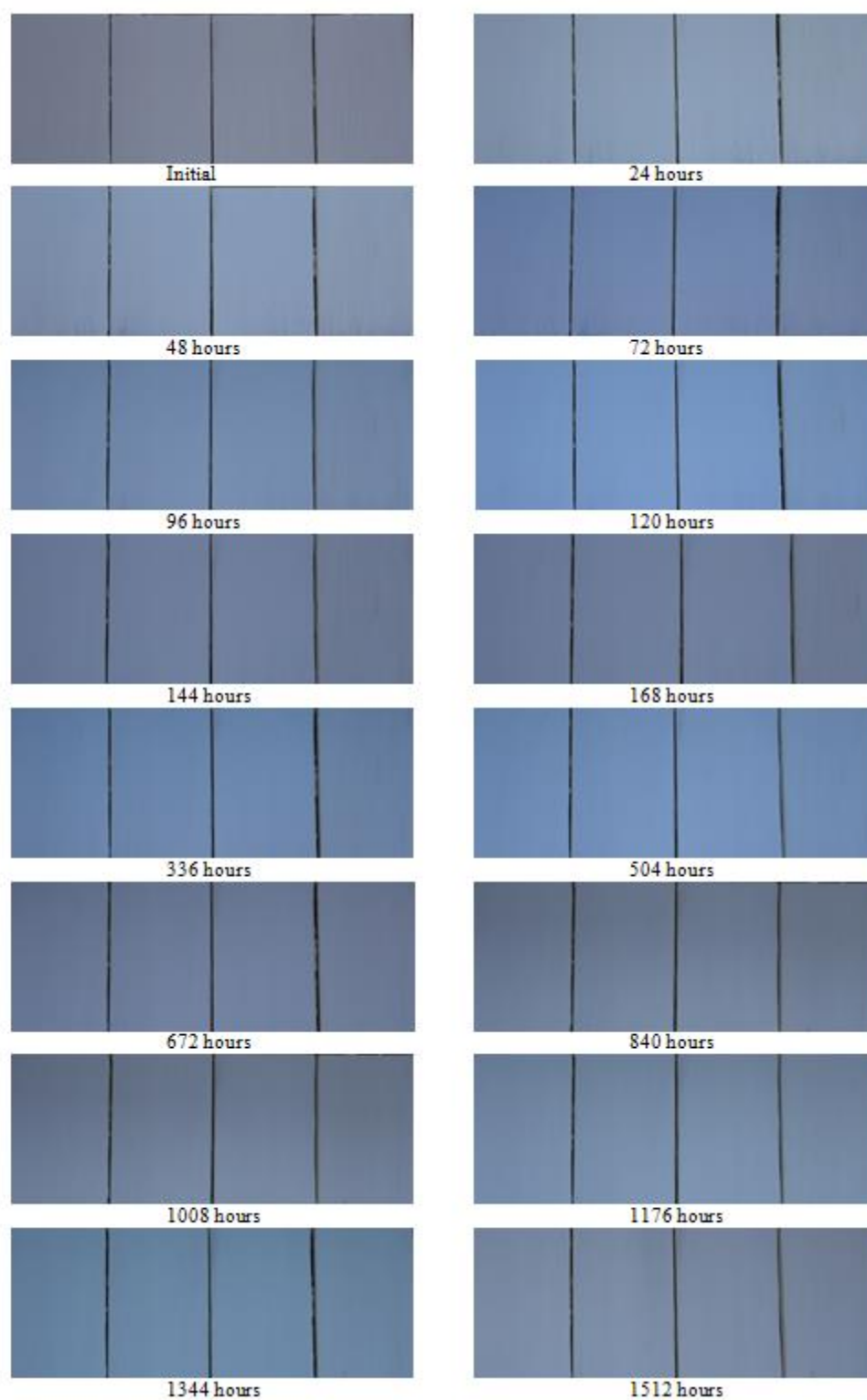
Figure 3 shows the initial and the latest appearance of control samples. It is macroscopically observed that control samples got dark color after 24 hours and continued to be dark until the end of the test. After 48 hours control samples started to get cracks. Number and depth of the cracks increased over time. After 336 hours some parts of the control samples started to get grayish color that is also increased until the end of the test. Most solubilized lignin degradation products are leached out by water. Therefore, fibers high in cellulose content and whitish-to-gray in color remain on the wood surface and seem greyish of surface [18].

### Gloss Changes after Artificial Weathering

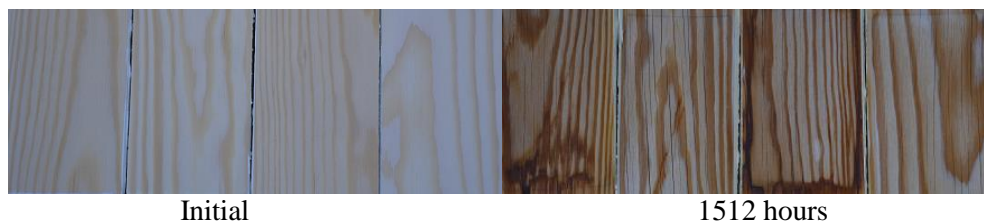
Figure 4 shows the gloss values of test and control samples. The gloss value of coated samples decreased from the initial period to 48 hours, and then remained almost constant between 48 – 144 hours, and after 144 hours, gloss value of the coated samples decreased until the end of the test. ZnO nanoparticles are photocatalytic active metal oxides and this type of particles form electron pairs, move away from the surface of the material and react to form free radicals with oxygen, water or hydroxyls [21]. Therefore, nano ZnO particles on the surface might be a reason for the decrease on the gloss values. Gloss of controls stayed nearly stable during the test period.

### Surface Roughness after Artificial Weathering

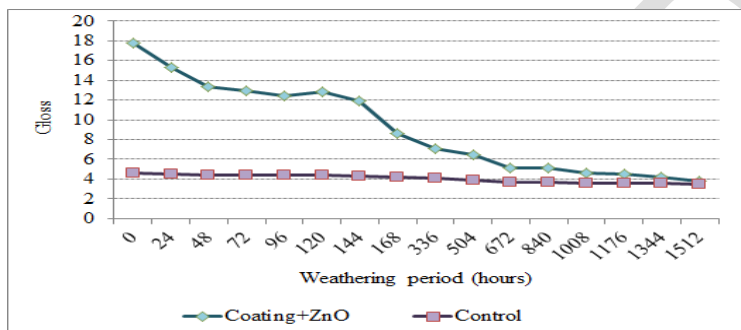
Figure 5 shows the surface roughness of samples. Roughness of control samples started to increase from the initial period to the end of the test. Surface cracks could increase the roughness of samples. During the artificial weathering test, internal and external stresses caused by water intake and outlet causes cracks on the wood [22]. Opaque coatings with zinc oxide nanoparticles did not have any visibly cracks and rifts during the artificial weathering. Roughness was slightly increased during the test period.



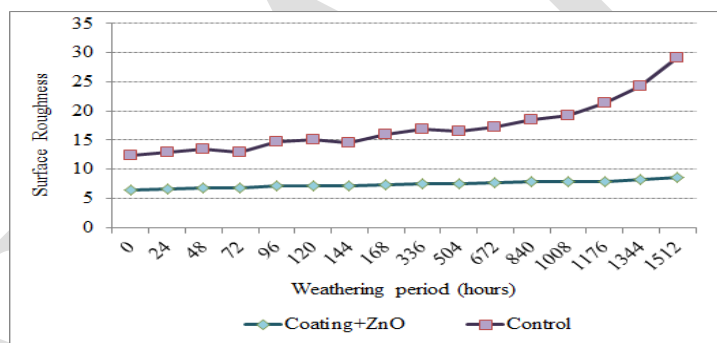
**Figure 2:** Images of coating samples after artificial weathering



**Figure 3:** Images of control samples after artificial weathering



**Figure 4:** Gloss values of control and test samples



**Figure 5:** Surface roughness of control and test samples

## CONCLUSIONS

In general, the condition of coating + ZnO was better than uncoated control samples after artificial weathering for 1512h. ZnO addition to coating increased weathering resistance of wood. The highest color and surface roughness changes were observed on the control samples. Visible surface degradations such as erosion and cracks occurred on control samples while no crack formations were recorded for coating + ZnO samples. Color change and surface roughness values of coated samples stayed nearly stable during the weathering period. However gloss values of coated samples decreased along with the weathering period. ZnO nanoparticles did not protect wood against gloss loss. Addition of ZnO nanoparticles to the coating may block the UV lights completely to reach the wood surface. Combination of other metal oxide nanoparticles with the coating can be studied for further improvements on gloss loss.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Feza Chemistry, Istanbul, Turkey for supplying the free-sample of nano zinc oxides. Graduate student Ömür Ahmet Yazıcı at BTU is appreciated for his assistance in the experiments.

## REFERENCE

26. Anderson, E. L., Pawlak, Z., Owen, N. L., & Feist, W. C. (1991). Infrared Studies Of Wood Weathering. Part I: Softwoods. *Applied Spectroscopy*, 45(4), 641-647.
27. Derbyshire, H., & Miller, E. R. (1981). The photodegradation of wood during solar irradiation. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 39(8), 341-350.
28. Williams, R. S., Knaebe, M. T., & Feist, W. C. (2007). Erosion rates of wood during natural weathering. Part II. Earlywood and latewood erosion rates. *Wood and fiber science*, 33(1), 43-49.
29. Rasouli, D., Dintcheva, N. T., Faezipour, M., La Mantia, F. P., Farahani, M. R. M., & Tajvidi, M. (2016). Effect of nano zinc oxide as UV stabilizer on the weathering performance of wood-polyethylene composite. *Polymer Degradation and Stability*, 133, 85-91.
30. Nejad, M., & Cooper, P. (2017). Exterior wood coatings. *Wood in Civil Engineering*.
31. Landry, V., & Blanchet, P. (2012). Weathering resistance of opaque PVDF-acrylic coatings applied on wood substrates. *Progress in Organic Coatings*, 75(4), 494-501.
32. Tomak, E. D., Arican, F., Gonultas, O., & Parmak, E. D. S. (2018). Influence of tannin containing coatings on weathering resistance of wood: Water based transparent and opaque coatings. *Polymer Degradation and Stability*, 151, 152-159.
33. Schaller, C., Rogez, D., & Braig, A. (2008). Hydroxyphenyl-s-triazines: advanced multipurpose UV-absorbers for coatings. *Journal of Coatings Technology and Research*, 5(1), 25-31.
34. Schaller, C., Rogez, D., & Braig, A. (2009). Hindered amine light stabilizers in pigmented coatings. *Journal of Coatings Technology and Research*, 6(1), 81-88.
35. Tomak, E. D., Yazici, O. A., Parmak, E. D. S., & Gonultas, O. (2018). Influence of tannin containing coatings on weathering resistance of wood: Combination with zinc and cerium oxide nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 152, 289-296.
36. Zhou, S., Limin, W., Xiong, M., He, Q., Chen, G. (2005). "Dispersion and UV-VIS Properties of Nanoparticles in Coatings", *Journal of Dispersion Science and Technology*, 25 (4), 417-433.
37. Clausen, C. A., Green, F., & Kartal, S. N. (2010). Weatherability and leach resistance of wood impregnated with nano-zinc oxide. *Nanoscale research letters*, 5(9), 1464.
38. ASTM G154. (2006). Standard Practice for Operating Fluorescent Light Apparatus for UV Exposure of Nonmetallic Materials, American Society for Testing and Materials.
39. ASTM D523-08. (2008) Standard Test Method for Specular Gloss. West Conshohocken, PA: ASTM International.
40. ISO 4287. (1997) Geometrical Product Specifications (GPS) - Surface texture: Profile Method -Terms, Definitions and Surface Texture Parameters. International Organization for Standardization.
41. Weichelt, F., Beyer, M., Emmler, R., Flyunt, R., Beyer, E., & Buchmeiser, M. (2011, March). Zinc Oxide Based Coatings for the UV-Protection of Wood for Outdoor Applications. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 301, No. 1, pp. 23-30). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
42. Pandey KK, Vuorinen T (2008). *Comparative Study Of Photodegradation Of Wood By A UV Laser And A Xenon Light Source*. *Polymer Degradation And Stability*. 93:2138–2146.
43. Feist, W. C. (1988). *Outdoor Wood Weathering And Protection*. In *Archaeological Wood: Properties, Chemistry, And Preservation*. Advances In Chemistry Series 225. Proceedings Of 196th Meeting Of The American Chemical Society (Pp. 25-28).
44. Persze, L., & Tolvaj, L. (2012). Photodegradation of wood at elevated temperature: Colour change. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 108, 44-47.
45. Tolvaj, L., & Mitsui, K. (2005). Light source dependence of the photodegradation of wood. *Journal of wood science*, 51(5), 468-473.
46. Saha, S., Kocaefe, D., Boluk, Y., Pichetta A. (2013b). "Surface Degradation of CeO<sub>2</sub> Stabilized Acrylic Polyurethane Coated Thermally Treated Jack Pine During Accelerated Weathering", *Applied Surface Science*, 276, 86-94.
47. Feist, W. C., & Hon, D. N. S. (1984). Chemistry of weathering and protection. In *The chemistry of solid wood*. 401-451.

## Monosodyum glutamat

Nurhayat Atasoy<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Yuzuncu Yil University, Faculty of Science, Department of Chemistry/Biochemistry Section, Van/Turkey

nurhayatatasoy@gmail.com

### Özet

Monosodyum glutamat, kısaltılmış adıyla MSG ya da koduyla E621, glutamat amino asidinin sodyum tuzu olup hazır gıdalarda sıkça kullanılan bir lezzet arttırıcıdır. MSG, tükürük salgısını arttırarak gıdanın lezzet özelliklerini güçlendirmekte, daha sık ve hızlı yeme isteği uyandırmaktadır. Günümüzde MSG'nin insan sağlığı üzerine olası etkilerini değerlendiren çalışmalar halen sürmektedir. Bu konuda birbirinden farklı görüşler olmakla birlikte MSG kullanımının yasaklanmasını gerektirecek derecede bilimsel kanıt bulunmamaktadır. Ancak pek çok insan için, MSG'nin zararlı etkilerinin olabileceğinin tartışılıyor olması ve zararsız olduğunun da tam olarak kanıtlanamaması kullanımında çekincelere neden olmaya yetmektedir. Lezzetlendirici olarak kullanıldığında göğüs ağrısı, baş ağrısı, yüzde kızarıklık, nefes darlığı, ödem ve terlemeye neden olduğu bilinmektedir. Buna Çin Restoranı Sendromu denir. Neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu öne sürülmektedir. MSG'nin obezite ile ilgili komplikasyonlara yol açtığı ve biyokimyasal parametreleri etkilediği belirtilmektedir. Sonuç olarak bu derlemenin amacı, MSG'nin zararlı etkilerinin ne olduğunun bilinmesi için bilimsel çalışmalar yoğunluk kazanmalı ve insanlar bu konuda bilinçlendirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Monosodyum glutamat, İnsan sağlığı, fast food

### Monosodium glutamate

#### Abstract

Monosodium glutamate, with abbreviated name MSG or code E621, is a sodium salt of glutamate amino acid, which is a flavor enhancer commonly used in fast food productions. By increasing saliva secretion, MSG strengthens the flavor properties of food and causes a desire to eat more often and faster. Currently, there are ongoing studies evaluating the possible effects of MSG on human health. Although there are different opinions on this issue, there is no scientific evidence that would require the prohibition of the MSG use. However, for many people, the fact that MSG might have harmful effects and that its harmless has not been fully proved is sufficient to cause hesitations in the use of MSG. It is known that it causes chest pain, headache, rash on the face, shortness of breath, edema and sweating when used as a flavor enhancer. This is called Chinese Restaurant Syndrome. Along with the data revealing its harmful effects on the nervous system, retina, kidneys in case of excessive use in the neonatal period, it is suggested that it causes disorders in learning and memory mechanism and in advanced ages it causes obesity, infertility, growth disorders and neurodegenerative conditions such as Alzheimer, Parkinson and epilepsy. It is stated that MSG causes obesity related complications and affects biochemical parameters. In conclusion, the aim of this review is to intensify scientific studies for the sake of knowledge regarding the harmful effects of MSG and to raise awareness on this topic.

**Keyword:** Monosodium glutamate, human health, fast food

### GİRİŞ

Beslenme ve teknolojideki gelişme ve son yenilikler, eski dönemlerde karşılaşılan bazı sorunları ortadan kaldırırken, bazı yeni sorunlar getirmiştir. Sağlıklı beslenme, özellikle yaşanan bir popülasyonda, yaşam kalitesini korumak için çok önemlidir. Gelişen teknolojinin getirdiği yeni üretim teknikleri ve tüketicinin gıda tüketiminde çeşitlilik kazanması sonucunda, gıda katkı maddeleri (GKM) besin endüstrisinde kullanılması her geçen gün artmıştır (Löliğer, 2000). Lezzetli gıda üretiminde tatlandırıcı sistemler hayati öneme sahiptir. Endüstriyel olarak hazırlanan birçok gıda, özellikle tipik lezzetleri nedeniyle tüketiciler için çok cazip olmaktadır. Bu nedenle, üreticinin, tipik umami tat ve lezzet arttırma sistemlerini taşıyan gıda veya gıda bileşenlerinin kullanımına büyük



ilgi göstermesi şaşırtıcı değildir. Tatlandırıcılar, gerekli çekiciliği sağlayarak, özellikle çok lezzetli olmayan gıdalarda, önemli bir besin rolü oynayabiliyor (Loliger, 2000).

Gıda güvenliği en başta Dünya Sağlık Örgütü olmak üzere tüm sağlık otoritelerinin öncelikli konusudur. Bu otoriteler tarafından belirlenen ve üzerinde yoğun çalışmalar yürütülen 3 temel konu vardır. Bunlar, standart dışı gıda üretimi, gıdalardaki mikrobiyolojik ve kimyasal kirliliklerdir. Gıda katkı maddelerinin tarihsel gelişimlerinin iki şey etki etmektedir. Bunlardan birincisi; gelişen teknoloji paralelinde gıda saklama yöntemlerinin geliştirilmesine duyulan gereksinimdir. İkinci etki ise; tüketici nezdinde gıdaların mevcut kalitesinin daha iyi algılanmasını sağlamaktır. Bu etkilerden ilki uluslararası gıda ticareti de düşünülünce, bu maddelerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Gıda katkı maddelerinin dünyadaki pazarı 1900'lü yıllarda 10 milyar dolara ulaşmış olup, günümüzde bu sayının çok üzerindedir (Altuğ, 2001).

### **Gıda Katkı Maddelerinin Tanımı**

Sağlık Bakanlığının gıda katkı maddeleri yönetmeliğindeki tanımı şöyledir; "Normal şartlarda tek başına tüketilmeyen veya gıda hammaddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler" olarak tanımlanır (Sağlam, 2000). Ancak; gıdaların besin değerini yükseltmek veya sahte gıdalara katılan sahte maddeler bu gruba girmezler (Bağcı, 1995).

### **Gıda Katkı Maddeleri Kullanımında Dikkat Edilecek Noktalar**

- 1- İnsan sağlığına zararlı olmamalı ve bu yasalarla belirlenmiş olmalıdır.
- 2- Kullanımında teknolojik zorunluluk bulunmalıdır.
- 3- İzin verilen besinlerde ve izin verilen miktarlarda kullanılmalıdır.
- 4- Besinin besin değerini azaltmamalıdır.
5. Gıda katkı maddeleri kalitenin korunması amacıyla kullanılmalı, kötü kaliteyi gölgelemek amacıyla kullanılmamalıdır.
6. Gıda katkı maddeleri doğal, doğala özdeş veya yapay olabilir (Altuğ, 2001).

### **Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması**

Gıda katkı maddelerini kullanım amaçlarına göre 4 grupta toplayabiliriz.

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular)
2. Yapıyı ve hazırlama, pişme özelliğini geliştirenler
3. Aromayı ve rengi geliştiriciler
4. Besin değerini koruyucu, geliştiriciler (Besin öğeleri), (Bağcı, 1995).

### **Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonları**

Asitliği düzenleyiciler, Topaklanmayı önleyiciler, Antioksidanlar, Antimikrobiyal maddeler, Stabilizörle, Jelleştiriciler, Tatlandırıcılar, Renklendiriciler, Emülgatörler, Lezzet (tat ve koku) maddeleri, Lezzet artırıcılar (Janssen, 1997).

**Lezzet artırıcılar (Mono Sodyum Glutamat, MSG-E621):** Aromayı daha cazip hale getirmek, doğal aromayı düzeltmek veya korumak amacıyla besinlere katılırlar. 20. yüzyılın başlarında Tokyo Üniversitesi'nden Profesör Ikeda domates, peynir, kuşkonmaz ve ette tatlı, acı, ekşi ve tuzlunun dışında bir tad olduğunu keşfetti. Bu beşinci tada Japonca'da lezzetli anlamına gelen "Umami" adını verdi. Daha sonra Japon mutfağında 1000 yıldır geleneksel olarak kullanılan kombu isimli bir çeşit deniz yosunundan bu tadı veren maddeyi izole etti. Bu madde glutamik asit idi. Daha sonra, suda kolay çözünmesini sağlamak için glutamik asitin sodyum tuzu (MSG) hazırlandı (Ikeda, 2002). Bu madde glutamik asit idi. Daha sonra, suda kolay çözünmesini sağlamak için glutamik asitin sodyum tuzu (MSG) hazırlandı. Tat reseptör fizyolojisi ile ilgili çalışmalar 5. temel tadın mevcudiyetinin doğruluğunu kanıtlamıştır. Söz konusu maddenin en önemli özelliği, tükürük salgısını artırarak lezzet profilindeki özellikleri ortaya çıkarmasıdır (Schiffman, 2000).

Glutamik asit, insan dahil her canlı organizmada bolca bulunan bir kimyasal maddedir ve insanın yapısını oluşturan 20 amino asitten biridir. Et, süt, balık ve bazı sebzeler gibi proteince zengin tüm gıdalar doğal olarak yüksek miktarlarda glutamat ihtiva ederler (IFIC, 1994). Örneğin 100 gram anne sütünde, 229 miligram proteine bağlı glutamat ve 22 miligram da serbest glutamat bulunur (IFIC, 1994).

Ancak pek çok insan için, MSG'nin zararlı etkilerinin olabileceğinin tartışılıyor olması ve zararsız olduğunun da tam olarak kanıtlanamaması kullanımında çekincelere neden olmaya yetmektedir. MSG, Amerika, Avrupa Birliği ve Türk Gıda mevzuatlarına göre kullanımı yasal olan bir gıda katkı maddesidir.

En son 22.05.2008 tarihinde güncellenen Türk Gıda Kodeksi "Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği"ne göre tüm gıda maddelerinde glutamik asit veya tuzlarının kullanım limiti 10 g/kg, çeşni maddelerinde ise QS (Belirlenmemiş miktar, Quantum Satis) olarak verilmektedir. Amerika'da ise serbest toplam glutamat miktarı yüksek olan gıdalarda bu değer etiket üzerinde belirtilmesi ön görülmüştür. Tüm katkı maddeleri için olduğu gibi MSG için de doz kritik olan husustur. Sonuç olarak, doğrudan bir ilişki tespit edilememekle birlikte MSG'nin bazı hassas gruplarda allerjik reaksiyonlara sebep olabileceği çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda, MSG'nin alındığı miktara ve kişinin sağlık özelliklerine bağlı olarak kusma, baş ağrısı, kasılma ve güçsüzlük gibi kısa süreli etkilerin görülebildiği öne sürülmektedir (Diniz ve ark., 2005).

## TARTIŞMA

MSG, Amerika, Avrupa Birliği ve Türk Gıda mevzuatlarına göre kullanımı yasal olan bir gıda katkı maddesidir. En son 22.05.2008 tarihinde güncellenen Türk Gıda Kodeksi "Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği"ne göre tüm gıda maddelerinde glutamik asit veya tuzlarının kullanım limiti 10 g/kg, çeşni maddelerinde ise QS (Belirlenmemiş miktar, Quantum Satis) olarak verilmektedir.

Günümüzde MSG'nin insan sağlığı üzerine olası etkilerini değerlendiren çalışmalar halen sürmektedir. Thomas ve ark. (2015)'lerinin yapmış olduğu çalışmada, art arda 20 gün boyunca 8 mg/g dozda MSG sıçanlara oral olarak verilmiştir. Serum alanin amino transferaz (ALT) ve aspartat amino transferaz (AST), aktiviterinde anlamlı artış gözlemlenmiştir.

Rodentlarda MSG alımı insülin direnci (Sasaki ve ark., 2009) ve obezite (Olney, 1969) riskini arttırdığı bulunmuş ve günlük insan diyetini aşabilen konsantrasyonlar iştahı düzenleyen hipotalamik bölgede potansiyel hasar verdiği belirtilmiştir (Hermanussen ve Tresguerres, 2003).

Son araştırmalar MSG maruziyetinin hayvan ve insanlarda ciddi bozukluklarla sonuçlanabilen metabolik değişiklikler ürettiğini göstermiştir (Diniz ve ark., 2005; Insawag ve ark., 2012; Rotimi ve ark., 2012).

Bir çok deneysel çalışmada MSG'nin karaciğer, beyin, timus ve böbrek gibi çeşitli organlarda toksik olduğu gösterilmiştir (Diniz ve ark., 2004; Forombi ve Onyema, 2006). Shrestha ve ark. 2018'de Monosodyum Glutamatın Wistar Albino Ratların Karaciğer Dokusu Üzerine Etkileri adlı bir çalışmada ise karaciğer enzimi alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz ve gama-glutamiltansferaz serumda, MSG uygulama grubunda kontrol grubuna göre arttığını bulmuşlar. Sonuçlar, MSG verilen ratların karaciğer histolojisini ve karaciğer fonksiyonunu etkilediğini göstermişlerdir.

Neonatal dönemde aşırı kullanımının sinir sisteminde, retinada, böbreklerde zararlı etkilerini bildiren verilerin yanı sıra öğrenme ve bellek mekanizmasında bozukluklara yol açtığı, ileri yaşlarda ise obezite, kısırlık, büyüme bozukluğu, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu öne sürülmektedir (Colucci ve Grovun, 1993; Macho ve ark., 2000; Hermanussen ve Tresguerres 2003).

## SONUÇ

Tüm katkı maddeleri için olduğu gibi MSG için de doz kritik olan husustur. Normal koşullarda fayda sağlamak amacıyla gıdaya ilave edilen çeşitli maddeler bazı durumlarda olumsuz etkilere de sebep olabilmektedir. Bu durum genellikle katkı maddesinin fazla veya yanlış kullanımı, üretimin veya depolamanın yanlış bir basamağı sırasında ilavesi veya katkı maddesinin saflığının ya da kalitesinin düşük olması nedenleri ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, katkı maddelerinin, ara basamak ürünlerinin ve son ürünün kalite ve güvenilirlik açısından düzgün şekilde kontrollerinin yapıldığı bilinen, Tarım Bakanlığı tarafından onay almış, denetlemelere tabi tutulan ürünlerin tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Ancak bu şekilde, diğer tüm konularda olduğu gibi katkı maddelerinin

uygunlamasında da gerekli kontrollerin yapıldığına güvenmek mümkün olacaktır. Aksi takdirde kontrolsüz şekilde tatbik edilen herhangi bir başka madde de sağlık üzerinde olumsuz etkilere sebep olabilecektir. Burada dikkate alınması gereken husus, herhangi bir maddenin güvenliğinden bahsederken bunun çevre koşullarından, beraberinde tüketilen diğer maddelerle olan etkileşiminden, miktarından ve maruz kalma süresinden bağımsız düşünülemezdir. Sonuç olarak bu derlemenin amacı, MSG'nin zararlı etkilerinin ne olduğunun bilinmesi için bilimsel çalışmalar yoğunluk kazanmalı ve insanlar bu konuda bilinçlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

- Altuğ T 2001. Gıda Katkı Maddeleri. Meta Basım, İzmir.
- Bağcı T 1995. "Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontrolü"; Halk Sağlığı Temel Bilgiler. Güneş Kitapevi Ltd. Ankara.
- Diniz YS, Fernandes AA, Campos KE, Mani F, Ribas BO, Novelli EL 2004. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chem Toxicol*, 42(2):313-319.
- Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigue HG, Ebai GX, Burneik RC, Cicogna AC, Novelli EL 2005. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*, 21(6): 749-755.
- Farombi E, Onyem OO 2006. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum Exp Toxicol*, 25(5): 251-259.
- Hermanussen M, Tresguerre JA 2003. Does high glutamate intake cause obesity? *J Pediatr Endocrinol Metab*, 16 (7): 965-968.
- IFIC. Review on Monosodium Glutamate:Examining the Myths, 1994.
- Iked K 2002. "Yeni çeşniler". *Kimyasal Duyular*. 27 (9):847-849.
- Insawang T, Selmi C, Cha'on U, Pethlert S, Yongvanit P, Areejitranusorn P, Boonsiri P, Khampitak T, Tangrassameeprasert R, Pinitsoontorn C, Prasongwattana V, Gershwin ME, Hammock BD 2012. Monosodium glutamate (MSG) intake is associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. *Nutr Metab (Lond)*, 9(1): 50.
- Loliger J 2000 Function and importance of glutamate for savory foods. *Journal of Nutrition* , 130 , 915S-920S.
- Macho L, Fickova M, Zorad S 2000. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiol Res*, 49, S79-85.
- Olney JW 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164, (3880): 719-721.
- Sasaki Y, Suzuki W, Shimada T, Iizuka S, Nakamura S, Nagata M, Fujimoto M, Tsuneyama K, Hokao R, Miyamoto K, Aburada M, 2009. Dose dependent development of diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis in monosodium glutamate-induced obese mice. *Life Sci*, 85 (13-14): 490-498.
- Shrestha , Jha CB, Lal Das BK, Yadav P 2018. Effects of Monosodium Glutamate on Liver Tissue of Wistar Albino Rats – A Histological And Biochemical Study. *International Journal of Therapeutic Applications*, Volume 35.
- Schiffman SS 2000. Intensification of sensory properties of foods for the elderly. *Journal of Nutrition* , 130 , 927S-930S.
- Rotimi OA, Olayiwola IO, Ademuyiwa O, Balogun EA 2012. Effects of fibre-enriched diets on tissue lipid profiles of MSG obese rats. *Food Chem Toxicol*, 50 (11): 4062- 4067.
- Thomas M, Sujatha KS, George S 2009. Protective effect of Piper longum Linn. on monosodium glutamate induced oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol*, Mar;47(3):186-92.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete. Sayı: 23172 16.Kasım 1997.
- Janssen MMT. Food Additives. deVries J(Ed). Food Safety and Toxicology. CRC Press.USA, 1997.
- Walker, R., Lupien, J.R. The safety evaluation of monosodium glutamate. *Journal of Nutrition* 2000 , 130 , 1049S-1052S.
- Walker and Lupien, 2000. The Safety Evaluation of Monosodium Glutamate. *J. Nutr.* 130: 1049–1052.

## Yüksek kaliteli kömürün Hummers yöntemi ile oksidasyonu

Recep Berk Alp<sup>1</sup>, Ömer Faruk Dilmaç<sup>1</sup>, Barış Şimşek<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

\* barissimsek@karatekin.edu.tr

### Özet

Dünya genelinde 323,6 milyar tona yakın miktarda kömür rezervlerinin olduğu bilinmektedir. Kömürün birçok kullanım alanının yanında nano teknolojik alanda da kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada hem kömürün katma değerini artırmak hem de grafen oksit sentezinde grafitin yüksek maliyetinden kaçınmak için karbon kaynağı olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmada grafit yerine kömür kullanılmış ve Hummers metoduyla okside edilmiştir. Üretilen okside kömürün karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Raman spektrometresi ile gerçekleştirildi. Okside edilen kömür, grafitte benzer karakteristik özellikler göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kömür oksidasyonu, Kömür, Grafen oksit, Hummers Method.

### GİRİŞ

Kömür, dünyadaki enerji kaynaklarının yaklaşık %40'ını oluşturan çok önemli fosil yakıtlardan biridir (Song ve ark., 2014). Günümüzde, kömürün kullanım alanlarını daha cazip hale getirmek için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır (Demirbilek, 1987). Karbon bazlı nanomalzemeler istisnai fiziksel ve kimyasal karakteristikleri ile umut vaat etmektedir. Örneğin, ilk olarak 1991'de rapor edilen karbon nanotüpler ve 2004'te keşfedilen grafenin olağanüstü mekanik mukavemet ve elektriksel iletkenlikleri; kömürün alternatif bir karbon kaynağı olarak kullanılmasının yolunu açmıştır. Doğal bir kaynak olan kömür; karbon nanotüpleri, nano lifler / parçacıklar / küreler, grafen, grafen oksit (GO), grafen kuantum noktaları ve karbon noktaları gibi karbon nanomalzemeleri için sürdürülebilir bir alternatif olarak kabul edilir (Hassan ve ark., 2018).

Grafenin üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri ilk olarak Konstantin Novoselov ve Andre Geim tarafından 2004 yılında belirlenmiştir. Novoselov ve Geim (2004)'de; bir Scotch bant kullanarak kurşun kalemde grafit katmanının ayrılması ve kararlı bir şekilde SiO<sub>2</sub> alt taşına aktarılmasını sağlamışlardır. Grafenin yapısı ve özellikleri üzerine öncü araştırma yaptıkları için Geim ve Novoselov'a 2010 yılında Nobel Fizik Ödülü verilmiştir (Geim ve Novoselov 2004; Geim ve Novoselov, 2010). Grafen son yıllardan yapılan araştırmalarla birlikte kimyasal ve fiziksel olarak birçok yöntemle elde edilebilir bir hale gelmiştir. Kimyasal elde etme yöntemi düşük maliyet ve büyük ölçekte grafen elde edilebilmesi sebebi ile tercih edilmektedir (Tiyek ve ark., 2016). GO' nun sentezi için en önemli ve yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntem 1958'de Hummers ve Offeman tarafından geliştirilmiştir (Hummers Jr ve Offeman, 1958). Grafen oksit sentezi için Hummers yönteminde sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sodyum nitrat (NaNO<sub>3</sub>), potasyum permanganat (KMnO<sub>4</sub>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi kimyasallar tercih edilmiştir (Chen ve ark., 2013).

Grafitin maliyeti nedeniyle; kömür, grafen üretimi için karbon kaynağı olarak grafit yerine kullanılabilir (Purwandari ve ark., 2018). Grafen üretiminde önemli bir öncü malzeme olan GO, genellikle Hummers Yöntemi adı verilen kimyasal olarak grafitin oksidasyonu ile sentezlenir (Gea ve ark., 2018).

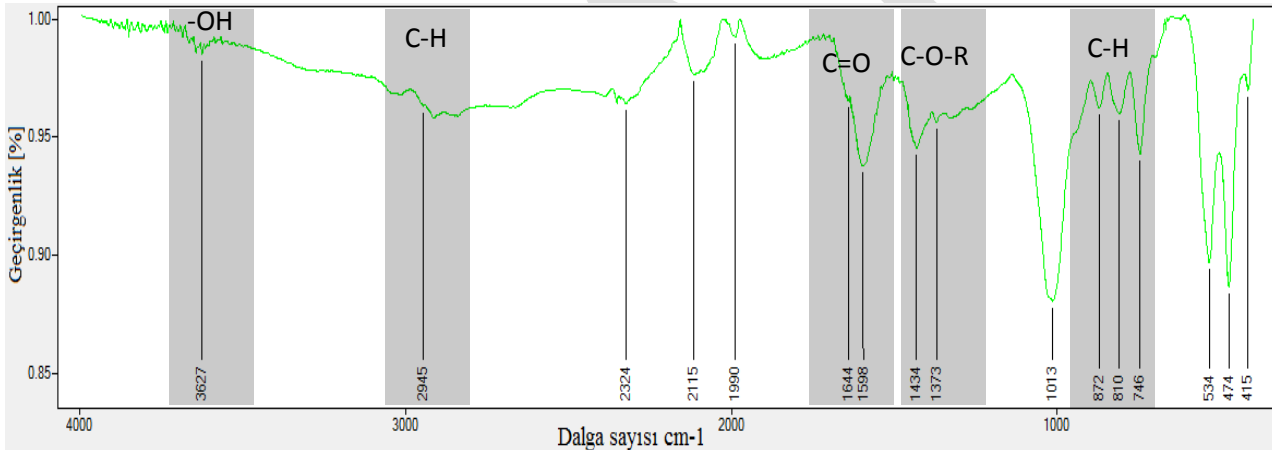
Bu çalışmada, Türkiye Taş Kömürü (TTK) işletmesinden alınan taş kömürü grafit yerine karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Hummers yöntemi ile kömürün oksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Okside edilen kömürün karakterizasyonu Raman, FTIR ve SEM-EDX analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Malzeme

Deneyleerde kullanılan bitümlü kömür TTK işletmesinden temin edilen Çatalağzı havzasından temin edilen taş kömürdür. Deneyle sırasında sıcaklığın 5°C'nin aşağısında tutulması için deneylelerin her aşamasında Polyscience 15L soğutmalı su sirkülatörü kullanılmıştır. Merck firmasından temin edilen sülfürik asit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%95-98), sodyum nitrat NaNO<sub>3</sub> (%99) ve potasyum permanganat KMnO<sub>4</sub> (%99) kömürün oksidasyonu için kullanılmıştır. Metal iyonlarının uzaklaştırılması için hidroklorik asit HCl (37% Sigma Aldrich) ve reaksiyonun sonlandırılması için hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, %35) kullanılmıştır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) FEI QUANTA FEG 250 enerji yayımlı X-ışını (EDX) ile Raman spektroskopisi analizleri Namık Kemal Üniversitesi Teknoloji Uygulama Merkezi (NABİLTEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ise analizi Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

Kömür numunesinin öğütme işlemi yapıldıktan sonraki FTIR analizi spektrum deseni Şekil 1'de verilmiştir. Kömür örneğinde 3700-3500 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gözlenen adsorpsiyon bandı, hidrojen bağları içeren hidroksil bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. 2985-2650 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gözlenen bant simetrik ve asimetric C-H bağlarını temsil etmektedir ve yapıdaki metil ve metilen gibi alkil gruplarının varlığını göstermektedir. 1600-1700 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gözlenen pik ise, C=O bağlarını temsil eden ve yapıdaki karboksil gruplarını simgelemektedir. 1000-1800 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gözlenen ve C=O ile C-O-R bağlarını temsil eden piklerde FTIR deseninde gözlemlenmektedir. Genel olarak literatürde bulunan kömürün FTIR analizleri ile karşılaştırıldığında, benzer pikler gözlenmiştir (Gülen ve ark., 2012; Balachandran, 2014; Gafur, 2015).



Şekil 1. Kömürün FTIR spektrumları

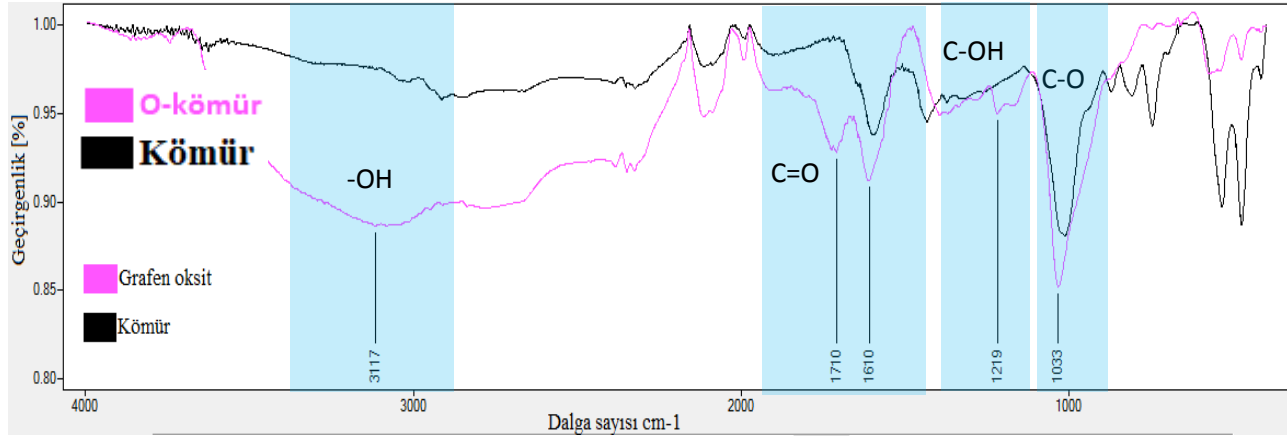
### Kömürün oksidasyonu

Kömürü oksidasyon öncesi RESTCH RS-200 marka cihaz ile kırma-öğütme ve ardından kurutma işlemine uygulanmıştır. Daha sonra, ceketli reaktör içine bulunan 115 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2,5 g NaNO<sub>3</sub> karışımına 5 g kömür ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile 5 °C'de karıştırılmıştır (Marcano ve ark., 2010). 25 g potasyum permanganat (KMnO<sub>4</sub>) yavaşça reaktöre eklenmiş ve reaktör sıcaklığı soğutmalı su sirkülatörü ile 5°C'nin altında tutulmuştur (Hummers Jr ve Offeman, 1958). Çözelti sıcaklığı 35 °C'ye çıkarılmış ve 2 saat daha karıştırılmıştır. Ardından 200 ml saf su yavaşça reaktöre eklenmiştir. Daha sonra çözelti sıcaklığı 85 °C'ye çıkarılmıştır ve 12 saat daha çözelti karıştırılmıştır. Son olarak, reaksiyonu durdurmak için %20'lük 10 mL hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içeren 100 mL su çözeltiye eklenmiştir. Metal iyonlarının uzaklaştırılması amacı ile 100 ml HCl çözeltisi (1/10 v/v) ilave edilmiş ve numune 3 defa yıkanmıştır. Elde edilen okside kömür numunesi filtreleme, santifürj işlemlerine tabi tutulmuştur (Şimşek ve ark., 2018). Elde edilen numune, etüde 50 °C'de 24 saat kurutulmuştur (Korucu ve ark., 2018).

## BURGULAR VE TARTIŞMA

### FTIR Analizi

Okside edilen kömürün (O-kömür) FTIR deseni ve karbon kaynağı olarak kullanılan kömürün FTIR spektrumu Şekil 2’de verilmiştir.

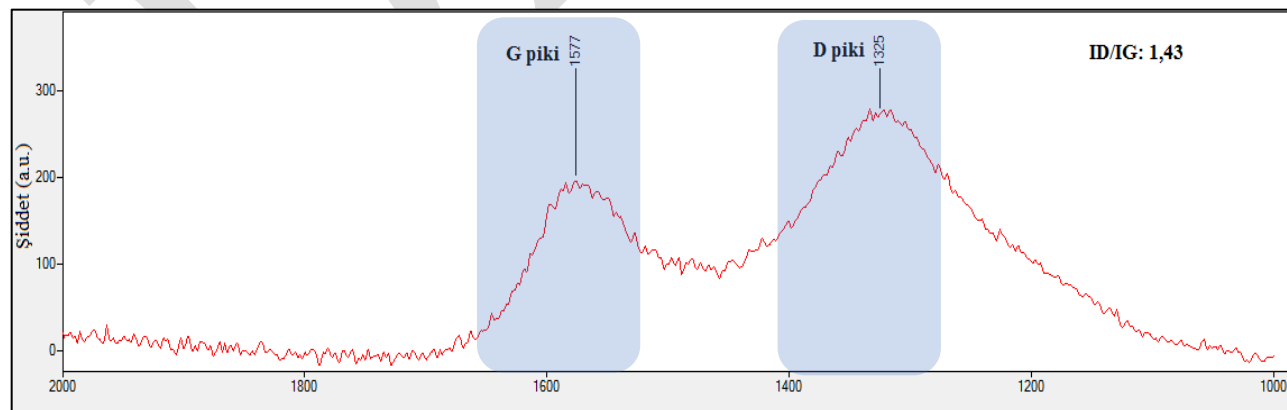


Şekil 2. (O-kömür) ve Kömürün FTIR spektrumları

O-kömür’ün FTIR analizinde sırası ile karboksilik asit gruplarının, hidroksil gruplarının, epoksi ve alkoksi grupları gözlemlenmiştir. Karboksil gruplarına ait C=O bağ yapısı  $1710\text{ cm}^{-1}$  ve hidroksil gruplarına ait olan O-H bağları ise beklendiği  $3117\text{ cm}^{-1}$ ’de gözlemlenmiştir. Okside edilen karbonun yapısında olması gereken ve karbon kaynağının okside olduğunu gösteren C-O bağ yapısı yine  $1219\text{ cm}^{-1}$  geniş bir pik vererek net bir şekilde gözlemlenmiştir. Bütün pik değerlerinde O-kömür’ün pik şiddetinin kömüre göre daha yüksek olması, oksidasyonun başarılı olduğunu kanıtlamaktadır. Aynı zamanda  $3600\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı arasındaki bant O-H bağlarından kaynaklanmaktadır. Bu da elde edilen O-kömür’ün hidrofilik bir yapıda olacağını göstermektedir (Shahriary ve Athawale, 2014; Song ve ark., 2017; Tiyek ve ark., 2016).

### RAMAN Analizi

O-kömür’ün Raman spektroskopisi ile yapısal özellikleri analiz edilmiştir. Şekil 3’de elde edilen O-kömür’ün  $1325\text{ cm}^{-1}$ ’de D ( $\text{sp}^3$ ) bandı,  $1577\text{ cm}^{-1}$  ise G ( $\text{sp}^2$ ) bandı verdiği gözlemlenmiştir.



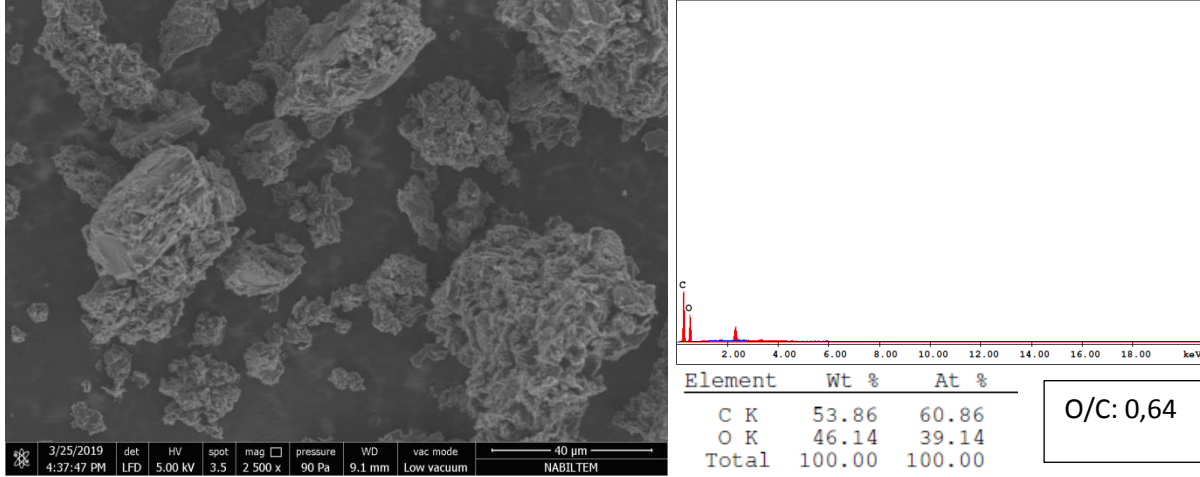
Şekil 3. GO’nun Raman spektrumları

Burada G bandı düzenli/aromatik yapıyı temsil ederken, D bandı ise karbon yapısının düzensizliklerini, amorf yapıların ve oksidasyon sonucu bozunmaya uğrayan yapıları göstermektedir (Yazıcı ve ark., 2016; Tiyek ve ark.,

2016). Raman analizinde yer alan D ve G bandı şiddetine bakıldığında kömürün başarılı bir şekilde okside edildiği görülmektedir (Skákalová ve ark., 2017). D pikinin şiddeti ( $I_D$ ) düzensiz yapıların derecesini ve G pikinin şiddeti ( $I_G$ ) ise düzenli yapıların şiddet değerlerini vermektedir. GO için  $I_D/I_G$  değeri 1,43 olarak belirlenmiştir. Burada D pikindeki şiddet artışı düzensiz yapıların fazla olduğunu göstermektedir.

### SEM-EDX Analizi

Grafen oksidin yüzey morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. SEM cihazına entegre olan EDX cihazı ile numunenin elementler analizi gerçekleştirilmiş ve karbon/oksijen oranı hesaplanmıştır (Şekil 4). SEM görünümü ve elementel analiz sonuçları ile C-Kömür'ün oksijenin karbona atomik oranı (O/C) değeri 0,64 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç kömürün başarılı bir şekilde okside edildiğinin göstergesidir.



Şekil 4. Grafen oksidin yüzey morfolojisi

### SONUÇ

Bu çalışmada grafit yerine kullanılan taş kömürünün Hummers yöntemi ile oksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Okside edilen kömürün karakterizasyonu FTIR, Raman ve SEM-EDX analizi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda Raman spektroskopisinde elde edilen 1,44 değerindeki D piki yoğunluğunun G piki yoğunluğuna oranı ve SEM-EDX analizi ile elde edilen 0,64 değerindeki oksijenin karbona atomik oranı kömür oksidasyonunun başarılı olduğunu göstergesidir. Grafen oksit ve grafenin kimyasal sentezinde taş kömürünün kısmen kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

### KAYNAKLAR

- Balachandran M 2014. Role of infrared spectroscopy in coal analysis—an investigation. *American Journal of Analytical Chemistry*, 5(06): 367.
- Chen J, Yao B, Li C, Shi G 2013. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, 64: 225-229.
- Demirbilek S 1987. Kömür kullanımı ve ilgili çevre kirlenmesi. *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 26(3): 33-43.
- Gafur E 2015. Farklı parçacık boyutlarındaki Tunçbilek linyitinin desülfürizasyonuna deneysel parametrelerin etkisi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Gea S, Sari J N, Bulan R, Piliang A, Amaturrahim S A, Hutapea Y A 2018. Chitosan/graphene oxide biocomposite film from pencil rod. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 970, No. 1, p. 012006). IOP Publishing.
- Geim A K, Novoselov K S 2007. The rise of graphene. *Nature materials*, 6: 183-191.
- Geim A K, Novoselov K S 2010. The rise of graphene. In *Nanoscience and Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals*, 11-19 pp.
- Gülen J, Toprak S, Pişkin S 2012. Batı Türkiye Kömürlerine ait Bazı Karakteristik Özellikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 27-33.

- Hassan M, Gomes V G 2018. Coal derived carbon nanomaterials–recent advances in synthesis and applications. *Applied Materials Today*, 12: 342-358.
- Hummers Jr W S, Offeman R E 1958. Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6): 1339-1339.
- Korucu H, Şimşek B, Yartaşı A 2018. A TOPSIS-based Taguchi design to investigate optimum mixture proportions of graphene oxide powder synthesized by hummers method. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(11): 6033-6055.
- Marcano D C, Kosynkin D V, Berlin J M, Sinitzkii A, Sun Z, Slesarev A, Tour J M 2010. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*, 4(8): 4806-4814.
- Purwandari V, Gea S, Wirjosentono B, Haryono A 2018. Synthesis of graphene oxide from the Sawahlunto-Sijunjung coal via modified hummers method. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2049, No. 1, p. 020065). AIP Publishing.
- Shahriary L, Athawale A A 2014. Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.*, 2(01): 58-63.
- Şimşek B, Ultav G, Korucu H, Yartaşı A 2018. Improvement of the graphene oxide dispersion properties with the use of TOPSIS based Taguchi application. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62(3): 323-335.
- Skákalová V, Kotrusz P, Jergel M, Susi T, Mittelberger A, Vretenár V, Hulman M 2017. Chemical oxidation of graphite: Evolution of the structure and properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(1): 929-935.
- Song J, Wang X, Chang C T 2014. Preparation and characterization of graphene oxide. *Journal of Nanomaterials*, 2014.
- Song H, Liu G, Zhang J, Wu J 2017. Pyrolysis characteristics and kinetics of low rank coals by TG-FTIR method. *Fuel Processing Technology*, 156: 454-460.
- Tiyek İ, Dönmez U, Yıldırım B, Alma M H, Ersoy M S, Karataş Ş 2016. Kimyasal yöntem ile indirgenmiş grafen oksit sentezi ve karakterizasyonu. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2): 349-357.
- Yazıcı M, Tiyek İ, Ersoy M S, Alma M H, Dönmez U, Yıldırım B, Salan T, Yıldız K 2016. Modifiye Hummers Yöntemiyle Grafen Oksit (GO) Sentezi ve Karakterizasyonu. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji*, 4(2): 41-48.



## The Effects of Sodium Laureth Sulphate On Zebrafish Liver Organotypic Culture

Burak Gökçe\*, Mustafa Kiran, Sema İşisağ Üçüncü

Ege University Science Faculty, Biology Department Zoology Section, Izmir, Turkey.

\*Corresponding Author e-mail: [burak\\_gokce@yahoo.com](mailto:burak_gokce@yahoo.com)

### Abstract

Anionic surfactant sodium laureth sulphate (SLES) is a foaming agent and used in the main component of most commercial products. Because of its low cost and effective utilization, it is used in many cosmetic products for their cleaning and emulsifying properties. However, in case of common use, surfactants are widely distributed in the environment especially aquatic habitats on a global scale. Risk analyses are the main process for any kind of xenobiotics and in vitro toxicological methods are becoming widely used for assessment in these evaluations. A major promise of in vitro systems is to obtain mechanism derived information that is considered pivotal for adequate risk assessment. In this study, biochemical and histological effects of SLES were evaluated in zebrafish 3D organotypic liver culture system. Four different concentrations (0.1, 0.5, 1.0 and 1.5 µg/ml) exposed for 24 and 96 hours to organotypic culture of liver samples. Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) enzyme activities and lipid peroxidation levels were analysed for biochemical parameters. Exposed tissue samples were evaluated with the routine histological procedure and compared with non-exposed samples for histopathological assessment. Results were showed that enzyme activities and lipid peroxidation levels were increased depending on increasing concentration both 24 and 96 hours exposure group. Vacuolizations, nuclear abnormalities, necrotic areas were observed in histopathological observations. All of these findings were indicated that SLES have potentially had liver toxicity on zebrafish organotypic liver culture system.

**Keywords:** Sodium Lauryl Sulphate, organotypic liver culture, zebrafish, toxicity

### INTRODUCTION

Surfactants also known as surface active agents are a group of chemicals consisted of a polar head group and non-polar tail group. Polar group is water soluble but non-polar tail region is not soluble in the water (Ying, 2006). They are best known for their solubility and cleanin properties. Large quantities of surfactants are being used in household and industry every day and most end up dispersed in different environmental compartments (soil, water and sediment). World production of synthetic surfactants was 7,2 million tonnes (Di Corcia, 1998). Worldwide production of surfactants rose to 12.5 million tonnes and over 3 million tonnes were produced in western europe alone in last decade (Edser, 2006; CESIO, 2008).

Sodium laureth sulfate , also known as sodium lauryl ether sulfate (SLES), is an anionic detergent and surfactant found in many personal care products. SLES is an inexpensive and very effective foaming agent. SLES, sodium lauryl sulfate (SLS) amonium laurly sulfate (ALS) and sodium pareth sulfate (SPS). SLES is an inexpensive and very effective foaming agent. SLES, sodium lauryl sulfate (SLS), ammonium lauryl sulfate (ALS), and sodium pareth sulfate are surfactants that are used in many cosmetic products for their cleaning and emulsifying properties. They behave similarly to soap. It is derived from palm kernel oil or coconut oil (Falbe 1987).

Surfactants could effect biological systems. Anionic surfactants can bind to macromolecules such as peptides, enzymes and DNA. Binding to proteins and peptides may result in changing the folding of the polypeptide chain and the surface charve of the molecule. This situation may modify biological activity (David et al., 2008). Cationic surfactants mainly effect cytoplasmic (inner) membrane of the cell. For example some of them bind to inner membranes and disorganise cellular function via their long alkyl chain (McDonell and Russel, 1999). Nonionic

surfactants exert antimicrobial activity by binding to various proteins and phospholipid membranes. Effecting phospholipid membranes may change membrane permeability and cause leakage of low molecular mass compounds. That could result in cell death or damage through loss of ions or amino acids (Cserháti, 1995). In cellular level, toxicity of most surfactants is the same as hydrocarbon toxicity because of their long hydrocarbon chain. This might be produced highly reactive oxygen species and cause oxidative stress in organism.

In our study, evaluation of oxidative stress parameters, membrane damage and histological effects of SLES was aimed in zebrafish liver tissue. For that purpose organotypic tissue culture method was used.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Chemicals And Zebrafish Maintenance**

SLES was commercially obtained from local suppliers. Wild type zebrafish specimens were reared in glass aquaria (60 x 30 x 30 cm) of 40 L water capacity and carried out to standard husbandry procedures. All chemicals that used in biochemical assays were obtained from Sigma.

### **Liver Organotypic Culture**

Male healthy zebrafishes were selected randomly and anaesthetized by MS222 (0,5 mg/L, Sigma), liver samples were dissected and transferred into phosphate buffered saline solution (PBS, Sigma). Tissue samples that were randomly pieced small cubes and embedded into %1 agarose dissolved in PBS; transferred into six-well plates. Leibovitz's 15 (L15) cell culture medium supplemented with %10 FBS were added to plates for incubation in 28 °C overnight.

### **SLES Exposure**

SLES stock solution (10 mg/L) was prepared. Three different concentration (0,1, 0,5, 1, 1,5 µg/ml) of test solution were diluted from stock with complete culture media. Organotypic culture of liver samples were exposed to different concentration of SLES with two different exposure duration. (24-96 hours).

### **Biochemical Analyses**

#### **Sample Preparation**

The post mitochondrial fractions from the cultured tissues were used for biochemical assays. Cultured tissues were washed in ice cold 1,15 % KCl solution, blotted and weighed. The tissues were homogenized with a homogenizing solution (50 mM phosphate buffer pH 7,4 containing 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,15 M KCl and 0,01 % (w/v) PMSF). Homogenization was performed at 4 °C by using homogenizer (sartorius); and centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4 °C with refrigerated centrifuge (Eppendorf 5810 R). The supernatants were stored at -20 °C until performing biochemical analysis.

#### **Assay Of Lipid Peroxidation**

Lipid peroxidation was determined by thiobarbituric acid (TBA) reaction (24). The absorbances were read at 532 nm after removal of any flocculated material by centrifugation. The amounts of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were then calculated by using an extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and expressed as nmol TBARS formed/mg protein.

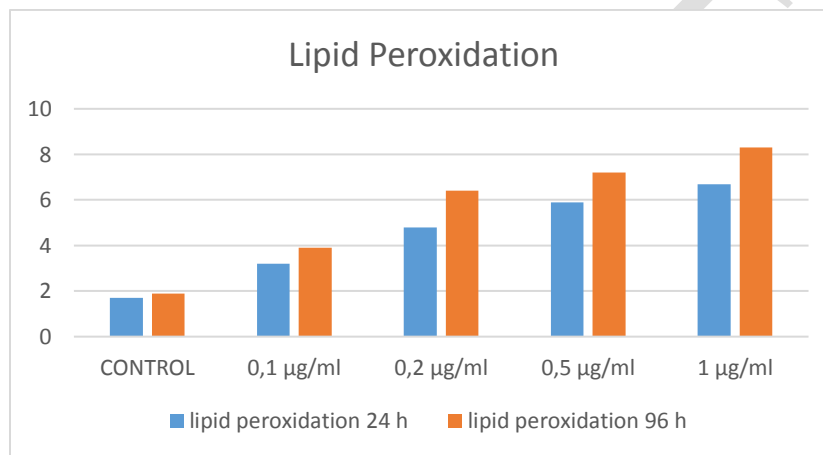
#### **Assay Of Antioxidant Enzymes**

Catalase (CAT) activities were determined based on the decomposition rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by the enzyme. Absorbance was measured at 240 nm and enzyme activity was expressed as units/mg protein. One unit of catalase activities was defined as decomposition of 1.0 nmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to oxygen and water per minute at pH: 7.4 and 25 °C. Glutathione

-S-Transferase (GST) activities were measured by using 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene as a substrate. The reaction rate was recorded at 340 nm and the activities were expressed as nmol CDNB conjugate formed/min/mg protein using a molar extinction coefficient of 9.6 Mm<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

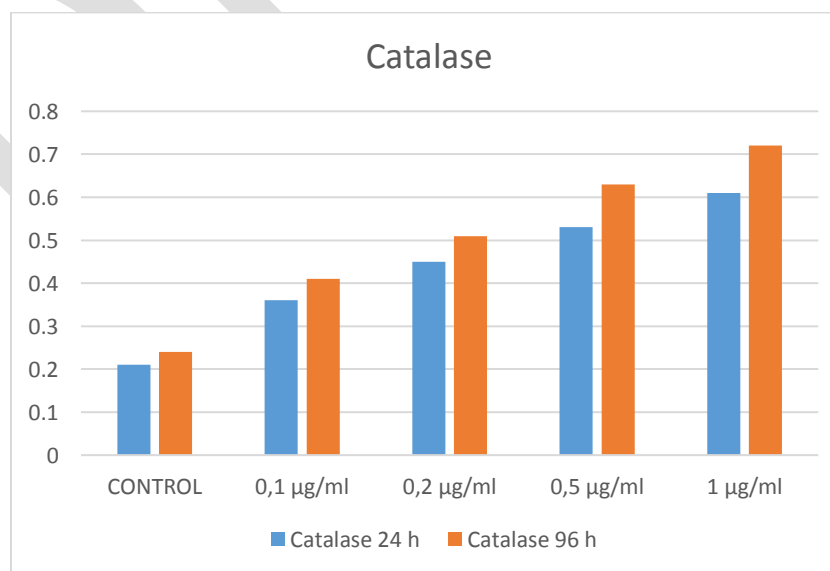
## RESULTS AND DISCUSSION

In figure 1, there was a significant increase in MDA levels that showed the level of lipid peroxidation in liver tissue in all test concentrations when compared with control groups. Lipid peroxidation (LPO) has been widely used for a biomarker of oxidative damage in fish exposed to xenobiotics (Paskerova et al., 2012). LPO is the process of oxidative degeneration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that is essential for membrane function, structural integrity and inactivation of several membranes bound enzymes (29).



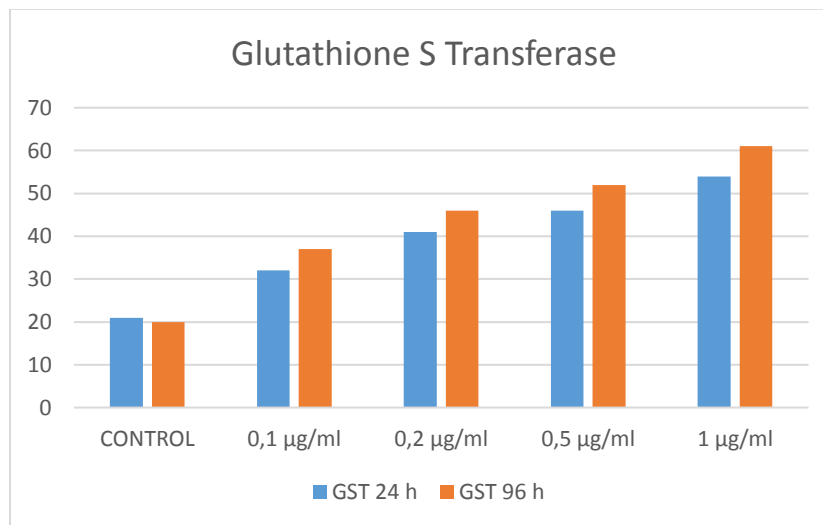
**Figure 1.** Lipid Peroxidation Levels of organotypic liver tissues of zebrafish exposed to SLES.

CAT has been implicated as an essential defiance against the potential toxicity of superoxide anions (David et al., 2008). It is an antioxidant enzyme that acts specifically on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, forming oxygen and water. CAT is mainly located in the peroxisomes and it is responsible for the reduction of hydrogen peroxide produced from the metabolism of long chain fatty acids in peroxisomes (Winston and DiGiulio, 1991). In our study exposure of quinalphos in different concentration and exposure time, CAT activity levels increased significantly depending time and concentration (Figure 2).



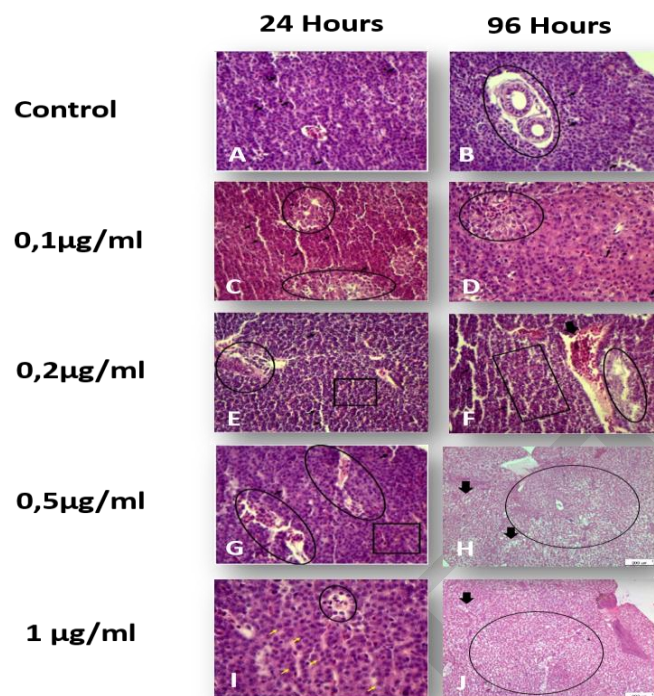
**Figure 2.** Catalase enzyme activities of organotypic liver tissues of zebrafish exposed to SLES.

Same increase level were observed in GST activities (Fig 5). The enzyme GST is involved in the detoxification of many xenobiotics and this plays an important role in protecting tissues from oxidative stress (Patil and David 2013).



**Figure 3.** Glutathione S Transferase enzyme activities of organotypic liver tissues of zebrafish exposed to SLES.

In histological evaluation, it was observed that SLES could damage to liver tissue depending on concentration and exposure duration. In normal liver tissue, hepatic parenchyma is consisted of hepatocytes and hepatic portal veins were observed (Figure 4, A and B). In 0,1 µg/ml concentration 24 h exposition group, necrotic areas were seen and this regions were growing up in 96 h (Figure 4, C and D). In 0,2 µg/ml concentration 24 h exposition group, necrotic areas were getting bigger and dilatation in parenchyma was observed (Figure 4, E and F). These regions were enlarged in 96 h. In 0,5 µg/ml concentration 24 h exposition group, out of enlarged necrotic regions, dilated parenchyma regions were observed and in 96 h vacuolization was started (Figure4, G and H). In 1 µg/ml concentration exposition group, all findings were same and increased when compared with other concentrations and durations (Figure4, I and J).



**Figure 4.** A and B; control group of liver tissues (hepatocytes: arrows, hepatic portal veins: circle). C and D; 0,1 µg/ml SLES (necrotic areas: circle). E and F; 0,2 µg/ml SLES (Necrotic areas: circle, dilatation: arrows). G and H; 0,5 µg/ml SLES (Necrotic areas: circle, dilatation arrows). I and J; 1 µg/ml SLES (vacuolization circle).

Surfactants are widely discharged in environmental water because of world-wide utilization in emulsification, sterilisation and detergency. This situation maybe cause serious pollution and pose a threat to human health. In general, the surfactants in the aquatic environments can rapidly degraded by microorganisms (Mann and Boddy 2000, Lara-Martin et al., 2008). however if the surfactans go into anaerobic conditions they will accumulate in aquatic organisms and induce toxicity (Jensen 1999, Murakami et al.,2011).

Depending our results, oxidative stress was inducted with SLS exposure in different concentration and exposure time. It could be the result of SLS and other surfactants shown hydrocarbone like toxicity mechanisms. Lipid peroxidation levels were also induced. This situation was the reason of membrane damage of cells because of surfactants. Our results were shown similarities with other in vivo studies. But there is no record about zebrafish organotypic liver culture.

## REFERENCES

- Cserhádi T. Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: Interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environ Health Perspect* 1995;103:358- 64.
- Comite European des Agents de Surface et de Leurs Intermediaires Organiques (CESIO). CESIO surfactants statistics for Western Europe 2007. CESIO News Issue 12/2008.
- Cserhádi T, Forgács E, Oros G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ Int* 2002;28:337-48.

David, C., Arnou, B., Sanchez, J.F., Pelosi, L., Brandolin, G., Lauquin, G.J., Trézéguet, V., 2008, Two residues of a conserved aromatic ladder of the mitochondrial ADP/ATP carrier are crucial to nucleotide transport. *Biochemistry* 47(50):13223-13231.

Di Corcia A. Characterisation of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998;794:165-85.

Edser C. Latest market analysis. *Focus on Surfactants* 2006;5:1-2.

J. Falbe (ed.): *Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application*, Springer Verlag, Heidelberg 1987.

Jensen, J. 1999. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *Sci. Total Environ.* 226, 93–111.

Lara-Martin, P. A., Gomez-Parra, A. & Gonzalez-Mazo, E. 2008. Sources, transport and reactivity of anionic and non-ionic surfactants in several aquatic ecosystems in SW Spain: A comparative study. *Environ. Pollut.* 156, 36–45.

McDonnell G, Russel AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-79.

Mann, R. M. & Boddy, M. R. 2000. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere.* 41, 1361–1369.

Murakami, M., Adachi, N., Saha, M., Morita, C. & Takada, H. 2011. Levels, Temporal Trends, and Tissue Distribution of Perfluorinated

Patil, V.K., David, M. 2013. Oxidative Stress in Freshwater Fish, *Labeo rohita* as a Biomarker of Malathion Exposure. *Environmental Monitoring Assessment*, 185:10191–1019.

Paskerova, H., Hilscherova, K., Blaha, L., 2012, Oxidative Stress and Detoxification Biomarker Responses in Aquatic Freshwater Vertebrates Exposed to Microcystins and Cyanobacterial Biomass. *Environmental Science and Pollution* 19:2024–2037.

Surfactants in Freshwater Fish from Asian Countries. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 61, 631–641.

Ying GG. Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int* 2006;32:417-31.

Winston, G.W. and DiGiulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, 137-161.

## Kalp dokusunda rotenon maruziyetinin oksidatif stres ve inflamasyon üzerine etkileri

İlknur Yurtsever<sup>1,3</sup>, Ünsal Veli Üstündağ<sup>2</sup>, Perihan Seda Ateş<sup>3</sup>, İsmail Ünal<sup>3</sup>, Ebru Emekli-Alturfan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Marmara Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri ABD, İstanbul, Türkiye

iyurtsever@medipol.edu.tr

### Özet

Rotenon, pestisid olarak yaygın kullanılmasının yanında mitokondriyel elektron taşıma sisteminde yer alan kompleks I'ı inhibe ederek hücre içi oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Rotenonun yol açtığı hücre hasarları genelde nöronal hücre araştırmalarında çalışılmasına rağmen, kalp gibi metabolizma hızı yüksek dokuda yapılan çalışma sayıları azdır. Rotenonun kalp dokusunda yağ asidi metabolizmasına etki ettiği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu çalışmada, kalp dokusunda oksidatif stres oluşumu için 4 hafta süresince 2 gün aralıklarla 2 mg/kg konsantrasyon olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyon ile zebra balıklarına rotenon uygulanmıştır. Rotenon ile oluşturulan oksidatif strese rifampisin antibiyotiklerinin, kalp dokusunda oluşturacağı etkileri araştırmak için, bir grup zebra balığına da 2mg/kg rotenonla beraber 20mg/kg konsantrasyonda yağda çözülmüş rifampisin intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Uygulama sonrası anestezi altında kalp dokuları disekte edilip, nitrik oksit (NO), lipid peroksidasyon (LPO) düzeyleri, TLR4A, CYP27A1 ve TNF $\alpha$  gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. LPO ve NO seviyelerinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. Rifampisin antibiyotiklerinin gen ekspresyon profilinde oluşturduğu farklılıklar arasında CYP27A1 ve TNF $\alpha$  özellikle dikkate değer düzeydedir. Sonuçlarımız rifampisin rotenon maruziyeti durumunda kalp dokusundaki etkileri üzerine daha detaylı çalışmaların gerekli olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Rotenon, rifampisin, lipid metabolizması, kalp.

### The effects of rotenone exposure on oxidative stress and inflammation in heart tissue

#### Abstract

In addition to its widespread use as pesticide, rotenone inhibits complex I in the mitochondrial electron transport system and causes intracellular oxidative stress formation. Although the rotenone-mediated cellular damage is usually studied in neuronal cell research, there are few studies on tissue that have a high metabolic rate such as heart. It has been reported in previous studies that rotenone has an effect on fatty acid metabolism in heart tissue. In this study, rotenone was applied to zebrafish by intraperitoneal injection with a concentration of 2 mg / kg at 2 day intervals for 4 weeks for the formation of oxidative stress in heart tissue. In order to investigate the effects of rifampicin antibiotic induced by rotenone on heart tissue, rifampicin dissolved in sunflower oil with 20mg / kg concentration and 2 mg / kg of rotenone was administered intraperitoneally to a group of zebrafish. After the application, heart tissues were dissected under anesthesia and nitric oxide (NO), lipid peroxidation (LPO) levels, and TLR4A, CYP27A1 and TNF $\alpha$  gene expression levels were examined. LPO and NO levels decreased compared to control group. Among the differences in the gene expression profile of rifampicin antibiotic, CYP27A1 and TNF $\alpha$  are particularly notable. Our results show that more detailed studies are needed on the effects of rifampicin on heart tissue in the case of rotenone exposure.

**Keywords:** Rotenone, rifampicin, lipid metabolism, heart.

### GİRİŞ

Rotenon Lonchocarpus ve Derris türlerinin kök ve gövdesinden elde edilen lipofilik ve doğal oluşan bir bileşendir. Toksik olması nedeniyle, birçok ülkede marketlerden çekilmesine rağmen, pestisit olarak yaygın olarak kullanılır (OJEU, 2008c). Rotenon mitokondri solunum zincirinde yer alan kompleks I'in kuvvetli inhibitörüdür. Etki mekanizması, elektronların kompleks I'in demir-sülfür merkezinden ubiquinona transferinin inhibisyonunu içerir. Böylece ATP sentezinin sınırlanmasıyla oksidatif fosforilasyonun bloklanmasına neden olur (Palmer ve ark., 1968). Elektronların oksijene tam transfer olmaması ile reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Bu rotenon uyarımlı ROS üretimi, mitokondri bileşenlerinin hasarına neden olarak apoptozu tetikleyebilir (Li ve ark., 2003, Fato ve

ark., 2009). Lipofilik yapısı ve etki mekanizması nedeniyle kan beyin bariyerini de içeren birçok biyolojik membrandan kolayca geçebilir (Higgins ve Greenmyre, 1996). Bu özelliği nedeni ile Parkinson çalışmalarında çokça kullanılmaktadır. Heinz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, enerji metabolizmasının etkin kullanıldığı beyin, kalp ve karaciğer dokusunda rotenon uyarımı sonrası transkriptom analizi sonucuna göre, kalp dokusunda rotenon kimyasalının yağ asidi oksidasyonundan sorumlu genlerin ekspresyonunu arttırdığı ve buna ek olarak yağ asidi sentezi ve hücre döngüsü/proliferasiyondan sorumlu genlerin ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir (Heinz ve ark., 2017). Rotenon ve nöronal oksidatif stres üzerine yapılan çalışmalarda, rotenonun dejeneratif etkisinin rifampisin antibiyotigi ile iyileştirildiği gösterilmiştir. Bununla beraber rifampisin antibiyotiginin nöron korunum etkisi Parkinson ve multisistem atrofisini de içeren çeşitli nörodejeneratif hastalıkta gösterilmiştir. Etki mekanizmasının hücre koruyucu şaperon ve anti-apoptotik proteinler aracılığı ile mitokondriyel ve endoplazmik retikulum stresin stabilizasyonunu sağlamak olduğu belirtilmiştir (Lin ve ark., 2017; Low ve ark., 2014; Ubhi ve ark., 2008; Xu ve ark., 2007; Li ve ark., 2004; Bi ve ark., 2011). Biz bu çalışmada, enerji metabolizması açısından etkin kalp dokusunu rotenon ile uyararak, kalp dokusunda kolesterol akışında etkin rol oynayan TLR4A1, kalpte oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkilendirilen TLR-4A ve inflamasyon belirtici TNF $\alpha$  genlerinin ekspresyon değişikliğine bakmayı amaçladık. Bununla beraber kalp dokusu oksidan-antioksidan durumunu belirlemek için LPO ve NO düzeylerine bakıldı.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Çalışma Grupları**

Her çalışma grubunda 20'er adet zebra balığı olacak şekilde 3 grup oluşturuldu. Rotenon grubu balıklara, sıvı yağda çözünmüş olan Rotenon 2mg/kg olacak şekilde 2 günde bir karın içi enjeksiyon uygulanmıştır. Rifampisin grubu balıklara ise, 2 mg/kg Rotenon ve sıvı yağda çözünmüş Rifampisin'den 20 mg/kg olacak şekilde 2 günde bir karın içine enjeksiyon uygulanmıştır. Kontrol grubu balıklar 4 hafta boyunca herhangi bir enjeksiyon uygulamaksızın günde iki kez beslenme ile yetiştirilmiştir.

### **Lokomotor Aktivite**

Maruziyet ve kontrol grupların hareketliliklerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek için lokomotor aktivite testi uygulanmıştır. Bu amaçla boyutları (25 cm x 9 cm x 6,25 cm) ve hacmi (1,5 L) olan tank kullanılmıştır. Bu tankın alt kısmına görülebilecek şekilde eşit uzaklıkta (6,25 cm) dik çizgiler çizilerek 5 dk boyunca Zebra balıklarının hareketleri izlenmiştir ve geçtikleri çizgiler sayılmıştır. Zebra balıkları izleme tankına alındıklarında sakinleşmesi için bir süre beklendikten sonra süre başlatılmıştır.

### **RT-PCR**

4 hafta enjeksiyon uygulamasından sonra, her gruptan balıklara anestezi altında kalp diseksiyonu yapıldı. Alınan kalp dokusu örnekleri kuru buz üzerinde direk dondurularak, -80°C'e kaldırıldı. Her gruptan 5 balık olmak üzere, TLR4A, CYP27A1 ve TNF $\alpha$  genlerinin ekspresyonlarına bakıldı.

### **Enzimatik Aktivite**

Her gruba ait 3 zebra balığından hazırlanan homojenizatlarda total protein, lipid peroksidasyon (LPO) ile Nitrik oksit (NO) düzeylerine Lowry, Yagi ve Miranda'nın metodlarına göre bakıldı (Lowry ve ark., 1951; Yagi, 1984; Miranda ve ark., 2001).

## **BULGULAR**

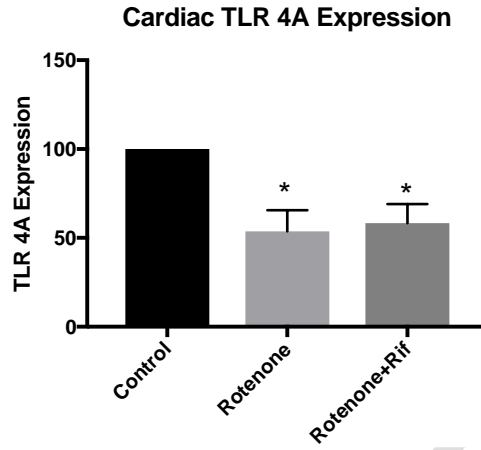
### **Lokomotor Aktivite**

Kontrol gruplarına göre rotenon kimyasalına maruz bırakılan balıkların yüzmelerinde yavaşlama görülmüştür.

### **RT-PCR**

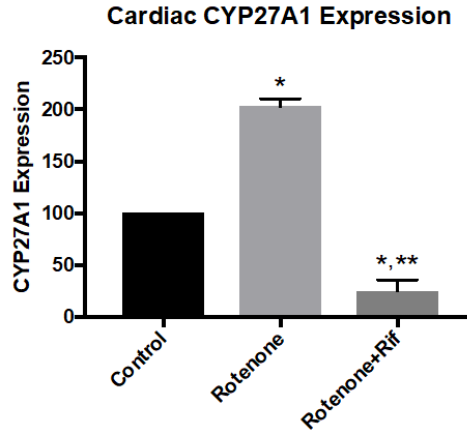
Kalp dokusunda RT-PCR ile TLR4A gen ekspresyonuna bakıldığında, rotenon ve rotenon+rifampisin uygulanan gruplar arasında farklılığın olmadığı, fakat her iki grubun kontrol grubuna göre TLR4A gen ekspresyon seviyelerinin azaldığı görülmüştür.





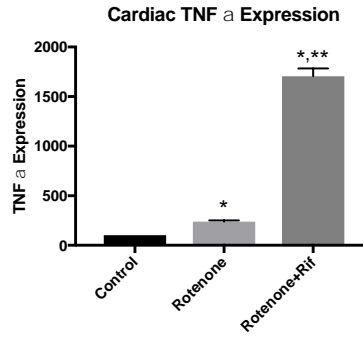
**Şekil 1.** Çalışma gruplarında TLR4A gen ekspresyon seviyeleri; \* $p < 0,05$  Kontrol grubu ile arasında anlamlı derecede fark vardır.

RT-PCR sonucuna göre, CYP27A1 gen ekspresyonu seviyeleri rotenon ve rotenon + rifampisin gruplarında kontrol grubuna göre değişiklik göstermektedir ( $p < 0,05$ ). Rotenon grubu balıklarda CYP27A1 gen ekspresyonu yaklaşık 2 kat artmışken, rotenone+rifampisin grubu balıklarda CYP27A1 gen ekspresyonunun kontrol grubuna göre ciddi oranda azaldığı görülmektedir.



**Şekil 2.** Çalışma gruplarında CYP27A1 gen ekspresyon seviyeleri; \*  $p < 0,05$  Kontrol grubu ile arasında anlamlı derecede fark vardır; \*\*  $p < 0,05$  Rotenon grubu ile arasında anlamlı derecede fark vardır.

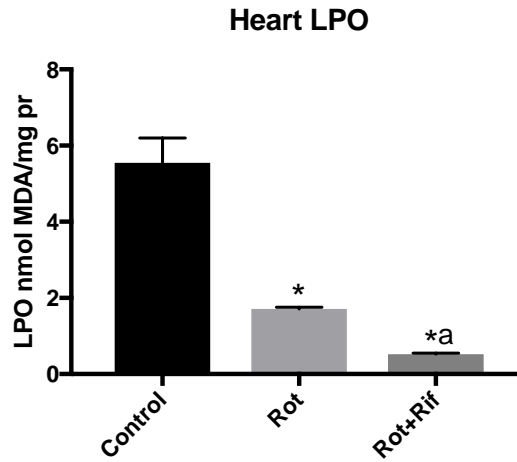
TNF $\alpha$  gen ekspresyon seviyelerine baktığımızda, kontrol grubuna göre, rotenon ve rotenon+rifampisin gruplarında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Rotenon grubu balıklarında TNF $\alpha$  gen ekspresyonu artışı gözlemlenirken, rotenon+rifampisin grubunda, rotenone grubuna göre ciddi oranda artmış TNF $\alpha$  ekspresyonu görülmektedir.



Şekil 3. Çalışma gruplarında TNF $\alpha$  gen ekspresyon seviyeleri

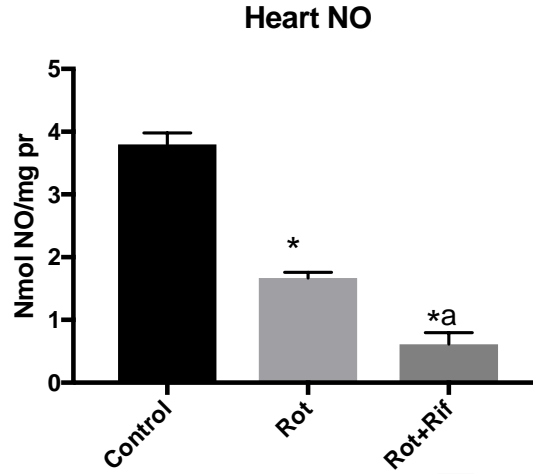
### Oksidatif Hasar Parametreleri

Kontrol grubu ve maruziyet gruplarında yapılan analizlerde LPO düzeylerine bakıldığında, kontrol grubuna göre maruziyet gruplarında anlamlı bir azalma görülmektedir ( $p < 0.05$ ). Rotenon grubu LPO aktivitesi, rotenon+rifampisin grubuna göre yüksek LPO aktivitesine sahip olmakla beraber kontrol grubuna göre düşük LPO aktivitesi görülmektedir.



Şekil 4. Çalışma gruplarında LPO aktivitesi

NO seviyelerine bakıldığında, kontrol gruplarına kıyasla rotenon grubunda önemli bir azalma görülür ( $p < 0.05$ ). Rotenon+rifampisin grubu dokularında NO seviyeleri rotenon ve kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalmıştır ( $p < 0.05$ ).



Şekil 5. Çalışma gruplarında NO seviyesi

## TARTIŞMA

Çalışmamızda rotenon uygulaması kalp dokusunda LPO ve NO düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur. Bu bulgumuz rotenonun oksidatif strese neden olduğu diğer çalışmalar ile çelişmektedir. Ancak literatürde rotenonun LPO inhibe edici etkisinin gösterildiği çalışmalar da mevcuttur. Ichikawa ve ark. İskemi reperfüzyon hasarı uygulanan sıçanlarda rotenonun LPO düzeylerini düşürdüğünü göstermiştir. Çalışmamızda ise artan TNF $\alpha$  ekspresyon düzeyleri rotenonun kalp dokusunda neden olduğu inflamatuvar durumu göstermekle beraber azalan TRL4A ekspresyonu ile LPO ve NO düzeyleri organizmanın verdiği yanıtın azalması, savunma sistemlerinin baskılanmasını göstermektedir. Rifampisin uygulanması NO ve LPO düzeylerini rotenon gruplarına göre daha da düşürmüştür. Bu bulgular ise rifampisin önceki çalışmalarda gösterilen etkileri ile uyumludur. Rifampisinin TNF $\alpha$  ekspresyonunu arttırması ise savunma sistemini uyarması şeklinde değerlendirilebilir.

## SONUÇ

Literatürde rotenon maruziyetinin kalp dokusuna etkilerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Rotenon ve rifampisin maruziyetlerinin etkilerinin kalp dokusunda moleküler mekanizmalarına dair daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Bi W, Zhu L, Wang C, Liang Y, Liu J, Shi Q, Tao E. 2011. Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain Res.*, 13: 12– 20.
- Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, Lenaz G. 2009. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1787, 384–392, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.003.
- Heinz S, Freyberger A, Lawrenz B, Schladt L, Schmuck G, Zeigelbauer HE 2017. Mechanistic investigation of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Sci Rep.*, 7:45465.
- Higgins D. S. Jr. & Greenamyre J. T. 1996. [3H] dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J. Neurosci* 16, 3807–3816.
- Ichikawa H, Takagi T, Uchiyama K, Higashihara H, Katada K, Isozaki Y, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. 2004. Rotenone, a mitochondrial electron transport inhibitor, ameliorates ischemia-reperfusion-induced intestinal mucosal damage in rats. *Redox Rep.*, 9(6):313-6.

- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278, 8516–8525, doi: 10.1074/jbc.M210432200.
- Li J, Zhu M, Rajamani S, Uversky VN, Fink AL. 2004. Rifampicin inhibits alpha-synuclein fibrillation and disaggregates fibrils. *Chem. Biol.*, 11: 1513– 1521.
- Lin D, Jing X, Chen Y, Liang Y, Lei M, Peng S, Zhou T, Zheng D, Zeng Z, Wu X, Yang L, Xiao S, Liu J, Tao E. 2017. Rifampicin pre-treatment inhibits the toxicity of rotenone-induced PC12 cells by enhancing sumoylation modification of  $\alpha$ -synuclein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485: 23– 29.
- Low PA, Robertson D, Gilman S, Kaufmann H, Singer W, Biaggioni I, Freeman R, Perlman S, Hauser RA, Cheshire W, Lessig S, Vernino S, Mandrekar J, Dupont WD, Chelimsky T, Galpern WR. 2014. Efficacy and safety of rifampicin for multiple system atrophy: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*, 13: 268– 275.
- Lowry O H, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193: 265-275.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, 5:62-71.
- OJEU. Official Journal of European Union. Commission Decision of 8 December 2008 concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. L 335/91.13.12.2008. (2008c).
- Palmer G., Horgan D. J., Tisdale H., Singer T. P. & Beinert H. 1968. Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XIV. Location of the sites of inhibition of rotenone, barbiturates, and piericidin by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 243, 844–847.
- Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Patrick C, Adame A, Thukral M, Shults C, Masliah E. 2008. Rifampicin reduces alpha-synuclein in a transgenic mouse model of multiple system atrophy. *Neuroreport*, 19: 1271–1276.
- Xu J, Wei C, Xu C, Bennett MC, Zhang G, Li F, Tao E. 2007. Rifampicin protects PC12 cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis and inhibits the expression of an alpha-Synuclein multimer. *Brain Res.*, 1139: 220– 225.
- Yagi K.1984. Assay for blood plasma or serum. *Method enzymol.*, 105:328-33.

## Antrasen grubu içeren Pd-NHC komplekslerinin sentezi ve Suzuki-Miyaura tepkimesinde katalitik özelliklerinin incelenmesi

Mert Olgun Karataş

İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Malatya, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: mert.karatas@inonu.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada, Pd(OAc)<sub>2</sub> ve karşılık gelen benzimidazolyum tuzlarının, asetonitril içinde, piridin ve potasyum klorür varlığında tepkimesi ile antrasen grubu içeren iki yeni paladyum *N*-heterosiklik karben (Pd-NHC) kompleksi sentezlenmiştir. Bu komplekslerin yapıları <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC-MS, IR spektroskopik teknikleri ve element analizi sonuçları ile tamamen aydınlatılmıştır. Sentezlenen komplekslerin, aril klorür türevlerinin fenilboronik asit ile Suzuki-Miyaura çapraz eşleşme tepkimelerinde katalitik özellikleri incelenmiştir. İlk olarak optimizasyon testleri gerçekleştirilmiş ve ürünlerin DMF-H<sub>2</sub>O çözücü sisteminde en iyi verimle elde edildiği görülmüştür. Optimizasyon testlerinden sonra iki kompleksin de altı farklı aril klorür türevinin tepkimesinde katalitik özellikleri incelenmiş ve orta seviyede veya iyi verimler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antrasen, *N*-heterosiklik karben, Paladyum, Suzuki-Miyaura reaksiyonu, Kataliz,

### Synthesis and investigation of catalytic properties of anthracene containing Pd-NHC complexes in Suzuki-Miyaura reaction

#### Abstract

In this study, anthracene containing two new palladium-*N*-heterocyclic carbene (Pd-NHC) complexes were synthesized by the reaction of Pd(OAc)<sub>2</sub> and corresponding benzimidazolium salts in acetonitrile in the presence of pyridine and potassium chloride. The structures of these complexes were fully characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC-MS, IR spectroscopic techniques and elemental analyses. Catalytic properties of the synthesized complexes were investigated in the Suzuki-Miyaura cross coupling reaction of aryl chloride derivatives and phenylboronic acid. Firstly, optimization tests were carried out and best yields were obtained in DMF-H<sub>2</sub>O solvent system. After the optimization tests, catalytic properties of both complexes were investigated in the reactions of six different aryl chloride derivatives and moderate to good yields were obtained.

**Keywords:** Anthracene, *N*-heterocyclic carbene, Palladium, Suzuki-Miyaura reaction, Catalysis.

### GİRİŞ

Organik kimyada karbon-karbon bağ oluşumu oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Aril halojenür veya aril triflat türevlerinin ariboronik asit türevleri ile biaril veya heterobiaril bileşiklerini oluşturdukları Pd-katalizli tepkimeler Suzuki-Miyaura tepkimesi olarak bilinmektedir (Beletskaya ve ark., 2019). Suzuki-Miyaura tepkimesi kullanılarak birçok biyoaktif bileşik sentezlenebilmekteyken (Selepe ve VanHeerden, 2013), bu tepkime bazı doğal biyoaktif bileşiklerin total sentezinde ara basamaklarda da kullanılmaktadır (Koshvandi ve ark., 2018). Suzuki-Miyaura tepkimesinde basit Pd tuzlarının yanı sıra Pd nanopartiküller (Fihri ve ark., 2011), Pd metal-organik kompleksler ve organometalik Pd kompleksleri de kullanılmaktadır. Organometalik Pd komplekslerinin büyük bir kısmını ise *N*-heterosiklik karben (NHC)-Pd kompleksleri oluşturmaktadır (Gürbüz ve ark., 2015).

NHC komplekslerinin araştırılması 1991 yılında ilk serbest ve kararlı NHC ligandının Arduengo tarafından izole edilmesi ile hız kazanmıştır (Arduengo ve ark., 1991). NHC kompleksleri daha sonraki yıllarda, Suzuki-Miyaura, Mizoroki-Heck, Sonogashira, Negishi, arilasyon, aminasyon, metatez gibi tepkimelerde katalizör olarak kullanılmıştır (Herrmann, 2002; Kantchev ve ark., 2007). NHC ligandlarının güçlü  $\sigma$ -donör ve  $\pi$ -akseptör özellikleri oldukça kararlı kompleksler oluşturmalarını sağlamaktadır (Würtz ve Glorius, 2008). Ayrıca azot atomları üzerinde bulunan grupların istendiği gibi değiştirilebilmesi sterik ve elektronik olarak istenen özellikte komplekslerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. NHC ligandı üzerinde bulunan grupların kompleksin

özelliklerinde belirleyici olmasından dolayı birçok farklı NHC kompleksi sentezlenmiş ve özellikleri incelenmiştir (Peris, 2018).

Bu çalışmada, hacimli bir grup olan antrasen grubu içeren iki yeni Pd-NHC kompleksi sentezlendi ve uygun spektroskopik ve fiziksel yöntemler ile tamamen karakterize edildi. Bu komplekslerin Suzuki-Miyaura tepkimesinde katalitik özellikleri incelendi. Aril halojenür olarak ticari açıdan daha avantajlı olan aril klorür türevleri kullanıldı.

## MATERYAL VE METOT

9-(Klorometil)antrasen, *n*-bütil klorür, 3,4,5-trimetoksibenzil klorür, Pd(OAc)<sub>2</sub>, fenilboronik asit, tüm aril klorürler, kullanılan tüm çözücü ve bazlar ticari olarak temin edildi. 1-(*n*-bütil)-3-((antrasen-9-il)metil)benzimidazolyum klorür (**1a**) ve 1-(3,4,5-trimetoksibenzil)-3-((antrasen-9-il)metil)benzimidazolyum klorür (**1b**) bileşikler literatüre uygun olarak sentezlendi (Karataş ve ark., 2014). Gerçekleştirilen tüm tepkimeler havaya açık şartlarda gerçekleştirildi. Erime noktaları kapiler tüpler içinde Electrothermal-9200 marka erime noktası tayin cihazı ile tayin edildi. Element analizleri LECO CHNS-932 element analizi cihazında gerçekleştirildi. IR spektrumları Perkim Elmer marka Spektrum 100 model FT-IR cihazından ATR ünitesi kullanılarak kaydedildi. LC-MS spektrumu Agilent marka 1100 LC/MSD SL model kütle spektrometresinde kaydedildi. <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları Bruker marka Ascend™ 400 Avance II HD model NMR cihazında kaydedildi. Kimyasal kayma değerlerinin belirlenmesi için standart olarak TMS kullanıldı ve kayma değerleri ppm olarak verildi. Sinyal yarılımları şu şekilde kısaltıldı: s = singlet, d = dublet, t = triplet, quin = quintet, sex = sextet, m = multiplet. Gaz kromatografisi (GC) ölçümleri Shimadzu marka GC-2025 model GC cihazı ile gerçekleştirildi. Kolon uzunluğu 30 m, kolon çapı 0.25 mm, kolon iç dolgu çapı 0.25 µm ve kolon sıcaklık aralığı 20-250 °C olan RX-5ms kolonu ve GC-FID dedektörü kullanıldı.

### Paladyum komplekslerinin (2a,b) sentezi ve karakterizasyon verileri

0.45 mmol (80 mg) Pd(OAc)<sub>2</sub> ve 0.45 mmol karşılık gelen benzimidazolyum tuzu, 2 mmol KCl ve 2 mmol piridin 5 mL CH<sub>3</sub>CN içinde çözüldü. Karışım 80 °C'de 24 saat karıştırıldı. Daha sonra CH<sub>3</sub>CH ve diğer uçucu bileşenler vakum altında uçuruldu. Ham ürün 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde çözüldü ve karışım silikajel kolonundan geçirildi. Son hacim yaklaşık 5 mL olana kadar çözelti deriştirildi ve son hacmin yaklaşık iki katı kadar *n*-pentan eklendi. Oluşan kristaller *n*-pentan ile yıkandı (3x5 mL) ve vakum altında kurutuldu.

**[1-(*n*-bütil)-3-((antrasen-9-il)metil)benzimidazol-2-yliden](piridin) paladyum(II) diklorür, 2a.** Sarı kristaller, verim; 120 mg (%43), bozunma sıcaklığı: 333-334 °C. IR (cm<sup>-1</sup>): 2958, 1604, 1511, 1448, 1437. C<sub>31</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Pd için element analizi, Hesaplanan: C, 59.97, H, 4.71, N, 6.77; Bulunan: C, 59.81, H, 4.66, N, 6.59. LC-MS, Pd(NHC)(Py)(Cl) için Hesaplanan: 584.1 *m/z*, Bulunan: 584.0 *m/z*. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 8.96 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, PyH-*o*), 8.63 (d, 2H, *J* = 8.9 Hz, ArH), 8.52 (s, 1H, ArH), 8.00 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.72 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, PyH-*p*), 7.49 (m, 2H, ArH), 7.41 (m, 2H, ArH), 7.31 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, PyH-*m*), 7.22 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 7.13 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>antrasen), 6.95 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 6.53 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 5.98 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 4.89 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.21 (quin, 2H, *J* = 7.6 Hz, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.56 (sex, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.04 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 163.5 (Pd-Karben), 151.3, 138.1, 134.8, 134.5, 131.6, 131.3, 129.7, 129.3, 127.4, 125.4, 124.63, 124.57, 124.48, 122.9, 122.6, 111.8, 110.2, 48.5 ve 48.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> ve NCH<sub>2</sub>antrase), 31.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 20.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 13.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

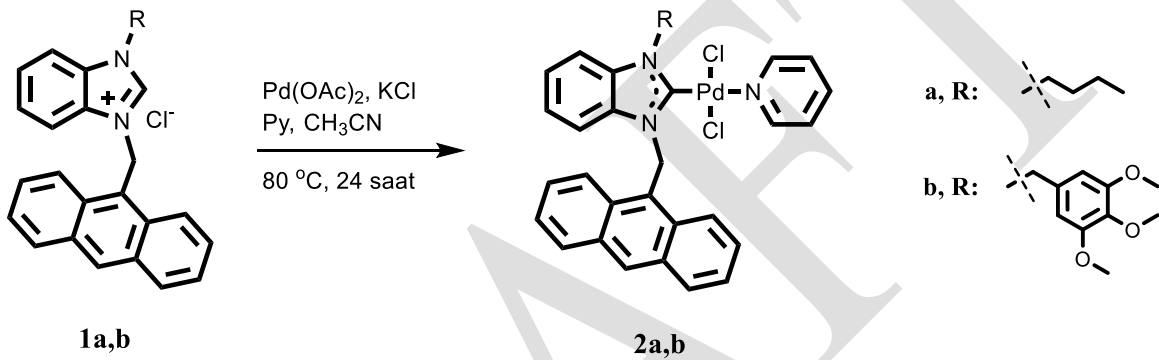
**[1-(3,4,5-trimetoksibenzil)-3-((antrasen-9-il)metil)benzimidazol-2-yliden](piridin) paladyum(II) diklorür, 2b.** Sarı kristaller, verim; 170 mg (%50), bozunma sıcaklığı: 276-278 °C. IR (cm<sup>-1</sup>): 2927, 1596, 1510, 1464, 1450. C<sub>37</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Pd için element analizi, Hesaplanan: C, 59.65, H, 4.46, N, 5.64; Bulunan: C, 59.88, H, 4.57, N, 5.51. LC-MS, Pd(NHC)(Py)(Cl) için Hesaplanan: 708.1 *m/z*, Bulunan: 710.0 *m/z*. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 8.93 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz, PyH-*o*), 8.69 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, ArH), 8.54 (s, 1H, ArH), 8.01 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 7.71 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, PyH-*p*), 7.52-7.48 (m, 2H, ArH), 7.44-7.40 (m, 2H, ArH), 7.30 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, PyH-*m*), 7.19 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>antrasen), 7.02 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, ArH), 6.84-6.81 (m, 3H, ArH), 6.54 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, ArH), 6.15 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph), 6.06 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, ArH), 3.79 (s, 6H, ArOCH<sub>3</sub>-*m*), 3.75 (s, 3H, ArOCH<sub>3</sub>-*p*). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): 164.6 (Pd-Karben), 153.8, 151.3, 138.2, 137.7, 134.8, 134.5, 131.6, 131.4, 130.8, 129.8, 129.4, 127.3, 125.4, 124.62, 124.56, 124.4, 123.2, 122.9, 111.7, 111.3, 105.1, 60.8 (ArOCH<sub>3</sub>-*p*), 56.6 (ArOCH<sub>3</sub>-*m*), 53.5 (NCH<sub>2</sub>Ph), 48.5 (NCH<sub>2</sub>antrasen).

### Suzuki-Miyaura katalitik tepkimeleri

Bir Schlenk tüpüne 0.3 mmol (36 mg) fenilboronik asit, 0.2 mmol aril klorür, **Tablo 1** ve **2**'de verilen miktarlarda baz, katalizör ve toplam 4 mL olacak şekilde çözücü eklendi. Bu karışım **Tablo 1** ve **2**'de verilen sıcaklıklarda ve sürelerde karıştırıldı. Tüm sulu tepkimeler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra etil asetat ile ekstrakte edildi. Organik faz MgSO<sub>4</sub> üzerinden kurutulduktan sonra mikro silikajel kolonundan geçirildi. Tepkime verimleri aril klorür türevleri esas alınarak GC ile belirlendi.

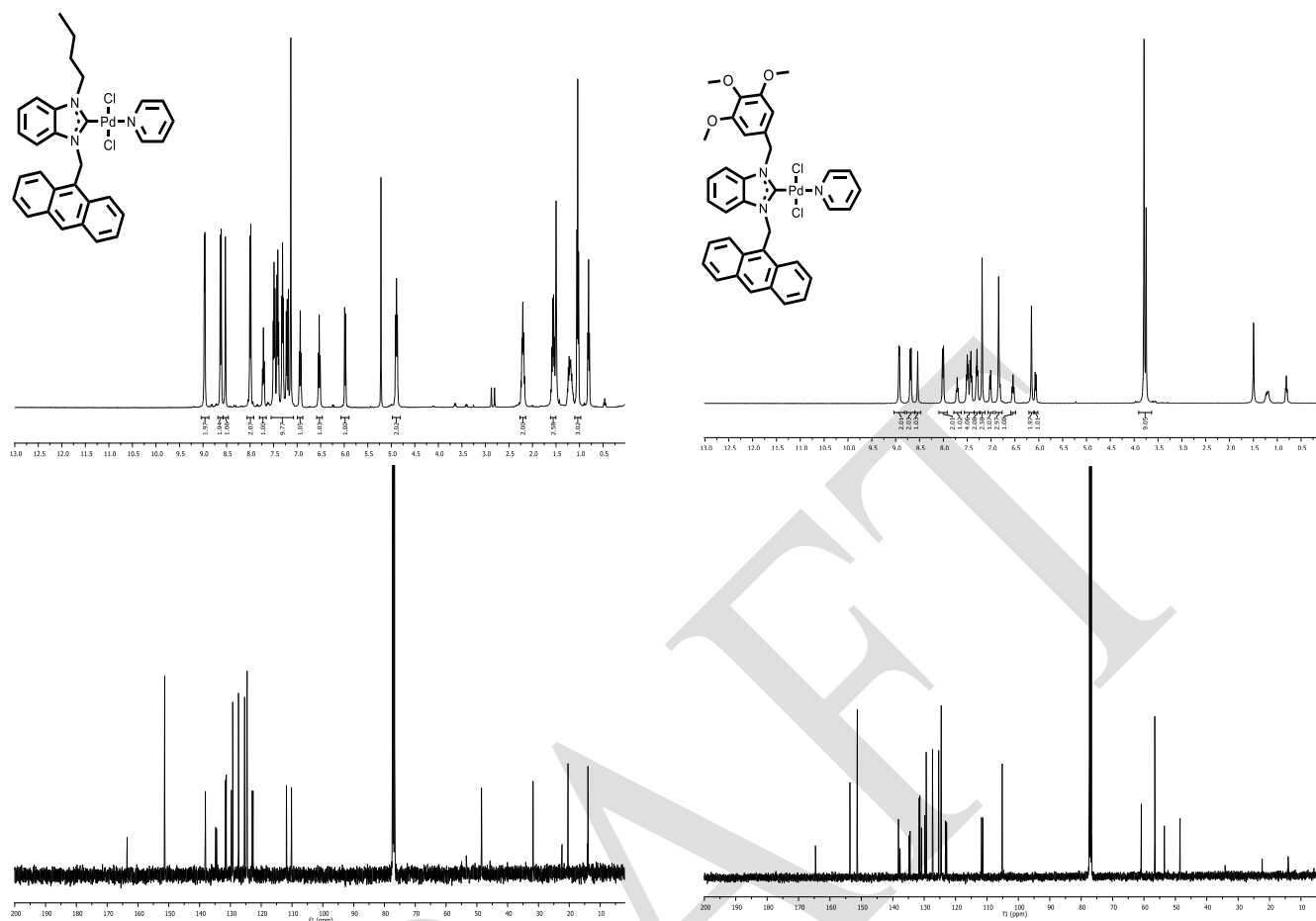
### BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ilk olarak antrasen grubu içeren benzimidazolyum tuzları (**1a,b**) literatüre göre sentezlendi (Karataş ve ark., 2014). Bu tuzların Pd(OAc)<sub>2</sub> ile asetonitril içinde etkileştirilmesi sonucu antrasen grubu içeren Pd-NHC kompleksleri elde edildi. Tepkime 80 °C'de, KCl ve piridin varlığında havaya açık şartlarda gerçekleştirildi. Hedeflenen kompleksler, **2a** ve **2b** sırasıyla %43 ve %50 verimler ile elde edildi. Sentezlenen komplekslerin sentez şartları ve yapıları **Şekil 1**'de verilmiştir.

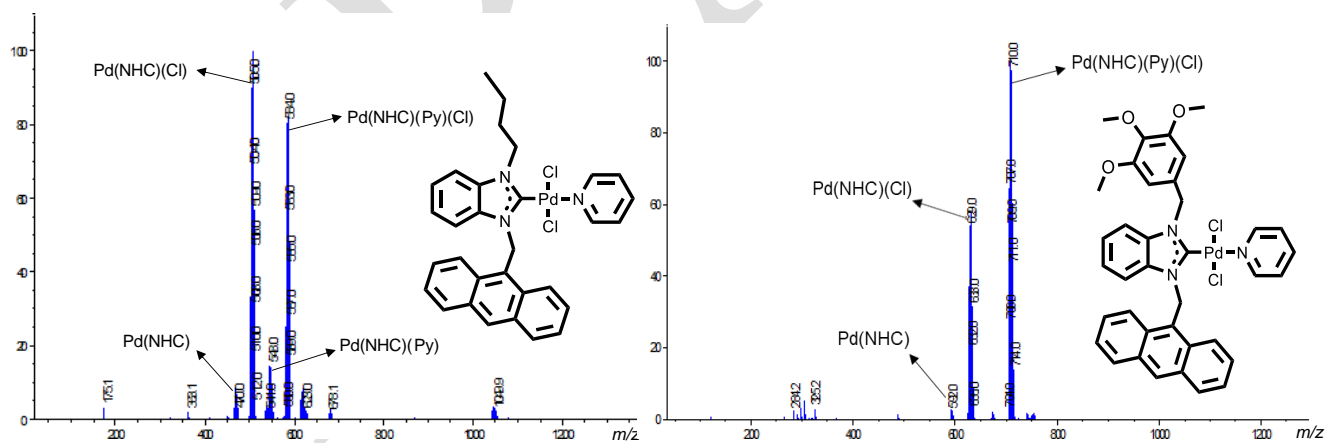


**Şekil 1.** Antrasen grubu içeren Pd-NHC komplekslerinin sentezi ve yapıları.

Sentezlenen komplekslerin yapıları <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC-MS, IR spektroskopik teknikleri ve elementel analiz sonuçları ile tamamen aydınlatılmıştır. Komplekslerin <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları **Şekil 2**'de verilmiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrumları incelendiğinde, **2a** ve **2b** komplekslerine karşılık gelen tuzlara ait sırasıyla 9.22 ve 9.39 ppm'de gözlenen asidik NCHN hidrojenine ait sinyaller tamamen kaybolmuştur. Tuz yapısından farklı olarak piridin halkasının yapıya dahil olduğu piridin grubunun *orto*, *meta* ve *para* konumlarına ait sırasıyla 2H, 2H ve 1H değerlerinde sinyallerin gözlenmesi ile anlaşılmaktadır. Komplekslerin yapılarına göre beklenen diğer sinyaller beklenen integral değerleri ve eşleşme sabitleri ile gözlenmiştir. Komplekslerin <sup>13</sup>C NMR spektrumları incelendiğinde, yine karşılık gelen tuzlara ait sırasıyla 141.8 ve 141.6 ppm'de gözlenen NCHN imino karbonuna ait sinyaller tamamen kaybolmuş ve sırasıyla 163.5 ve 164.6 ppm'de karben karbonuna ait sinyaller gözlenmiştir. Komplekslerin daha ileri karakterizasyonunun yapılması için LC-MS spektrumları alındı. **Şekil 3**'te sırasıyla **2a** ve **2b** komplekslerine ait LC-MS spektrumları verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde komplekslerin Pd(NHC)(Py)(Cl), Pd(NHC)(Cl), Pd(NHC)(Py) ve Pd(NHC) formlarına ait sinyaller net bir şekilde görülmektedir. Bu analizlere ek olarak, sentezlenen komplekslerin IR ve element analiz sonuçları da önerilen yapılar ile uyum içindedir.



Şekil 2. 2a (sol) ve 2b (sağ) komplekslerine ait <sup>1</sup>H (üst) ve <sup>13</sup>C (alt) NMR spektrumları.



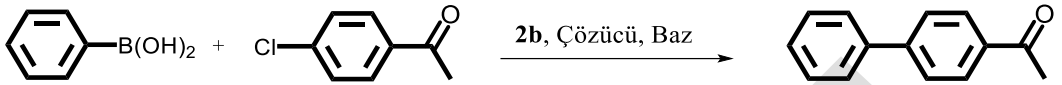
Şekil 3. 2a (sol) ve 2b (sağ) komplekslerine ait LC-MS spektrumları.

Hedeflenen komplekslerin sentezi ve karakterizasyonu tamamlandıktan sonra Suzuki-Miyaura çapraz eşleşme tepkimesindeki katalitik özellikleri incelendi. Tepkimede ticari olarak daha önemli olan aril klorür türevleri kullanıldı. Farklı aril klorür türevlerinin fenilboronik asit ile hangi şartlarda tepkimelerinin gerçekleştirileceğini belirlemek amacıyla ilk olarak **2b** kompleksi kullanılarak optimizasyon tepkimeleri gerçekleştirildi ve tüm sonuçlar **Tablo 1**'de listelendi. Model tepkime olarak 4-kloroasetofenon ve fenilboronik asit tepkimesi kullanıldı. İlk olarak tepkimenin gerçekleştirileceği çözücü ortamının belirlenmesi amacıyla K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> varlığında <sup>i</sup>PrOH-H<sub>2</sub>O, DMF-H<sub>2</sub>O, DMF ve H<sub>2</sub>O çözücüleri denendi (**Tablo1**, deney no 1-4) ve en iyi çözücü sisteminin DMF-H<sub>2</sub>O



sistemi olduğu belirlendi. Bu aşamadan sonra Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH ve KO<sup>t</sup>Bu gibi farklı bazlar kullanıldı (**Tablo 1**, deney no 5-8). Karbonat temelli bazlar ile benzer sonuçlar elde edilse de en iyi verim K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile elde edildi. Bu aşamadan sonra tepkimenin verimini arttırmak amacıyla sırasıyla tepkime süresi, katalizör yüzdesi ve tepkime sıcaklığı artırıldı ancak verimin beklenen seviyede artmadığı tespit edildi (**Tablo 1**, deney no 9-11). Bu testler sonucunda tepkimenin gerçekleştirileceği optimum şartlar; DMF-H<sub>2</sub>O çözücü sistemi, 80 °C tepkime sıcaklığı, 2 saat tepkime süresi, %2 katalizör oranı ve K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bazı olarak belirlendi (**Tablo 1**, deney no 2).

**Tablo 1.** Suzuki-Miyaura tepkimesi için optimum koşulların belirlenmesi.<sup>a</sup>



Deney no	Çözücü <sup>b</sup>	Katalizör oranı (% mol)	Baz	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Dönüşüm (%) <sup>c</sup>	Verim (%) <sup>c</sup>
1	<sup>i</sup> PrOH-H <sub>2</sub> O	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	53	41
2	DMF-H <sub>2</sub> O	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	87	78
3	DMF	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	47	41
4	H <sub>2</sub> O	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	39	35
5	DMF-H <sub>2</sub> O	2	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	86	74
6	DMF-H <sub>2</sub> O	2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	85	72
7	DMF-H <sub>2</sub> O	2	KOH	80	2	79	69
8	DMF-H <sub>2</sub> O	2	KO <sup>t</sup> Bu	80	2	86	71
9	DMF-H <sub>2</sub> O	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	3	89	79
10	DMF-H <sub>2</sub> O	3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	80	2	85	78
11	DMF-H <sub>2</sub> O	2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	100	2	88	78

<sup>a</sup>Fenilboronik asit (0.3 mmol), 4-kloroasetofenon (0.2 mmol), baz (0.5 mmol).

<sup>b</sup>Toplam hacim 4 mL.

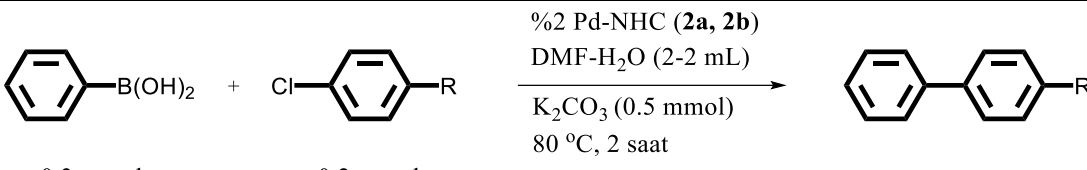
<sup>c</sup>Dönüşüm ve verim 4-kloroasetofenon baz alınarak GC ile belirlendi.

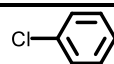
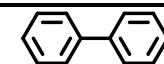
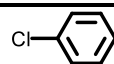
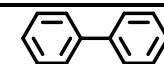
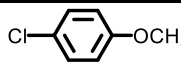
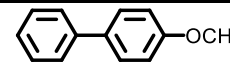
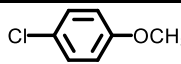
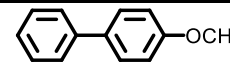
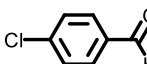
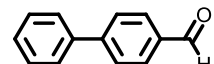
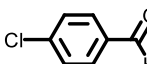
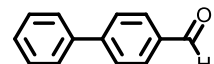
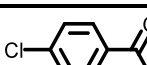
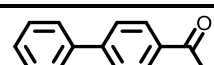
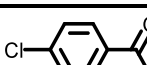
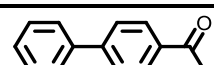

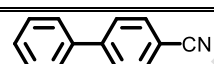

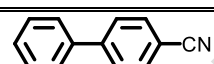
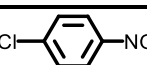
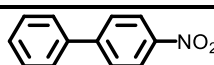
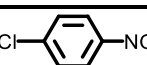
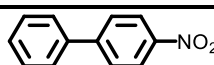
Optimum koşulların belirlenmesinden sonra bu şartlarda altı farklı aril klorür türevinin fenilboronik asit ile tepkimesinde **2a** ve **2b** komplekslerinin katalitik özellikleri incelendi ve sonuçlar **Tablo 2**'de listelendi. **Tablo 2**'den de görüldüğü gibi elektron çekici gruplar bulunduran aril klorür türevleri, bulundurmayan klorobenzen ve 4-kloroanisol bileşiklerine göre daha yüksek verimle ürün oluşturdu. Komplekslerin kendi aralarında aktiviteleri karşılaştırıldığında ise **2a** kompleksinin az da olsa daha aktif olduğu görülmektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada antrasen grubu içeren iki yeni Pd-NHC kompleksi sentezlendi ve tamamen karakterize edildi. Elde edilen komplekslerin Suzuki-Miyaura tepkimesinde katalitik özellikleri incelendi. Suzuki-Miyaura tepkimesinde biaril ürünlerin ticari olarak daha ucuz olan aril klorürler ile elde edilmesi ve çevre kirliliğini engellemek adına bu tepkimelerin sulu ortamda gerçekleştirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Bu çalışmada bazı aril klorür türevlerinin sulu ortamda Suzuki-Miyaura tepkimeleri sonucu biaril ürünleri iyi verimler ile elde edilmiştir. Sentezlenen komplekslerin farklı Pd-katalizli tepkimelerde de katalitik özelliklerinin incelenmesi planlanmaktadır. Ayrıca antrasen grubunun floresans özelliği çok iyi bilinmektedir ve bu özellik antikanser çalışmalarında komplekslerin hücre içi takibinin gerçekleştirilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada sunulan kompleksler ve türevlerinin antikanser özelliklerinin incelenmesi de gelecek çalışmalar içinde planlanmıştır.

**Tablo 2.** Farklı aril klorür türevleri kullanılarak gerçekleştirilen Suzuki-Miyaura tepkimesi.



Deney no	Aril klorür	Biaril ürün	Katalizör	Dönüşüm (%)	Verim (%)
1			2a	51	50
2			2b	47	44
3			2a	50	43
4			2b	44	39
5			2a	88	77
6			2b	72	64
7			2a	86	76
8			2b	87	78
9			2a	71	66
10			2b	84	82
11			2a	69	58
12			2b	85	62

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. İsmail Özdemir'e teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Arduengo AJ, Harlow RL, Kline M 1991. A stable crystalline carbene. *Journal of the American Chemical Society*, 113: 361-363.
- Beletskaya IP, Alonso F, Tyurin V 2019. The Suzuki-Miyaura reaction after the Nobel Prize. *Coordination Chemistry Reviews*, 385: 137-173.
- Fihri A, Bouhrara M, Nekoueishahraki B, Basset JM, Polshettiwar V 2011. Nanocatalysts for Suzuki cross-coupling reactions. *Chemical Society Reviews*, 40: 5181-5203.
- Gürbüz N, Karaca EÖ, Özdemir İ, Çetinkaya B 2015. Cross coupling reactions catalysed by (NHC)Pd(II) complexes. *Turkish Journal of Chemistry*, 39: 1115-1157.
- Herrmann WA 2002. N-heterocyclic carbenes: A new concept in organometallic catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 41: 1290-1309.
- Kantchev EAB, O'Brien CJ, Organ MG 2007. Palladium complexes for cross-coupling reactions-A synthetic chemist's perspective. *Angewandte Chemie International Edition*, 46: 2768-2813.
- Karataş MO, Alıcı B, Çetinkaya B, Bilen Ç, Gençer N, Arslan O 2014. Synthesis, characterization and tyrosinase inhibitory properties of benzimidazole derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 40: 461-466.
- Koshvandi ATK, Heravi MM, Momeni T 2018. Current applications of Suzuki-Miyaura coupling reaction in the total synthesis of natural products: An update. *Applied Organometallic Chemistry*, 32 : e4210, <https://doi.org/10.1002/aoc.4210>.
- Peris E 2018. Smart N-heterocyclic carbene ligands in catalysis. *Chemical Reviews*, 118: 9988-10031.
- Selepe MA, VanHeerden FR 2013. Application of the Suzuki-Miyaura reaction in the synthesis of flavonoids. *Molecules*, 18: 4739-4765.
- Würtz S, Glorius F 2008. Surveying sterically demanding N-heterocyclic carbene ligand with restricted flexibility for palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *Accounts of Chemical Research*, 41: 1523-1533.

## Kentsel alanlarda ağaç transplantasyon çalışmaları

Tolga Öztürk<sup>1\*</sup>, Necmettin Şentürk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: tozturk@istanbul.edu.tr

### Özet

Kentsel dokuya can veren ağaçlık alanlar ve yeşil çevrenin korunması çok önemlidir. Özellikle büyük şehirlerde yeşil alanlar ve parklar görsel güzelliği yanında, insanların kullanımı ve nefes alabilmeleri için olmazsa olmaz alanlardır. Park alanlarında, inşaat alanlarında, korularda ve yol kenarındaki alanlarında mevcut ağaçların yerinden sökülerek başka bir alana çeşitli tekniklerle taşınması ağaçların transplantasyonu adını almaktadır. Kentiçi park alanlarında ağaçların transplantasyonu (nakil) çalışmaları son yıllarda önemli bir hal almıştır. Her ağaç bir yerden diğer bir yere taşınabilir. Ancak bu taşıma işlemleri için sıkı sıkıya uyulması gereken kurallar ve teknikler bulunmaktadır. Sonuçta taşınan canlı bir varlıktır. Ağaçların taşınması esnasında öncelikle ağaçların taşınma mevsimine dikkat edilmelidir. Ülkemizde iklimsel özelliklerine göre değişmekle birlikte ağaçların taşınma dönemleri kasım - şubat ayları arasında gerçekleştirilmelidir. Bunun yanında, taşınacak ağaçların türü, boyu, göğüs yüksekliği çapı, tepe tacının büyüklüğü, genel gövde durumu, eğikliği ve taşınması durumunda sağlayacağı katkı maliyet analizi çok önemlidir. Ağaçların sayılan bu özellikleri göz önüne alınarak makinalı taşıma, bohçalama, kasalama vb. birçok teknik ile ağaçların taşınması çalışmaları yapılmaktadır. Ülkemizde ağaç transplantasyonu çalışmaları belediyeler ve serbest orman mühendisliği büroları tarafından gerçekleştirilmektedir. Burada önemli olan ağacın taşınmasından önce yapılması gerekenler, ağaç taşınırken göz önüne alınması gerekenler ve ağaç dikimi yapıldıktan sonra yapılması gerekenlerdir. Bu çalışmada, kentsel alanlarda ağaçların transplantasyonu için uyulması gereken teknik özellikler açıklanacak, yapılan çalışmalar incelenecek ve çeşitli öneriler getirilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Transplantasyon, ağaç, taşıma mevsimi.

### The transplantation operations in urban areas

#### Abstract

It is very important to protect the green environment and the wooded areas that give life to the urban texture. Especially in big cities, green spaces and parks are necessary for people to use and breathe besides the visual beauty. The removal of the existing trees in park areas, construction areas, groves and roadside areas and moving them to another area with various techniques is called the transplantation of trees. Transplantation of trees in urban park areas has become important in recent years. Every tree can be moved from one place to another. There are, however, strict rules and techniques for these transport operations. The result is a living being. During the transportation of the trees, firstly the season of the transportation of the trees should be considered. Although the changes in climatic characteristics in our country, the period of transportation of trees should be carried out between November and February. In addition, the type of trees to be transported, length, chest height diameter, crown size, overall trunk condition, inclination and the cost of the contribution is very important in case of transport is very important. Considering these features of the trees, machine transport, bundling, crushing and so on. Many techniques are carried on the transport of trees. What is important here is what needs to be done before moving the tree, what to consider when moving the tree, and what to do after planting the tree. In this study, the technical features to be followed for transplantation of trees in urban areas will be explained, the studies done will be examined and various suggestions will be made.

**Keywords:** Transplantation, tree, transport period.

### GİRİŞ

Su insanoğlunun yaşam kaynağı olması yanında doğa, ağaçlar ve hayvanlarda insan yaşamında yer tutan en önemli etkenlerdir. Ağaç ve onun hammaddesi odun, toplumların kullanmak zorunda olduğu ana kaynaklar olması yanında, ağaç topluluğu ormanlar toplumun manevi yönden rahatlık ve huzur bulduğu ortamlardır. Özellikle büyük şehirlerde yeşil çevre, parklar, kamuya ait alanlardaki yeşil alanlar gibi çevre insanların şehir içerisinde nefes almasına yardımcı olmaktadır. Yeşil alanlar buldukları ortamdaki havayı serinletmekte ve insanlar için şehir

içerisindeki farklı bir renk tonajı oluşturmaktadır. Kentsel alanlarda peyzaj alanlarının, park-bahçelerin düzenlenmesinde, bina ve yol inşaat alanlarında, metro, köprü yapımı gibi farklı alan kullanımlarında bazı durumlarda mevcut ağaçlar inşaat alanları içerisine denk gelebilmektedir. Bu ağaçların buldukları yerden başka bir alana taşınması işlemine “Ağaç Transplantasyon” çalışmaları denmektedir. Transplantasyon çalışmaları özellikle büyük şehirlerde son yıllarda oldukça sık uygulanmaktadır. Bu çalışmaların yapılması sırasında unutulmaması gereken en önemli faktör taşınan objenin bir canlı olduğudur. Bu nedenle bir ağacın bulunduğu yerden taşınmasında önce ağacın sağlık durumu, tepe tacı, göğüs çapı, dallanma yapısı gibi faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Bunun yanında, ağacın taşınmasında kullanılacak teknikler, uygun makine seçimi ve ağaç yeni yerine nakledildikten sonra yapılması gereken çalışmalar en ince detayına kadar planlanmalı ve uygulanmalıdır. Ağaç nakledildikten sonra, yeni yerinde sabitlenmesi, su, gübre ve bakım çalışmalarının iyi yapılması ağacın yaşayabilmesi için çok önemlidir. Transplantasyon çalışmalarında ağacın sağlıklı bir şekilde yaşamına devam etmesi yanında bu taşıma çalışmalarının ekonomik boyutunun da fazla olması göz ardı edilmemelidir.

Bu çalışmada kentsel alan içerisinde bulunan mevcut ağaçların transplantasyon çalışmalarında uyulması gereken teknik çalışmalardan bahsedilecek ve yapılan çalışmalar için çeşitli öneriler getirilecektir.

## MATERYAL VE METOT

### Ağaç Transplantasyon Çalışmaları ve Transplantasyon Yöntemleri

Ağaç transplantasyonu; çeşitli amaçlarla yeri değiştirilmek istenen bir ağacın, bulunduğu yerden, ağacın boyutuna uygun bir yöntem ve uygun bir ekipman ile çıkarılıp istenen başka bir yere nakledilerek dikilmesi işlemi olup, günümüzde özellikle çevre ve yeşil alan düzenleme çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Zira, ağaç transplantasyonu sayesinde çok kısa süre içinde büyük bitkilerle kaplı yeşil alanlar tesis edilebilmekte, böylece uzun yıllar bekleme zorunluluğu ortadan kalkmaktadır. Ancak, büyük boyutlu ağaçların transplantasyonu kolay bir iş olmayıp, tecrübeli elemanlar ile taşımaya uygun araç-gereç ve makineleri gerektiren son derece teknik bir iştir.

Ülkemizde ağaç transplantasyon çalışmalarının ilk örnekleri 1950-60’lı yıllarda İstanbul’da gerçekleştirilmiştir. Bu dönemde İstanbul Belediyesi Barbaros Bulvarı, Beyazıt Meydanı, Maçka, Tophane, Kabataş ve Şemsipaşa Parklarına Fıstıkçamı, Manolya, Çınar, Atkestanesi, Sedir ve Meşe gibi türlerden, yaşları 25-35 arasında değişen ve çapları 35 cm’e kadar çıkan ağaçları başarı ile nakletmiştir. Günümüzde arborikültür (ağaç yetiştirme tekniği) ve teknolojiye paralel olarak çok büyük ağaçların (*gövde göğüs çapı 120 cm’e kadar olan*) nakli de mümkün hale gelmiş (Ürgeç, 1998) ve ağaç transplantasyon uygulamaları gelişmiş ülke kentlerinde giderek yaygınlaşan bir uygulamaya dönüşmüştür.

Ağaç transplantasyon çalışmalarında genel kural olarak, kışın yaprağını döken ağaçlar başarılı bir şekilde nakledilebilmektedir. Öte yandan saçak, ince ve kompakt bir kök yapısına sahip sığ köklü ağaç türleri, uzun ve derine inen kazık kök sistemine veya seyrek bir kök sistemine sahip olan ağaç türlerine göre, çok daha başarılı bir şekilde nakledilebilmektedir. Ancak, ağacın göğüs çapı, boyu ve tepe tacı büyüdükçe; sökülmesi, taşınması ve yeni yerine dikilmesi sırasında karşılaşılan güçlükler ile maliyette büyük ölçüde artmaktadır.

Bir ağacın bulunduğu yerden başka bir yere nakledilebilmesi ve nakil işlemlerinde başarılı olunabilmesi için;

- İlk olarak: nakledilecek ağacın sağlıklı olması gereklidir.
- İkinci olarak: nakledilecek ağaçların hangi tip bir kök sistemine (kazık kök sistemi, kalp kök sistemi, sığ kök sistemi vb.) sahip olduğu bilinmelidir.
- Üçüncü olarak, ağacın söküldüğü alandaki toprak tipi bilinmelidir. Çünkü, kumlu topraklarda yetişmiş olan ağaçlar, derin ve dağınık bir kök sistemi oluşturdukları için, killi topraklardan çıkarılan ağaçlara göre, nakilde daha fazla risk oluşturmaktadır. Killi topraklarda ise ağaçların kök sistemindeki kılcal damarlar fazla gelişmemiş olduğundan bu tür toprakların olduğu yerlerde de

toprak havalandırılmalıdır. Taş vb. engellerin bulunmadığı derin topraklarda yetişen büyük boyutlu ağaçların sökülmesinde, daha fazla başarı şansı bulunmaktadır.

- **Dördüncü olarak:** ağaçlar için, ekolojik ve fizyolojik açıdan en uygun taşıma zamanının belirlenmesi gerekir. Taşımanın en uygun bir zamanda yapılması, nakil çalışmalarının başarısını da artıracaktır.
- **Beşinci olarak ta,** ağacın boyutlarına (*çapı, boyu, tepe tacı, topraklı kök çapı vb.*) uygun araç-gereç ve ekipmanlar ile bunları en iyi ve verimli bir şekilde kullanacak olan deneyimli teknik elemanların bulunması gerekir.

Sık büyüyen ağaçların her biri, dar bir alanda büyümek zorunda kaldıkları için, dar ve derin bir kök sistemi geliştirirler. Yine, fakir ve kuru ortamlarda yetişen ağaçlarda, sıkışık bir ortamda yetişmiş olan ağaçlar gibi dar ve derin bir kök sistemi geliştirirler. Doğal koşullarda büyüyen ağaçlar daha dağınık bir kök sistemi geliştirirler. Bu gibi durumlar, ağaçların nakledilmesinde başarı oranının etkilemektedir.

Aynı zamanda, eğimli alanlardan sökülüp, düz alanlara yapılan dikimde bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Çünkü, sökülme toprak kütesinin bir tarafı alçakta, bir tarafı yüksekte olacağı için, bu durumda ağacın düz bir alana intibakı zor olmaktadır.

Genellikle ılıman iklimlerde yetişen yapraklı türlerde yapraklar döküldükten sonra yani vejetasyon mevsimi dışında, sert iklimlerde ise toprak donmaya başlamadan önce ağaçlar sökülüp taşınmalıdır. Ayrıca kökler üzerindeki yararlı mikroorganizmaların güneş radyasyonundan zarar görmemeleri için, gerekli önlemler alınarak, taşımanın mümkünse bulutlu gün ve saatlerde yapılması sağlanmalıdır (Ürgeç,1986).

Ağaç transplantasyon çalışmalarının vejetasyon mevsimi dışında yapılması, taşınan ağaçların sağlık durumları açısından daha olumlu sonuçlar vermektedir. Ağaçları taşımaya başlamadan önce taşınacak ağaçların topraklı kök çapı belirlenmeli ve araziye işaretlenmelidir. Bu topraklı kök çapı da, ağacın 1.30 m yüksekliğindeki gövde çapının 8-12 katı alınmaktadır. Ağacın topraklı kök çapı belirlenip arazide işaretlendikten sonra, toprak nemli iken kazı işlemine başlanmalıdır. Söküm rüzgarlı ve güneşli, kuru ve çok soğuk havada yapılmamalı, kapalı hatta mümkünse hafif yağmurlu bir havada yapılmalıdır.

Taşınacak ağaçlar, taşıma işleminden önce 1/3 oranında tepe budamasına tabii tutulmalıdır. Budama işlemlerinin uzman bir ekip tarafından yapılması ve budama sonucu oluşacak yüzeylerin koruyucu maddeler ile kapatılması gereklidir. Taşıma amacıyla yerinden çıkarılacak ağacın göğüs çapına (*1,30 cm yüksekliğindeki gövde çapına*) göre esas alınacak, topraklı kök kitlesinin çapı ve derinliğine dikkat edilmelidir.

### **Bir ağacın transplantasyon aşamaları**

Ağaç transplantasyonu, çeşitli amaçlarla bir ağacın bulunduğu yerden, ağacın boyutuna uygun bir yöntem ve ekipman ile çıkarılıp, istenen başka bir yere nakledilerek dikilmesi işlemi olup, günümüzde çevre ve yeşil alan düzenleme çalışmalarında büyük önem taşımaktadır.

Bu nedenle; herhangi bir ağacın bulunduğu yerden, ağacın boyutuna uygun bir yöntem ve ekipman ile çıkarılıp, istenen başka bir yere nakledilerek dikilmesinde söz konusu olan aşamalar, şağıda maddeler halinde resimlerle kısaca açıklanmıştır:

a-) Ağacın taşınmasının ilk aşaması olan kazı çalışmalarına ve ağaçların yerinden sökülmesine ilişkin bazı resimler aşağıda verilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Ağaç taşıma çalışmalarında kazı işlemleri, ağaçların sökülmesi ve köklerin korunması (URL-1)

b-) Ağaçların söküm işleminden sonra, ağaçların taşınması (transplantasyon) aşamasına geçilir. Transplantasyon aşamasında ağacın köklerinin bulunduğu toprak kitlesinin dağılmasına dikkat edilir. Transplantasyon aşaması ile ilgili örnek resimler aşağıda verilmiştir.

Transplantasyona konu olan ağaçların taşıma işi, hareketli vinçler ve taşıma aracı (Şekil 2) veya mekanik ağaç taşıyıcıları (Şekil 3) ile yapılabilir. Ancak, ağaçların sökülmesi ve taşınması işi, bu işte deneyimli bir ekip tarafından, uygun ekipman kullanılarak ve tüm güvenlik önlemleri alınarak bir orman mühendisi veya orman yüksek mühendisinin gözetiminde yapılmalıdır.



**Şekil 2.** Ağacın transplantasyon için taşıma aracına yüklenmesi



**Şekil 3.** Mekanik ağaç taşıyıcıları ile ağaç nakil işlemi (URL-2)

c-) Transplantasyon aşamasından sonra, dikim aşamasına geçilir (Şekil 4). Dikimde dikkat edilmesi gereken en önemli konu, uygun bir dikim çukurunun hazırlanması ve dibine 30 cm kalınlığında gübreli toprak konulmalıdır. Dikim çukurunun derinliği, kök kitlesinin yüksekliğinden fazla olmamalıdır. Dikim çukuru fazla derin olur ise, kök boğazının üstündeki gövde kısmının toprakla örtülmesi sonucu gövdenin çürümesi veya enfekte olması tehlikesi ortaya çıkar.



Şekil 4. Taşınan ağaçların, daha önceden hazırlanmış olan dikim çukurlarına yerleştirilmesi (URL-3)

d-) Dikim aşamasından sonra, nakledilen ağaçların hem rüzgardan devrilmelerini önlemek, hem de toprakta oynamak suretiyle tutma başarısını azaltmamak için, ağaçların güçlü bir şekilde bağlanması veya desteklenmesi gerekir. Bu nedenle, nakledilen ağaçlar yeni yerlerine dikildikten sonra, ağacın türüne, ağacın çapına ve boyutlarına göre, en az üç veya dört ayrı yönden iplerle veya halatlarla, zemine çakılan kazıklara ve bağlanması (gergileme) gerekir (Şekil 5). Böylece ağaç rüzgâr, kar ve fırtına gibi dış etkenlere karşı korunmuş olacaktır. Bu ipler veya halatlar, en az iki yıl kalmalı ve zaman zaman kontrol edilerek gevşekliği giderilmelidir.



Şekil 5. Nakledilen ağaçların halatlarla bağlanması veya desteklenmesi (URL-4)

Nakledilen büyük boyutlu her tür ağacın desteklenmesinde üçlü gergileme, dörtlü gergileme veya dörtlü destekleme yöntemlerinin uygulanması zorunludur. Gergileme yönteminde; nakledilen ağaçlar, dalların ana gövdeden ayrıldığı noktaya koruyucu yastıklar yerleştirilerek, zemine çakılan kazıklara çelik halatlarla üç ya da dört yönde bağlanırlar. Dörtlü desteklemelerde ise, destek lataları taşınan ağacın çevresine, uçları gövde üzerinde ana dalların geliştiği noktada birleşen bir piramit şeklinde yerleştirilir. Birleşim yerinde yaralanmaları önlemek için ağaç ile lata uçları arasında koruyucu yastıklar konulması zorunludur.

Transplantasyon çalışmalarında bakım çalışmalarının eksiksiz yapılması, ağacın tutma başarısını artırmaktadır. Ağacın yeni yerine alışabilmesi için, sulama çalışmalarına dikkat edilmeli ve ağacın su ihtiyacına göre belirli

sürelerde sulama yapılmalıdır. Diğer bir ifade ile bakım çalışmaları sırasında, ağaç sulamaları ihmal edilmemeli ve özellikle vejetasyon başladıktan sonra daha sık sulanmalıdır. Özellikle her dem yeşil ağaçlar sonbaharda taşındıklarında, köklerin üstündeki alana saman, yaprak çürüğü, iyi yanmış çiftlik gübresi ile malçlama yapılması faydalı olmaktadır. Çünkü malç tabakası, toprak sıcaklığının düzensiz değişimine engel olarak, toprak sıcaklığını ve toprak nemini korumaktadır.

### Transplantasyon Yöntemleri

Ağaçlar güncel olarak;

- “Balyalama”,
- “Kasalama” ve
- “Mekanik Ağaç Taşıyıcıları”

gibi çeşitli yöntemlerle taşınabilmektedir.

İnşaat alanı içerisinde kalan ağaçların taşınması söz konusu olduğunda; öncelikli olarak mekanik ağaç taşıyıcıları ile taşıma tekniklerinden yararlanılmalı, daha sonra makineli taşımaya uygun olmayan ağaçların taşınmasında da, “Balyalama” ve “Kasalama” yöntemlerinin tercih edilmesi uygun olacaktır (Şekil 6).

Ağaçlar, buldukları yerlerden, belirlenen yöntem uygun araç-gereç ve ekipman ile nakledilip, daha önceden hazırlanan dikim çukurlarına yerleştirildikten sonra, mutlaka koruma altına alınmalı ve gerekli bakımları yapılmalıdır. Çünkü, taşınan büyük ağaçlar, taşıma aşamasını takiben en az iki yıllık özel bir bakıma gereksinim duymaktadırlar.



Şekil 6. Büyük boyutlu ağaçların naklinde kullanılan balyalama ve kasalama yöntemleri (URL-5)

Yukarıda yapılmış olan açıklamalardan da anlaşılacağı üzere, ağaç nakillerinin başarısında genel olarak;

- Ağacın türü,
- Ağacın boyutları (*çapı, boyu ve tepe tacı*),
- Ağacın yaşı,
- Toprak özellikleri,
- Topoğrafik koşullar,
- Taşıma zamanı,
- Ağacın sağlık durumu ve formu,
- Nakil yöntemi ve teknolojik olanaklar,



gibi faktörler belirleyici rol oynamaktadır.

Ağaçların boyutları da transplantasyon işlemlerinde önemli bir faktördür. Ağaç boyutu, diğer sayılan parametrelerle birlikte büyük ölçüde kişisel istek ve mali kaynaklara bağlıdır. Ağaçların taşınmasında ve en uygun taşıma yönteminin belirlenmesinde boyut olarak göğüs çapı (1.30 m'deki gövde çapı) esas alınır. Genel kural olarak küçük boyutlu bitkilerin nakil başarısı, büyük boyutlu olanlara göre daha yüksektir. Ağaç boyutu ya da büyüklüğü faktörü göreceli bir kavramdır. A.B.D.'nin Kaliforniya eyaletindeki uygulamalarda 300 yaşında ve 15 m boyundaki Meşe ağacı (*Quercus lobata*) 800 m mesafede başarı ile taşınıp dikildiği literatür bilgilerinde görülmektedir. Günümüzde göğüs çapı 120 cm'ye kadar olan çok büyük ağaçların naklinin de söz konusu olduğu belirtilmektedir (Ürgeç, 1998).

### **Nakil sonrası yapılması gerekli bakım çalışmaları**

Dikim aşamasından sonra, nakledilen ağaçların hem rüzgardan devrilmelerini önlemek, hem de toprakta oynamak suretiyle tutma başarısını azaltmamak için, yukarıda da açıklanmış olduğu üzere, ağaçların 3 veya 4 yerden iplerle veya halatlarla zemine çakılan kazıklara bağlanması veya desteklenmesinin yanı sıra, transplantasyon işlemleri sonrasında, aşağıda açıklanmış olan;

- Yeterli ve düzenli sulama,
- Kök çevresinde malçlama,
- Gövde sarma ve
- Sisleme vb.

gibi gerekli bakım önlemlerinin, titizlikle yapılması, nakledilen ağaçların tutma başarısı açısından büyük önem taşımaktadır.

Transplantasyon çalışmalarında bakım çalışmalarının eksiksiz yapılması, ağacın tutma başarısını artırmaktadır. Ağacın yeni yerine alışabilmesi için, sulama çalışmalarına dikkat edilmeli ve ağacın su ihtiyacına göre belirli sürelerde sulama yapılmalıdır. Diğer bir ifade ile bakım çalışmaları sırasında, ağaç sulamaları ihmal edilmemeli ve özellikle vejetasyon başladıktan sonra daha sık ve düzenli sulanmalıdır.

Özellikle her dem yeşil ağaçlar sonbaharda taşındıklarında, köklerin üstündeki alana saman, yaprak çürüğü, iyi yanmış çiftlik gübresi ile malçlama yapılması faydalı olmaktadır. Çünkü malç tabakası, toprak sıcaklığının düzensiz değişimine engel olarak, toprak sıcaklığını ve toprak nemini korumaktadır.

Gövde sarma, genel olarak büyük fidan materyallerinin dikimleri ve olgun yaştaki ağaçların nakilleri sonrasında uygulanması gereken bir önlemdir. Tür ve iklim koşulları bakımından, kabuk yanmaları gibi sakıncaların giderilebilmesi için bazı ağaçların nakillerinde “gövde sarma” işleminin bakım önlemleri programına alınması gerekir. Bu işlem aynı zamanda hem gövdeden su kayıplarının azaltılmasına, hem de parazitlerin ağaç gövdesine yerleşmesinin önlenmesine katkı sağlar. Sargı malzemesi olarak bu amaç için geliştirilmiş *sargı kâğıtları*, *lateks boya*, *folyon*, *çuval bezi* ve *hasır* gibi geçirimli materyaller kullanılabilir. Sargılara alternatif olarak, özellikle yakıcı güneş etkilerinden korumak amacıyla gövdenin, su ile % 50 oranında seyreltilmiş beyaz lateks ile boyanması da mümkündür. Su ile % 50 oranında seyreltilmiş beyaz lateks, uygulaması kolay ve başarısı yüksek olan bir sarma ya da örtüleme malzemesidir (Dirik, 2014).

Nakledilen ağaçlarda kök hasarlarına bağlı su alımındaki yetersizliklerden kaynaklanan su gerilimini düşürmenin diğer bir çözümü de, tepe tacının içine “sisleme” sistemi kurulmasıdır. Sisleme, sulama tesisatından alınan ve gövdeye bitişik olarak tepe tacının orta hizasına kadar çıkarılan bir sulama borusuna normal püskürtme aparatları takılarak gerçekleştirilebilir.

Sisleme belli aralıklarla elle ya da otomatik sulama sistemine bağlanarak düzenli bir şekilde uygulanmalıdır. Sıcak yaz döneminde her gün öğle vaktinde 2-3 kez sisleme yapılması terlemeye bağlı su kayıplarını belirgin düzeyde

azaltabilir. Yapraklarda tuz birikimine bağılı olası zararları dikkate alarak sislemenin tuz konsantrasyonu yüksek su ile yapılmaması gerekir.

## SONUÇ

Kentsel dokuda peyzaj alanlarının düzenlenmesi, ağaçlandırma gibi çalışmalar yanında mevcut yeşili korumak, hayatiyetini devam ettirmekte çok önemlidir. Mevcut peyzaj alanlarının korunması, bakımlarının yapılması, budama ve sulama çalışmalarının periyodik olarak devam ettirilmesi çevre bilinci açısından çok önemlidir. Kentsel alanlarda ağaç transplantasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi de önemli bir gelişmedir. Fakat bu transplantasyon çalışmalarının bilinçli ve planlı bir şekilde yapılması da aynı şekilde çok önemlidir. Bir ağacın mevcut yerinden yeni yerine taşınmasında yukarı da sıralanan teknikler göz önüne alınarak taşıma işlemi gerçekleştirilmelidir. Her ağacın fiziksel özellikleri ayrıdır. Bundan dolayı her ağacın taşınma işlemi ayrı olmalı ve sadece o ağaç için planlama yapılmalıdır. Mevcut dokuyu korumak çok önemlidir fakat mecbur kalındığında ağaç transplantasyon çalışmalarının yapılması da bir zorunluluktur.

Bu çalışmanın ışığında aşağıda sırasıyla çeşitli öneriler getirilmiştir;

- Her işte olduğu gibi ağaç transplantasyon çalışmalarında da ilk unsur iyi bir planlamadır.
- Ağacın yeni yerine taşınabilmesi için ağacın fiziksel özelliklerine ve kök yapısına göre yeni yerindeki hazırlıkların uygun yapılması gerekmektedir.
- Ağacın yeni yerinde sabitlenmesi ve güvenceye alınmasından sonra sulama, gübreleme ve bakım çalışmalarını aksatmamak gerekir.
- Sağlıksız ve gelecek vaad etmeyen ağaçların taşınması ekonomik olarak uygun değildir.

## KAYNAKLAR

Dirik GH (2014). *Arborikültür (Kentsel Ağaç Kültürü)*. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları Yayın No:5200, İstanbul.

Dirik GH (2014). Kentsel ağaçların işlevleri, koruma önemi ve değer belirleme yaklaşımları. Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi, 15(1): 161-174.

Ürgenç S (1986). *Ağaçlandırma tekniği*. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 375, İstanbul.

Ürgenç S (1998). *Genel plantasyon ve ağaçlandırma tekniği*. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No: 444, İstanbul

URL-1. <http://www.karagozormancilik.com/agac-tasima-transplantasyon/>

URL-2. <http://transplantindustries.com.au/>

URL-3. <http://www.avrupaparkbahceler.com/makale.php?baslik=agac-transplantasyonu&no=12>

URL-4. <https://www.indiamart.com/proddetail/tree-transplanting-9970962373.html>

URL-5. <https://bigtreestoday.com/transplanting/>

## İmidacloprid'in zebra balığı (*Danio rerio*) karaciğer dokusu üzerindeki histolojik etkisi

Cansu Akbulut, Meryem Çabuk\* ve Nazan Deniz Yön

Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SAKARYA, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: meryemcabuk1995@hotmail.com

### Özet

Son zamanlarda sucul ortamlara karışmış olan çevresel kirleticilerin sudaki organizmalarda oluşturduğu biyolojik hasarların belirlenmesi üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu kirleticilerden biri olan İmidacloprid, böcek öldürücüleri olarak görev yapan ve böceklerde merkezi siniri sistemini etkileyen neonikotinoidler adı verilen bir kimyasal sınıfa ait pestisitlerdir. Ziraatta bu pestisitler sıkça kullanıldıkları için yer altı su kaynakları vasıtasıyla su ekosistemine ulaşır ve sucul organizmaları olumsuz etkiler. Bu çalışmanın amacı; İmidacloprid'in, zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) karaciğerindeki histolojik etkilerinin ortaya konmasıdır. Kontrol grubu ve 3 deney (9,5 µg/L, 19 µg/L, 38 µg/L) grubu oluşturuldu. 5 gün boyunca İmidacloprid'e maruz bırakılan balıkların karaciğer dokularına rutin histolojik yöntemler uygulandı ve dokular histolojik boyalar (Hematoksilen-Eozin ve PAS) ile boyandı. Daha sonra karaciğer dokusundaki histopatolojik değişimler ışık mikroskobu ile belirlendi. Deney sonucunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, deney grubu balıklarının karaciğerlerinde vakuolizasyon, sinüzoid boşluğu, sinüzoidlerde hafif kanama ve nekroz gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** İmidacloprid, karaciğer, histopatoloji, zebra balığı

### Histopathological effects of imidacloprid on liver tissue of zebrafish (*Danio rerio*)

#### Abstract

Recently, studies have been done to determine the biological damages of environmental pollutants in aquatic organisms. Imidacloprid, one of these pollutants, is a pesticide of a chemical class neonicotinoids that act as insecticides and affect the central nervous system in insects. In agriculture, these pesticides are frequently used and they reach the aquatic ecosystem through underground water sources and negatively affect aquatic organisms. The aim of this study; Imidacloprid, zebra fish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) in the livers to reveal the histopathological effects. The fishes were divided into the control group (Group-K), experiments (9.5 mg/L, 19 mg/L, 38 mg/L) group were formed. The livers of the fish exposed to Imidacloprid for 5 days were subjected to various histological fixatives and histological dyes (Hematoxylin-Eosin and PAS) were applied. Then histopathological changes in liver tissue were determined by light microscopy. As a result of the experiment, when compared to the control group, vacuolarization in the livers of experimental group fish, vacuolization, sinusoid space, bleeding in sinusoids and necrosis were observed.

**Keywords:** Imidacloprid, liver, histopathology, zebrafish

### GİRİŞ

Günümüzde Dünya nüfusu, çok hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu artışa karşılık ürün sağlanamamakta ve gıda ihtiyaçları gün geçerek azalmaktadır. Bu sorunun giderilmesi için maliyeti düşük, verim ve kalitesi oldukça yüksek, çevre kirliliğine neden olmayacak önlemlerin alınması ile mümkündür. Bugün bu ihtiyaçlarımızı karşılayacak olan "pestisit" adı verilen kimyasallar kullanılmaktadır. Bu kimyasallar ürün artışını sağlamakta

fakat uzun süre su ve toprakta bozulmadan kalarak çevre kirliliğine neden olmaktadır. Dolayısıyla pestisitler besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşabilen çeşitli zararlar oluşturmaktadır (Kurutaş,2003).

Imidacloprid, nikotin maddesini taklit etmek için yapılan bir böcek ilacıdır. Nikotin maddesi de dâhil olmak üzere birçok bitkilerde bulunur. Imidacloprid, sistemik bir insektisittir. Toprakta aylarca veya yıllarca kalabilir. Kalıntıları zamanla toprağa daha sıkı tutunur. Toprak altındaki yer altı su kaynakları vasıtasıyla su ekosistemine inen Imidacloprid, sucul organizmaları olumsuz etkiler. Bu canlılarda sinirin normal bir sinyal gönderme yeteneğini bozar ve durdurur. Bu çalışmada deney model olarak zebra balığı kullanıldı. Zebra balığının en önemli avantajı, deneylerde çok sayıda bireyin aynı anda kullanılabilmesi olmasıdır. Böyle bir alternatif deney hayvanlarına göre daha küçük laboratuvar alanında, düşük maliyet ve geniş veri seti ile gerçekleştirilebilir. Aynı zamanda çoğalmaları kolay ve hızlı büyüyen canlılardır. Bu yüzden zebra balığı kullanılmıştır (Güner,2016).

Bu çalışmada İmidacloprid'in, zebra balığı karaciğer dokusu üzerindeki histolojik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **MATERYAL VE METOD**

### **Ortam koşulu**

Zebra balıkları Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisinde akvaryum sisteminden temin edildi. Akvaryumlar içerisine dinlendirilmiş su koyuldu ve sıcaklıkları yaklaşık 26-28 °C ayarlandı. Balıklar bir hafta akvaryumların içerisinde adapte olması beklenildi. Daha sonra 1 kontrol grubu ile 3 deney (9,5 µg/L, 19 µg/L, 38 µg/L) grubu kurulup her deney grubuna 10 adet zebra balığı koyuldu.5 gün boyunca zebra balıklarının karaciğerleri İmidacloprid'e maruz bırakıldı.

### **Histolojik İşlem**

Uygun kesim yöntemleri kullanılarak alınan zebra balıklarına ait karaciğerler dokuları ilk 24 saat boyunca Bouin fiksatif ile fiske edildi. Daha sonra dokuların dehidrasyonu için yükselen alkol serilerinden geçirilip, ksilol kullanılarak şeffaflaştırma işlemi yapıldı. En son dokular parafin içerisine yerleştirilerek gömüldü.1 gün sonra donmuş parafin bloklarından Leica marka mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler lamel üzerine alındı. Doku örnekleri Hematoksilin-Eozin (H&E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaları ile boyandıktan sonra ışık mikroskobuyla incelenip fotoğraf çekildi.

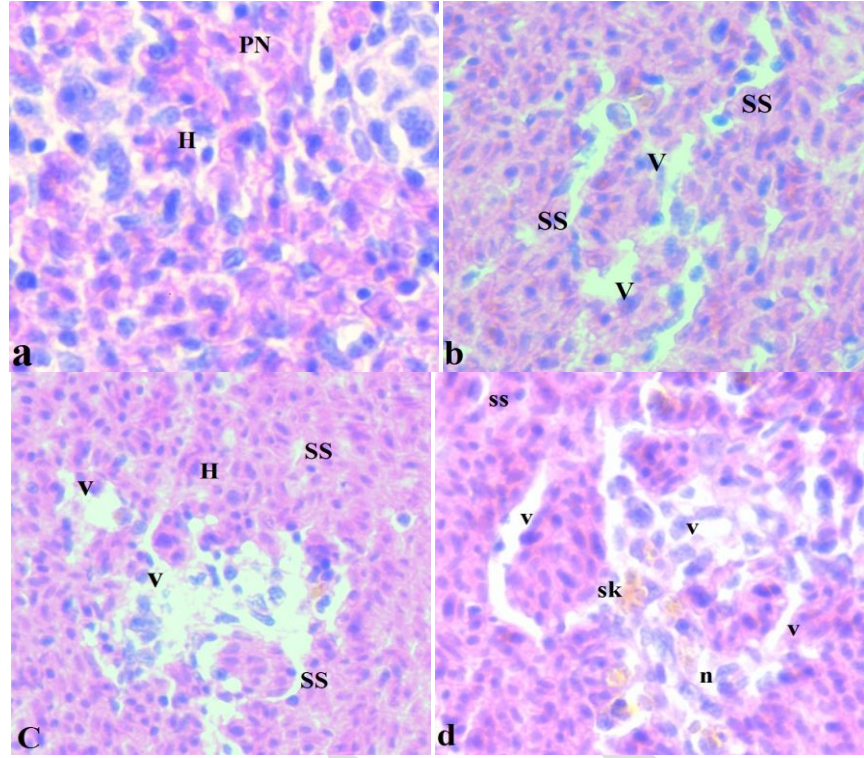
## **BULGULAR**

Kontrol grubuna ait örneklerde normal karaciğer histolojisi gözlemlenmiştir.Hepatositler ve piknotik nukleuslar net bir şekilde görülmektedir.

9,5mg/L imidacloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerarasında vakuolizasyon ve sinuzoid space(boşluk) gözlemlendi.

19mg/L imidacloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerarasındaki vakuolizasyon daha fazla genişlemiş durumdadır. Eş zamanlı olarak sinuzoid boşluk sayısı da arttı.

38mg/L imidacloprid uygulaması yapılmış grupta, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrelerarası sinuzoid boşluğunda kanama başlayıp ve bu boşlukta nekroz(hücre ölümü) gözlemlendi.



**Şekil 1:** a) Kontrol grubu, 40X, b) 9,5 mg/L imidacloprid uygulanmış grup,40X, c) 19 mg/L imidacloprid uygulanmış grup, 40X, d) 38 mg/L imidacloprid uygulanmış grup,40X. H; hepatosit, PN; piknotik nukleus, SS; sinuzoid space, V; vakuolizasyon, n; Nekroz, sk; Sinuzoidlerde kanama, H&E.

## TARTIŞMA

İmidacloprid, su ekolojisi üzerindeki etkisi ve bu ekolojide yer alan sucul organizmalar üzerindeki olumsuz etkisinin araştırılması hem günümüzde hem de gelecekteki bilimsel araştırmalara yön vermede gereklidir. Pek çok özellik bakımında cezbetse de kalıntılarının yok olmaması sebebi ile birçok canlı türü için tehdit unsurudur.

Zebra balığı karaciğer dokusu üzerinde farklı pestisit kullanıp benzer sonuçlar gözlemlenmiş çalışmalarda mevcuttur.

Ertuğ ve ark.,(2014) yaptıkları çalışmada 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) pestisitini zebra balığının karaciğer dokularında histolojik olarak incelemişlerdir. Karaciğer dokusunda protein seviyesinin azalmasına bağlı olarak serbest radikallerin karaciğer dokusunda lezyonlara sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar olup uygulanan doz yükseldikçe karaciğerde akut faz proteinin üretimini olumsuz etkilediği görüldü.

Manjunatha ve ark.,(2015) yaptıkları çalışmada Chlorpyrifos pestisitine maruz kalan zebra balığının karaciğerinde histopatolojik değişiklikler görmüşlerdir. Karaciğer sonuçlarına bakıldığında sinüs boşlukları, hepatositler, vakuolizasyon tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar olup ek olarak sinuzoidlerde kanama, nekroz görüldü.

## SONUÇ

Deney sonucunda her deney grubunda vakuolizasyon ve sinuzoid boşluk gözlemlendi. Doz yükseldikçe hasar daha fazla artıp karaciğerde lezyonlara sebep olduğu tespit edildi. Uygulanan bu dozların zebra balıklarının karaciğerinde akut faz proteinin üretiminde ve sindirim sisteminde olumsuz etkileyebileceği düşünülmüştür. Yapılan bu çalışma, ileride yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Üçüncü S, Üreten M, 2013. ‘‘Dioktil adipat (DOA)’ın *sparus aurata* (çipura) karaciğer ve solungaç histolojisi üzerine etkileri’’,30(3):115-122.
- Dörücü M,Karaman Z,2017. ‘‘Balıklarda bağışıklık sistemi organları ve histolojisi’’,3(1):65-74
- Güner Utku, 2016. ‘‘Zebra balığı *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan) yüzme hareketinin üç boyutlu düzlemde takibi’’,17(1):71-76.
- Kurutaş Ergül , Kılınç Metin,2003. ‘‘Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi ‘’,12:215
- Manjunatha B,Philip G,2015. ‘‘ Histopathological alterations in liver anatomy after exposure to chlorpyrifos in zebrafish (*Danio rerio*),7(7): 191-197
- Yön Ertuğ Nazan Deniz, Akbulut Cansu, Abar Merve, Güneş Selda, ‘‘The histopathological Effects of 2,4(Dichlorophenoxyacetic acid on intestine tissue of zebrafish (*Danio rerio*)’’,Elixir International Journal, S;74(2014),s.27021-27024
- Yön Ertuğ Nazan Deniz, Akbulut Cansu, Kaymak Güllü, Kayhan Figen Esin, ‘‘2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)’in zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton,1822) solungaçlarında antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon seviyesi üzerine akut etkilerinin belirlenmesi’’18(2):143-148,2017.

## A DFT/TDDFT Study: Reactivity analysis of benzimidazolium derivative molecules

Neslihan ŞAHİN<sup>1\*</sup>, Elvan ÜSTÜN<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Cumhuriyet University, Faculty of Education, Department of Basic Education, Sivas, Turkey

<sup>2</sup> Ordu University, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Ordu, Turkey

[\\*neslihan4458@gmail.com](mailto:neslihan4458@gmail.com)

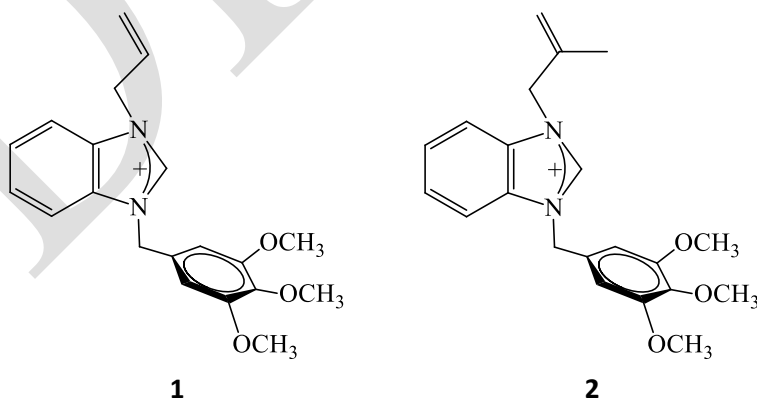
### Abstract

Heterocyclic azoles have shown various bioactivities e.g. antitumor antibacterial, antifungal and antiviral. Moreover, these molecules are well known organometallic ligands due to their strong  $\sigma$ -donor and weak  $\pi$ -acceptor properties. Many benzimidazole derivative molecules were also analyzed for their bioactivities. Theoretical calculation methods provide many useful information before synthesizing the molecules and these data present to saving up money, labor and time. In this study, the characterized [1-(allyl)-3-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazolium]<sup>+</sup> and [1-(metallyl)-3-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazolium]<sup>+</sup> were optimized and analyzed the frontier orbitals of the molecules and Global Reactivity Descriptors.

**Keywords:** Benzimidazole, DFT/TDDFT, Global Reactivity Descriptors

### INTRODUCTION

Heterocyclic azoles such as imidazole and benzimidazole are synthesized and analyzed for their biological and catalytic activities (Bildstein et al., 1999; Hahn and Jahnke, 2008). Recent studies have shown that benzimidazoles have many bioactivity properties such as anticancer, antimicrobial and antifungal (Bansal and Silakari, 2012; Üstün et al., 2017). However, there are many other using areas of benzimidazoles, such as optical lasers, polymeric dyes in optoelectronics, proteins used in biomedical therapy, fluorescence probes for the detection of biologically important molecules such as DNA, RNA, and selective and effective chemo-sensors for the determination of cations and anions (Alamgir et al., 2007). Furthermore, benzimidazole-derived metal-N-heterocyclic carbene complexes exhibit high catalytic activity (Hahn and Jahnke, 2008; Yiğit et al., 2005).



**Figure 1.** The structures of the molecules

It is relatively easy to modify the heterocyclic azoles with different substituents. But the experimental studies which designed without foresight about the activity could be caused time, labor and money loss. With the

developments on theoretical chemistry in recent years, DFT-based theoretical calculations provide many information about the molecules before they are synthesized. One of these methods is the Global Reactivity Descriptors which are calculated from the frontier orbitals of molecules (Üstün et al., 2018). These descriptors consist of 6 different scales: Ionization Potential (IP), Electron Affinity (EA), Electronegativity ( $\chi$ ), Chemical Potential ( $\mu$ ), Global Softness (S), Chemical Hardness ( $\eta$ ). It is possible to comment on the reactivity of the molecules via donor/acceptor properties and hard/soft acid-base concept (Pearson, 1987).

In this study, the synthesized [1-(allyl)-3-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazolium]<sup>+</sup> [**1**] and [1-(metallyl)-3-(3,4,5-trimethoxybenzyl)benzimidazolium]<sup>+</sup> [**2**] were optimized with ORCA package and analyzed the frontier orbitals of the molecules and Global Reactivity Descriptors.

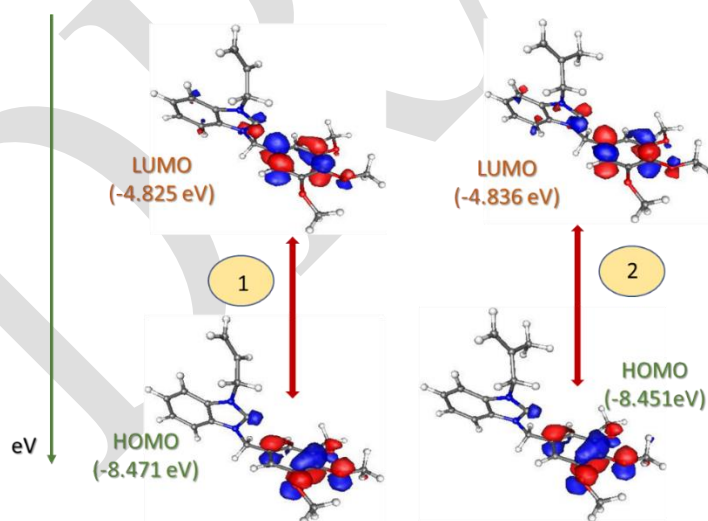
## MATERIALS AND METHODS

The theoretical calculations of the molecules have been performed by ORCA package (Neese, 2009; Neese, 2012). RI-BP86 functional and SVP basis sets were used in optimization process of the molecules with tightscf and grid4 options. KDIIS SOSCF were preferred for scalar relative effects and the calculations were accelerated with SVP/J auxiliary basis set and the basis sets were arranged as def2-SVP def2-SVP/J.

Global Reactivity Descriptors of the molecules were calculated with the equation in Hazarika et al (2009). The HOMO and LUMO orbitals of the molecules were drawn with gOpenMol.

## RESULTS and DISCUSSION

The frontier orbitals of the molecules are important criteria for analyzing the reactivity. It is known that LUMO is acceptor region of the molecules while the molecules act as a donor through HOMO. The nature of the investigated property of the molecule could be evaluated by which frontier is active in the bioactivity reaction. If the molecule is activated by taking an electron pair to the medium, the energy and the region of the LUMO is an indicator of the active region of the molecule and it is possible to discuss the activity of the molecule by analyzing this region.



**Figure 2.** Graphical illustrations and the energies of HOMO and LUMO of the molecules

HOMO of **1** is -8.471 eV while the HOMO energy of **2** was calculated as -8.451 eV. Also, the LUMO of **1** has been calculated -4.825 eV while the LUMO energy of **2** was calculated as -4.836 eV. With the aid of the graphical simulations of the HOMO and LUMO orbitals obtained from DFT-based calculations were plotted for both



molecules with gOpenMol software (Figure 2). In both molecules, the HOMO and LUMO orbital are located mostly on the benzyl ring. This means that, these salts both accept and donate electrons on benzyl in a reaction.

**Table 2.** Global Reactivity Descriptors of the Molecules (in eV)

	IP	EA	$\chi$	$\mu$	$\eta$	S	$\omega$
<b>1</b>	8.471	4.825	6.648	-6.648	1.823	0.274	12.110
<b>2</b>	8.451	4.836	6.643	-6.643	1.807	0.277	12.224

The HOMO and LUMO energies could be used for the relative consideration of the reactivity of the molecules. The Ionization Potential (IP), Electron Affinity (EA), Electronegativity ( $\chi$ ) and Chemical Potential ( $\mu$ ) of the molecules are defined as the Global Reactivity Descriptors and are calculated by using theoretical HOMO and LUMO energies (Table 1). Ionization potential and electronegativity of **1** is higher but the electron affinity of **2** is better. Global softness (S) and chemical hardness ( $\eta$ ) are also known as evaluation criteria for the reactivity of molecules. The stability of a molecule decreases with increasing global softness of a molecule. Chemical hardness is just the reciprocal of global softness, so the higher the hardness, the lower the reactivity and **2** are more reactive. Electrophilicity index ( $\omega$ ) is a new concept which is defined as reactivity indicator especially in recent years. It could be defined as the electrophilic strength of the molecule against a nucleophile and in this study, **2** has a stronger electrophilic capacity.

## CONCLUSION

The good agreement between the computational data and the experimental results is a good motivation for applying theoretical methods in many fields in recent years. We had knowledge about frontier molecular orbitals and global reactivity descriptors of the molecules in this study. In further studies, it is planned to calculate for new complexes with different substituents on benzyl region.

## REFERENCES

- Alamgir M, Black SC, Kumar N. 2007. Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Benzimidazoles. Topics in Heterocyclic Chemistry, 9(July):87–118.
- Bansal Y, Silakari O 2012. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 20(21): 6208–6236.
- Bildstein B, Malaun M, Kopacka H., Wurst K, Mitterbock M, Ongania KH, Opromolla G, Zanello P 1999. N,N'-Diferrocenyl-N-heterocyclic Carbenes and Their Derivatives. Organometallics, 18(6): 4325–4336.
- Hahn FE, Jahnke MC 2008. Heterocyclic carbenes: Synthesis and coordination chemistry. Angewandte Chemie - International Edition, 47:3122–3172.
- Hazarika KK, Baruah NC, Deka RC 2009. Molecular structure and reactivity of antituberculosis drug molecules isoniazid, pyrazinamide, and 2-methylheptylisonicotinate: A density functional approach. Structural Chemistry, 20(6):1079–1085.
- Neese F 2009. Prediction of molecular properties and molecular spectroscopy with density functional theory: From fundamental theory to exchange-coupling. Coordination Chemistry Reviews, 253:526–563.
- Neese F 2012. The ORCA program system. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2(February):73–78.
- Pearson RG 1987. Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases. Journal of Chemical Education,

64(7): 561.

Üstün E, Düşünceli S, Özdemir İ 2019. Theoretical analysis of frontier orbitals, electronic transitions, and global reactivity descriptors of  $M(CO)_4L_2$  type metal carbonyl complexes: a DFT/TDDFT study. *Structural Chemistry*, 30:769–775.

Üstün E, Özgür A, Coşkun KA, Düşünceli SD, Özdemir İ, Tutar Y 2017. Anticancer activities of manganese-based photoactivatable CO-releasing complexes (PhotoCORMs) with benzimidazole derivative ligands. *Transition Metal Chemistry*, 42:331-337.

Yiğit M, Özdemir İ, Çetinkaya B, Çetinkaya E 2005. Novel N-heterocyclic-carbene-rhodium complexes as hydrosilylation catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 241:88–92.

DRAFT

## 1-(Allyl)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolium tuzu ve bu tuzun Ag(I) kompleksinin antiproliferatif aktivitesinin araştırılması

Neslihan ŞAHİN<sup>1\*</sup>, Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

[\\*neslihan4458@gmail.com](mailto:neslihan4458@gmail.com)

### Özet

Bu çalışmada, bir N-heterosiklik karben (NHC) tuzunun (**1**) ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksinin (**2**) sentezi ve antiproliferatif aktivitesi araştırılması amaçlandı. NHC tuzunun (**1**) ve Ag(I)-NHC kompleksinin (**2**), insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan kolorektal adenokarsinomu (HT-29), insan endometrial adenokarsinomu (Ishikawa), insan glioblastom (U-87) ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücrelerinde antiproliferatif aktiviteleri MTT yöntemi kullanılarak 48 saat için test edildi. Ag(I)-NHC kompleksi (**2**) tüm hücre hatlarına karşı doza-bağlı antiproliferatif aktivite göstermiştir. Tuz ve kompleks, 48 saat için sırasıyla  $5.58 \pm 0.20 \mu\text{M}$  ve  $32.44 \pm 0.12 \mu\text{M}$  IC<sub>50</sub> değerlerine sahip oldukları HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücrelerine karşı en yüksek antiproliferatif aktiviteyi göstermişlerdir. Kompleksin sağlıklı hücreler için gözlenen IC<sub>50</sub> değerinin HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür, bu da kompleksin HT-29 insan kolorektal kanser hücreleri için dikkate değer bir seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Tuz ve kompleks, HT-29 insan kolorektal kanseri için sırasıyla 1.8 kat ve 1.5 kat seçicilik göstermişlerdir.

**Anahtar Kelimeler:** N-heterosiklik karben, Gümüş, MTT, Antiproliferatif aktivite.

### Investigation of Antiproliferative Activity of 1-(allyl)-3-(2-chlorobenzyl)benzimidazolium Salt and its Ag(I) Complex

#### Abstract

The aim of this study was to present the synthesis, investigation of the antiproliferative activity of a N-heterocyclic carbene (NHC) salt (**1**) and its Ag(I)-NHC complex (**2**). NHC salt (**1**) and Ag(I)-NHC complex (**2**) were tested for antiproliferative activities on human cervical adenocarcinoma (HeLa), human colorectal adenocarcinoma (HT-29), human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa), human glioblastoma (U-87) and WI-38 healthy human lung fibroblast cells for 48 h using MTT assays. The Ag(I)-NHC complex (**2**) showed dose-dependent antiproliferative activity against all cell lines. Salt and complex have shown the highest antiproliferative activity against HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells displaying IC<sub>50</sub> values  $5.58 \pm 0.20 \mu\text{M}$  and  $32.44 \pm 0.12 \mu\text{M}$  at 48 h, respectively. The IC<sub>50</sub> for complex was higher in healthy cells compared to the HT-29 human colorectal adenocarcinoma cells, suggesting that complex possessed noteworthy selectivity for HT-29 human colorectal cancer cells. Salt and complex showed selectivity 1.8-fold and 1.5-fold for HT-29 human colorectal cancer cells.

**Keywords:** N-heterocyclic carbene, Silver, MTT, Antiproliferative activity.

### GİRİŞ

Evrensel bir sorun olan ve her yıl milyonlarca insanın yaşamını kaybetmesine neden olan kanser, kalp hastalıklarından sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında 18.1 milyon yeni kanser vakası olacağı ve bunlardan 9.6 milyon vakanın ölümle sonuçlanacağı tahmin öngörülmektedir (Bray ve ark., 2018). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin, toksik ölümler, lökosit azalması, solunum güçlüğü, halsizlik, felç, kan pıhtılaşması ve yorgunluk gibi ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Bu yan etkilerin azaltılarak kanserin uzamış tedavisinde yaşam kalitesinin artırılması amacıyla düşük toksisite ve daha az yan etkiye sahip olan yeni aday antikanser bileşiklerin araştırılması önem kazanmaktadır. İlaça karşı direncin ortaya çıkması da ciddi bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir.

Literatür incelendiğinde çeşitli metal-NHC komplekslerinin bu amaç doğrultusunda sentezlendiği görülmektedir. N-Heterosiklik karbenler (NHC'ler) önemli bir organometalik kimyanın önemli bir grubu haline gelmiştir

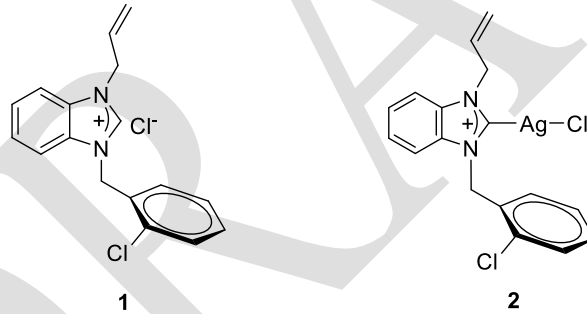
(Hopkinsan ve ark., 2014; Liu ve ark., 2017; Nesterov ve ark., 2018; Roth ve ark., 2015; Wang ve ark., 2018). NHC'lerin katalitik uygulamalarının yanı sıra, NHC bazlı organometalik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Asekunowo ve ark., 2018; Boxelli ve ark., 2015; Bouché ve ark., 2018; Curran ve ark., 2018; Nomiya ve ark., 2018; Yun ve ark., 2019; Shen ve ark., 2019; Verma ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2015). NHC'lerin biyolojik aktiviteleri, halka büyüklüğüne ve halka üzerindeki bağlı grupların yapısına göre büyük değişkenlik göstermektedir (Collett ve ark., 2015; Chung ve Grubbs, 2008; Scott ve Nolan, 2005). Memeli hücreleri için, metaller içinde en az toksiteye sahip olan birkaç metalden biri olan gümüş ile birlikte benzimidazol yapısı ilaç keşfi ve tıbbi biyokimyada önemli bir yapı olduğundan, benzimidazol içeren Ag(I)-NHC bileşiklerine olan ilgi artmaktadır (Haq ve ark., 2015; Iqbal ve ark., 2015; Johnson ve ark., 2017; Melaiya ve ark., 2004). Organometalik farmasötik araştırmaların çoğunluğu platin ve altın üzerine odaklanırken, NHC-gümüş kompleksleri tıbbi uygulamalarda önemli bir antikanser ajan sınıfı haline gelmiştir.

Bu çalışmada 1-(allil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum tuzu (**1**) ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksi (**2**) sentezlenmiştir. Daha sonra insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87) hücre hatları kullanılarak 1-(allil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum tuzu ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksinin antiproliferatif aktivitesi araştırılmıştır. Tuz (**1**) ve kompleks (**2**) sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerine de uygulanarak, sağlıklı ve kanserli hücreler arasında seçici davranışları da araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Bileşiklerin sentezlenmesi

1-(allil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum tuzu (**1**) ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksi (**2**) literatüre göre sentezlenmiştir (Şahin ve ark., 2019). (Şekil 1).



Şekil 1. 1-(Allyl)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolium tuzu (**1**) ve bu tuzun Ag(I) kompleksi (**2**)

### Bileşiğin seyreltik çözeltilerinin hazırlanması

Tuz (**1**) ve kompleks (**2**) DMSO'da çözülerek stok çözeltisi hazırlandı ve besi yeri ile seyreltilerek farklı derişimlerdeki örnekler hazırlandı.

### Antiproliferatif aktivite belirlenmesi; MTT ölçümü

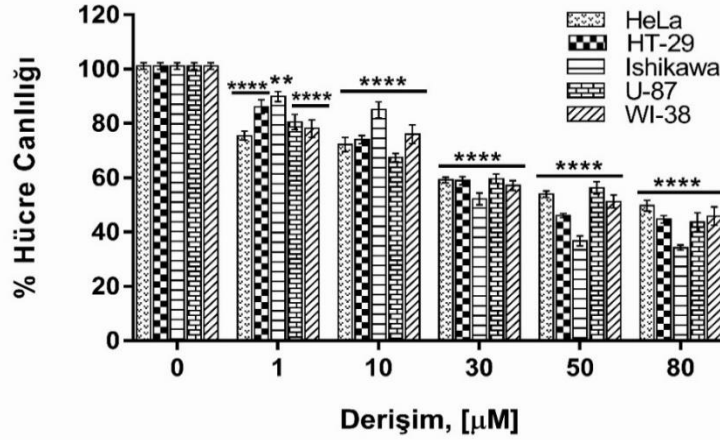
Bileşiklerin insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87) hücreleri ve normal insan akciğer fibroblast hücreleri (WI-38) hücreleri üzerine antiproliferatif aktiviteleri MTT testi ile belirlendi (Skehan ve ark., 1990). HeLa, HT-29, Ishikawa, U-87 hücreleri 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomycin içeren DMEM besi yerinde, WI-38 hücreleri ise RPMI-1640 besi yerinde ve 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Üstel olarak büyüyen hücreler pasajlanarak 1x10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat beklenildikten sonra, farklı derişimlerdeki tuz (1-80 µM) ve kompleks (1-20 µM), 48 süre ile hücrelere uygulandı. Bileşiklerin uygulamasından 48 saat sonra herbir kuyuya MTT eklendi ve 2 saat inkübatörde bekleme bırakıldı. İki saatin sonunda plakalar içindeki besi yeri aspire edilerek herbir kuyuya 100 µL DMSO eklendi ve plakalar 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerine inkübe edildi. Absorbans değerleri Elisa cihazında 570 nm dalga boyunda okundu. Deneyler dokuz tekrarlı olarak yapıldı (n=9) IC<sub>50</sub> değerleri ve GraphPad Prism7 kullanılarak belirlendi.

## İstatistiksel çalışmalar

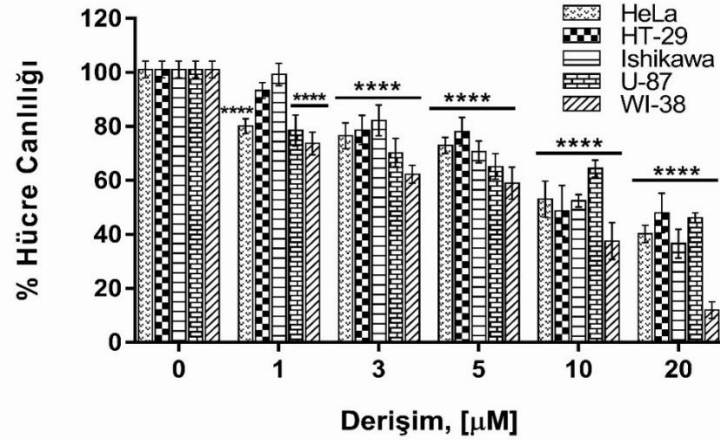
Araştırma kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar dokuz tekrarlı yapıldı (n=9), sonuçlar standart sapmalarıyla ( $\pm$  SEM) birlikte verilmiştir. GraphPad Prism7 grafik ve istatistik programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak one-way analizi uygulanmış ve anlamlılık için (\*\* p <0.005, \*\*\*\* p <0.0001) seçilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bileşiğin insan HeLa, HT-29, Ishikawa, U-87 kanser hücreleri ve WI-38 insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kullanılarak belirlenmiştir.



(a)



(b)

**Şekil 2.** 1-(Allyl)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolium tuzu, (1), (a) ve Ag kompleksi, (2), (b)'nin HeLa, HT-29, Ishikawa, U-87 kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi (48 saat). Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar  $\pm$ SEM olarak verilmiştir (Kontrole göre anlamlılık; \*\* p<0.005, \*\*\*\* p<0.0001).

MTT, antiproliferaif aktivitenin belirlenmesinde faydalanılan yöntemlerden birisidir. Canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz dehidrogenaz enzimiyle çözünmeyen mor renkli formazona dönüştürülmektedir. Oluşan yeni formazon yapı, farklı çözücüler yardımıyla çözünür hale getirilerek absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılmaktadır. Şekil 2’de; x eksenini tuz ve kompleks derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Şekil 2’e göre, tuz ve kompleks derişimindeki artışla paralel olarak canlı HeLa, HT-29, Ishikawa, U-87 kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücre sayısında azalma yani antiproliferatif aktivitede artış gözlenmiştir. Şekil 2’deki grafiklerden yararlanılarak, tuz ve kompleksin HeLa, HT-29, Ishikawa, U-87 kanser hücreleri ve WI-38 insan akciğer fibroblast hücrelerinin % 50’sini öldürdükleri derişim değerleri (IC<sub>50</sub>) saptanmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1.** Tuz (1) ve Ag-kompleksin (2) insan servikal, kolorektal, endometrium, glioblastom kanser hücreleri ve sağlıklı insan akciğer fibroblast hücrelerinde<sup>a</sup> 48 saat için IC<sub>50</sub> değerleri

Hücre hattı	IC <sub>50</sub> , (µM) <sup>b</sup>	
	1	2
HeLa	66.33 ± 0.26	12.73 ± 0.03
HT-29	32.44 ± 0.12	5.58 ± 0.20
Ishikawa	35.52 ± 0.14	11.52 ± 0.03
U-87	74.51 ± 0.08	14.36 ± 0.05
WI-38 <sup>a</sup>	56.55 ± 0.28	7.64 ± 0.03

<sup>a</sup> Sağlıklı hücre, <sup>b</sup> Bileşiklerin uygulanmasından 48 saat sonra hücre canlılığı deneysel kısımda açıklanan MTT ölçümü ile yapıldı. Herbir % inhibisyon değeri birbirinden bağımsız yapılan 3 ayrı deneyin (n=9) sonucu ± SEM olarak verildi.

IC<sub>50</sub> değeri; kanser hücrelerinin %50’sinin öldürülmesi için gerekli derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. IC<sub>50</sub> değerinin düşük olması yüksek antiproliferatif etkiye işaret etmektedir. Kompleks ve tuzun en düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip oldukları HT-29 kanser hücrelerinde en yüksek aktiviteye, en büyük IC<sub>50</sub> değerine sahip oldukları U-87 hücrelerinde ise en düşük aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Kompleksin antiproliferatif aktivite sıralamasının HT-29, WI-38, Ishikawa, HeLa ve U-87 sıralamasıyla azaldığı bulunmuştur. Tuz ve kompleksin antiproliferatif aktivitesinin doza ve hücre hattı türüne göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Tuz ve kompleks, HT-29 insan kolorektal kanseri için sırasıyla ≥1.8 kat ve ≥1,5 kat seçicilik göstermiştir. MTT analiz sonuçlarına göre, tuz ve kompleksin kanser hücrelerinin canlılık oranlarını derişime bağılı olarak azalttığı yani derişimdeki artışla uyumlu olarak tuz ve kompleksin antiproliferatif aktivitesinin arttığı bulundu. Sonuçlarımız ayrıca tuzun (1) komplekse (2) göre daha düşük antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

## SONUÇ

Kanser tüm dünyada, kalp damar hastalıklarından sonra en çok ölüme neden olan hastalıktır. Bu nedenle yeni anti kanser ilaç bileşenlerinin elde edilmesi sağlık açısından çok büyük öneme sahiptir. Var olanlardan kimyasal olarak farklı, geniş spektrumlu ve aynı zamanda düşük sitotoksiteye sahip yeni anti-kanser ajanlar dizayn edilmesi ve bu bileşiklerin sentezlenmesi önemli hale gelmektedir. Son yıllarda organometalik bileşikler; özellikle N-heterosiklik karbon bileşiklerinin metal kompleksleri koordinasyon kimyasında yoğun olarak çalışılmaktadır. Memeli hücreleri için metaller içinde en az toksiteye sahip olan birkaç metalden biri olan gümüş ile birlikte benzimidazol yapısı da ilaç keşfi ve tıbbi biyokimyada önemli bir yapı olduğundan, benzimidazol içeren Ag(I)-NHC bileşiklerine olan ilgi artmaktadır.

Bu çalışmada 1-(allil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum tuzu (1) ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksi (2) sentezlenmiştir. Daha sonra insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87) hücre hatları kullanılarak 1-(allil)-3-(2-klorobenzil)benzimidazolyum tuzu ve bu tuzun Ag(I)-NHC kompleksinin antiproliferatif aktivitesi araştırılmıştır. Tuz (1) ve kompleks (2) sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerine de uygulanarak, sağlıklı ve kanserli hücreler arasında seçici özellikleri de araştırılmıştır. Kompleksin (2) tüm hücre hatlarında doza-bağılı antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ve en yüksek aktiviteyi HT-29 insan kolorektal adenokarsinom hücreleri üzerine gösterdiği gözlenmiştir. Tuz ve kompleksin, HT-29 insan kolorektal kanseri için sırasıyla ≥1.8 kat ve ≥1,5 kat seçicilik gösterdikleri bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Antiproliferatif aktivite çalışmaları Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (SCÜTAM)'da yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Asekunowo PO, Haque RA, Razali MR, Avicor SW, Wajidi MFF 2018. Synthesis and characterization of nitrile functionalized silver(I)-N-heterocycliccarbene complexes: DNA binding, cleavage studies, antibacterial properties and mosquitocidal activity against the dengue vector, *Aedes albopictus*. *Eur J Med Chem.* 150:601-615. doi: [10.1016/j.ejmech.2018.03.029](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.029).
- Bouché M, Bonnefont A, Achard T, Bellemin-Lapponnaz S 2018. Exploring diversity in platinum(iv) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, characterization, reactivity and biological evaluation. *Dalton T*, 47(33):11491-11502. doi: [10.1039/c8dt02113a](https://doi.org/10.1039/c8dt02113a).
- Boxelli L, Carraz M, Mazères S, Paloque L, González G, Benoit-Vica F, Valentin A, Hemmert C, Gornitzka H 2015. Synthesis, Structures, and Biological Studies of Heterobimetallic Au(I)–Ru(II) Complexes Involving N-Heterocyclic Carbene-Based Multidentate Ligands. *Organometallics.* 34(6):1046–1055 doi: [10.1021/om501158m](https://doi.org/10.1021/om501158m).
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018. Global cancer statistics. *GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424. doi: [10.3322/caac.21492](https://doi.org/10.3322/caac.21492).
- Chung CK, Grubbs RH 2008. Olefin metathesis catalyst:stabilization effect of backbone substitutions of N-heterocyclic carbene. *Org Lett.* 10(13):2693-6. doi: [10.1021/ol800824h](https://doi.org/10.1021/ol800824h).
- Collett CJ, Massey RS, Taylor JE, Maguire OR, O'Donoghue AC, Smith AD 2015. Rate and Equilibrium Constants for the Addition of N-Heterocyclic Carbenes into Benzaldehydes:A Remarkable 2-Substituent Effect. *Angew Chem Weinheim Bergstr Ger.* 127(23):6991-6996.
- Curran D, Dada O, Müller-Bunz H, Rothmund M, Sánchez-Sanz G, Schobert R, Zhu X, Tacke M. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Novel NHC-Gold(I) Complexes Derived from Lepidiline A. *Molecules.* 2018;23(8). pii: E2031. doi: [10.3390/molecules23082031](https://doi.org/10.3390/molecules23082031).
- Haque RA, Choo SY, Budagumpi S., Abdullah AAA, Ahamed MBK, Majid AMA 2015. Synthesis, crystal structures, characterization and biological studies of nitrile-functionalized silver (I) N-heterocyclic carbene complexes. *Inorg Chim Acta.* 433:35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.04.023>
- Hopkinson MN, Richter C, Schedler M, Glorius F 2014.. An overview of heterocyclic carbenes. *Nature.* 510(7506):485-96. doi: [10.1038/nature13384](https://doi.org/10.1038/nature13384).
- Iqbal MA, Umar MI, Haque RA, Khadeer Ahamed MB, Asmawi MZ, Majid AM 2015. Macrophage and colon tumor cells as targets for a binuclear silver(I) N-heterocyclic carbene complex, an anti-inflammatory and apoptosis mediator. *J Inorg Biochem.*146:1-13. doi: [10.1016/j.jinorgbio.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.02.001).
- Johnson NA, Southerland MR, Youngs WJ 2017. Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-NHC Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules.* 22(8). doi: [10.3390/molecules22081263](https://doi.org/10.3390/molecules22081263).
- Liu Y, Zhang X, Zeng R, Zhang Y, Dai QS, Leng HJ, Gou XJ, Li JL 2017.Recent Advances in the Synthesis of Spiroheterocycles via N HeterocyclicCarbene Organocatalysis. *Molecules.* 22(11). pii: E1882. doi: [10.3390/molecules22111882](https://doi.org/10.3390/molecules22111882).
- Melaiye A, Simons RS, Milsted A, Pingitore F, Wesdemiotis C, Tessier CA, Youngs WJ 2004. Formation of water-soluble pincer silver(I)-carbene complexes: a novel antimicrobial agent. *J Med Chem.* 47(4):973-977.
- Nesterov V, Reiter D, Bag P, Frisch P, Holzner R, Porzelt A, Inoue S 2018. NHCs in Main Group Chemistry. *Chem Rev.* 118(19):9678-9842. doi: [10.1021/acs.chemrev.8b00079](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00079).
- Nomiya K, Morozumi S, Yanagawa Y, Hasegawa M, Kurose K, Taguchi K, Sakamoto R, Mihara K, Kasuga NC 2018. Syntheses, Structures, and Antimicrobial Activities of Gold(I)- and Copper(I)-N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes Derived from Basket-Shaped Dinuclear Ag(I)-NHC Complex. *Inorg Chem.* 57(18):11322-11332. doi: [10.1021/acs.inorgchem.8b00011](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00011).
- Roth T, Vasilenko V, Benson CGM, Wadepohl H, Wright DS, Gade LH 2015. Extending N-heterocyclic carbene ligands into the third dimension: a new type of hybrid phosphazane/NHC system. *Chem Sci.* 6(4):2506-2510. doi: [10.1039/c4sc03966a](https://doi.org/10.1039/c4sc03966a).

- Scott NM, Nolan SP 2005. Stabilization of organometallic species achieved by the use of N-heterocyclic carbene (NHC) ligands. *Eur J Inorg Chem.* (10):(2005) 1815e1828. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500030>
- Shen W, Yang L, Wu Y, Bao L, Li Y, Jin P, Fang H, Xie Y, Lu X 2019. Reactions between N-Heterocyclic Carbene and Lutetium-Metallofullerenes: High Regioselectivity Directed by Electronic Effect in Addition to Steric Hindrance. *J Org Chem.* 84(2):606-612. [doi: 10.1021/acs.joc.8b02423](https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02423).
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82:1107-12.
- Şahin-Bölükbaşı S, Şahin N, Tahir MN, Arıcı C, Çevik E, Gürbüz N, Özdemir İ, Cummings BS 2019. Novel N-heterocyclic carbene silver (I) complexes: Synthesis, structural characterization, and anticancer activity. *Inorg. Chim. Acta.* 486: 711-718.
- Verma SK, Kumari P, Ansari SN, Ansari MO, Deori D, Mobin SM. A novel mesoionic carbene based highly fluorescent Pd(ii) complex as an endoplasmic reticulum tracker in live cells. *Dalton T*, 2018;47(44):15646-15650. [doi: 10.1039/c8dt02778a](https://doi.org/10.1039/c8dt02778a).
- Wang N, Xu J, Lee JK. The importance of N-heterocyclic carbene basicity in organocatalysis. *Org Biomol Chem.* 2018;16(37):8230-8244. [doi: 10.1039/c8ob01667d](https://doi.org/10.1039/c8ob01667d).
- Yun BS, Kim JH, Kim SY, Son HJ, Cho DW, Kang SO. Photophysical properties of structural isomers of homoleptic Ir-complexes derived from xylenyl-substituted N-heterocyclic carbene ligands. *Phys Chem Chem Phys.* 2019;21(13):7155-7164. [doi: 10.1039/c9cp00553f](https://doi.org/10.1039/c9cp00553f).
- Zhu T, Mou C, Li B, Smetankova M, Song BA, Chi YR 2015. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed  $\delta$ -Carbon LUMO Activation of Unsaturated Aldehydes. *J Am Chem Soc.* 137(17):5658-61. [doi: 10.1021/jacs.5b02219](https://doi.org/10.1021/jacs.5b02219).



## Temel bilimler ve nanoteknoloji

Arzu Kırak\*, Derya Peker, Huriye Zeynep Kakacak

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Eskişehir, Türkiye

\*a\_kirak2001@yahoo.com

### Özet

Nanoteknoloji; bir malzemeyi oluşturan yapıların herhangi bir amaç için kullanılmak üzere atom seviyesinde yeniden düzenlenmesidir. Fizik ve kimya gibi temel bilimlerden doğan nano boyuttaki moleküler yapılar, sağlık teknolojisinin aradığı önemli fırsatları sunmaktadır. Nanoteknoloji ile son yıllarda daha fonksiyonel, daha hızlı, az yer kaplayan, az enerji harcayan, ucuz, olağanüstü yeni özelliklere sahip malzeme, cihaz ve sistemlerin üretilebilmesi; tıbbi görüntüleme, mikrobiyoloji, dokuların yenilenmesi, bazı kronik hastalıkların tedavisi gibi pek çok uygulama alanında önemli gelişmelerin kaydedilmesini beraberinde getirmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoteknoloji, Tıp ve Sağlık, Nano Yapılar, Nano Cihazlar.

Nanoteknoloji, hayatımızı birçok alanda etkileyecek hatta çığır açabilecek bir gelişmedir. Bu teknoloji çağımızın yeni sanayi devrimi olarak nitelendirilmektedir.

Nanoteknolojiyi bu kadar ilginç kılan unsur, malzemelerin nano boyutta oldukları zaman makro dünyadan hatta mikro dünyadan farklı davranmalarıdır. Örneğin, yarıiletken olarak bilinen ve çağımızın en önemli malzemesi olan silisyumdan yapılan bir telin çapı nanometreye yaklaşırken tel iletken bir karakter sergilemeye başlamaktadır.

Nanoteknoloji; bir malzemeyi oluşturan yapıların herhangi bir amaç için kullanılmak üzere atom seviyesinde yeniden düzenlenmesidir.

Boyutlar nanometre ölçeklerine yaklaşırken malzemenin fiziksel özellikleri kuantum mekaniğinin kontrolüne girmekte, elektron durumlarının fazı ve enerji spektrumunun kesikli yapısı daha belirgin bir hal almaktadır. Daha da önemlisi, malzemeyi oluşturan atom sayıları 100'ler düzeyine inince, atomsal yapının geometrisi, hatta atom sayısının kendisi bile fiziksel özelliklerin belirlenmesinde etken rol oynamaktadır.

Nano ölçeklerdeki bir yapıya yeni eklenen her atomun fiziksel özelliklerde neden olduğu değişiklikler, bu atomun cinsine, nano yapının türüne ve geometrisine bağlı olarak farklılık gösterir. Nano yapının iletkenliği, o yapıya tek bir atom eklense bile değişebilmektedir. Benzer şekilde, nano ölçeklerde atomlar arası bağ yapısı da değişikliğe uğrayabilmekte; mekanik olarak malzeme güçlenirken ya da zayıflarken, elektronik olarak iletkenlik özelliği tümüyle değişebilmektedir.

Nanoteknolojinin sağladığı imkânları kısaca özetlersek;

- Nanometre ölçekli yapıların analizi,
- Yeni nano ölçekli fonksiyonel malzemeler oluşturulması,
- Nanometre boyutundaki yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
- Nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi,
- Nano ölçekli cihazların geliştirilmesi ,
- Nano boyuttaki maddenin kontrol edilmesi,
- Uygun yöntemler bularak nanoskopik ve mikroskopik dünya arasındaki bağın kurulmasıdır.

Nanoteknoloji alanındaki gelişme, 1981'de Gerd Binnig ve Heinrich Röhrer'in (1986 Nobel Ödülü), hem malzemeleri atomik düzlemde incelemeye hem de bunları atomik ölçekte manipüle etmeye yarayan ilk aygıt olan "taramalı tünelleme mikroskobu"nu (STM) icat etmeleriyle olmuştur. "Atomik kuvvet mikroskobu" (AFM), "taramalı elektron mikroskobu" (SEM) gibi aygıtlar, atomik bağlanmanın, moleküllerin kendiliğinden bir araya

gelmeleri ve malzemelerin en küçük ölçekteki yapılarının işleyişiyle ilgili görüntüler sağlamıştır ve atomik manipülasyonu kimyanın ‘deney beherinden’ çıkarıp mühendislik dünyasına taşımışlardır.

Fizik ve kimya gibi temel bilimlerden doğan nano boyuttaki moleküler yapılar, sağlık teknolojisinin aradığı önemli fırsatları sunmaktadır. Nanoteknoloji ile son yıllarda daha fonksiyonel, daha hızlı, az yer kaplayan, az enerji harcayan, ucuz, olağanüstü yeni özelliklere sahip malzeme, cihaz ve sistemlerin üretilebilmesi; tıbbi görüntüleme, mikrobiyoloji, dokuların yenilenmesi, bazı kronik hastalıkların tedavisi gibi pek çok uygulama alanında önemli gelişmelerin kaydedilmesini beraberinde getirmektedir.

Tıp alanında teknolojinin ilerleyebilmesi vücudumuz ve yaşam sistemimiz hakkında yeterli bilgiye sahip olmamıza bağlıdır. Nanoteknolojinin önemi bu noktada ortaya çıkmaktadır. Nano boyutta malzemelerin ve cihazların geliştirilmesiyle, eski teknolojik cihazlara kıyasla vücudumuz ve yaşayan sistemlerimiz hakkında ayrıntılı analiz ve keşifler yapma imkânı doğmuştur. Üretilen malzemeler ve cihazlar hücrelere ve dokularla moleküler seviyede temas girer ve teknoloji ile biyolojik sistemler arasında bütünleşme sağlanmış olur .

Otonom moleküler aletler, insan vücuduna gönderilerek, organları gözlemleyip hafızasına kaydetme yetisine sahiptir. Bu aletler sayesinde hem zamansal hem de bölgesel gözlem yapılabilmektedir. Ayrıca bu aletlerle vücudun gerekli görülen bölgelerinden küçük örnekler alınabilir, daha sonra bu aletler, kanla birlikte çıkartılarak, alınan bilgiler ve numunelerle analizler yapılabilmektedir. Bu şekilde sağlıklı ve sağlıklı dokular teşhis edilebilmekte ve gerekli tedaviye başlanabilmektedir.

#### **Nano Tıbbın Alanları :**

- Nanomateryaller
- Yüzeylerin kontrolü
- Hücre içi aletler
- BioMEMS
- Enzim kontrolü
- Nanorobotlar
- Nanoporlar
- Hücre uyarımı ve tanısı
- DNA dizimi, manipülasyonu ve tanısı
- Tanısal aletler çipler, sensörler
- İlaç salınımı
- Nanoterapötikler
- Sentetik biyoloji ve nanoaletler
- Biyoteknoloji ve biyrobotikler

#### **Nanometaryeller**

Nanomateryaller, yüksek yüzey-hacim oranı ile ilişkili eşsiz özellikleri sebebiyle önem taşımakta olup, katalizörler, ilaç sanayi, optik materyaller, sensörler, enerji depolama-transmisyonu da dahil olduğu pek çok alanda uygulamaları mevcuttur. Bu materyallerin fonksiyonları ve kullanım alanları nanopartiküllerin (np) boyutuna ve bileşimine göre farklılık göstermektedir . Gümüş (Ag) np’leri ev aletlerinde, platin (Pt) np’leri endüstride ve biyomedikal uygulamalarda, altın (Au) np’ler sensör alanındaki çalışmalarda kullanılabilmektedir.

Platin çok fazla kırık olan ameliyatlarda, kaynamanın zor olduğu ya da kaynamanın uzun zaman alacağı bölgelerde kalıcı hasar olamaması için kullanılır. Platin vücutla reaksiyona girmemektedir. Ama temas halindedir. Çok nadir

görülmeye karşın platin zehirlenmesi gözlenebilir. Çünkü vücut onu yabancı madde gibi algılayıp ona göre davranabilir. Belli bir süreden fazla vücutta tutulursa bu tarz bir vaka gözlemlenebilir.

Ayrıca Platin, bileşiklerinden olan cisplatin, karboplatin ve okzalipatin DNA'nın yapısına girebilme özelliğinden dolayı kanser tedavisinde kemoterapi sırasında, amalgam diş dolgularında, aşılar ve saç boyalarında kullanılmaktadır. Ancak böbreklerde geri dönüşümü olmayan tahribata yol açabilmektedir.

### **Nanoküreler**

İlaç salan sistemlerdeki en büyük problemlerden biri, ilacın istenilen yere ulaşmamasıdır. Nottingham Üniversitesi'nden Bob Davis ise, nanoküreler içine hapsettiği ilaçları hedef dokuya ulaştırabilen ilk isim. Daha önceden damara enjekte edildiğinde karaciğer ya da dalakta parçalanan, deri altına enjekte edildiğinde ise makrofajlar tarafından inhibe edilen (engellenen) nanoküreler, Davis'in geliştirdiği yöntemle hedef dokuya ulaşabilmeyi başarmıştır. Bu yöntemde Davis, küreleri biyoyumlu polimerlerle kaplayarak bağışıklık sisteminden sakınarak hedef hücreye ulaşımını sağlamıştır. [1]

### **Biyo teknolojik İlaçlar**

İlaçlarının etkisini arttırmak amacı ile, ilaçlara bağlanabilen ya da onları kaplayabilecek nanomateryaller üzerinde yapılan araştırmalar yapılmaktadır. İlaçlar diğer tüm kimyasal maddeler gibi emilirler, kana karışırlar, kanda yayılırlar, hedef doku ya da bölgelere ulaşarak etki eder ve sonra yıkılarak böbrek-karaciğer üzerinden atılırlar. Bazı ilaçların belli nanomateryallerle kaplanarak, hedefi daha iyi saptama, hedef dokuda daha uzun kalmasının sağlanması amaçlanmaktadır. Bugün için bunlar günlük pratik kullanımımıza girmiştir ve lipozomlar buna örnektir. Lipozomlar, dışı fosfolipid denilen yağ tabakası ile kaplanmış, içinde ilaç ya da genetik materyal bulunan küresel yapılardır. Hepimizdeki ve canlılardaki hücrelerin dış zarı lipidden oluştuğundan, lipozomlarla hücre kolaylıkla birleşir. Bu durumda lipozomun içindeki madde hücrenin içine geçer. Bu şekilde hücre içine ilaç, genetik madde ya da virüs enfeksiyonları gönderilebilmektedir. Gelecekte ise DNA'yı tamir edecek nano makineler hücre içinde lipozom kapsülleri ile gönderilebilir olacaktır.

### **Nano-diyagnoz**

Nanoteknolojinin tıp dünyasına getirdiği önemli yeniliklerden biri de, kanser oluşumu, yeni damarlanma ve benzeri pek çok patolojinin erken tanısı, evrelendirilmesi ve takibinde kullanılan girişimsel işlemlerin yerine önerdiği görüntüleme yöntemleridir.

### **Nano robotlar**

Sciencedaily sitesinde 31.08.2009 tarihinde yayınlanan bir habere göre, Washington Üniversitesi St. Louis Tıp Okulu'ndaki araştırmacılar nano arıları kullanarak tümörlü hücrelerin ölümünü sağlamışlar. Araştırmacılar, arıların avını zehirlenmesi mekanizmasını farelerdeki tümör hücrelerini yok etmek için tekrar programlamışlar. Bunun için araştırmacılar arı zehirindeki nanoboyutta olan ve zehrin ana bileşeni olan kürelere odaklanmışlar. Arılar tarafından tümöre karşı salınan nanoarılar yani melittin toksininin farelerde diğer dokuları toksinin yıkıcı etkisinden koruduğu gözlenmiş. Bu da farelerde tümör büyümesini durdurmuş ve küçültmüş. Yapılan bu araştırma çevrimiçi olarak yayınlanan "Journal of Clinical Investigation" dergisinde de rapor edilmiştir.

### **Biyometik (Biyotaklit)**

Biyotaklit (biyomimet), İnsanların doğayı taklit ederek yaptıkları alet, sistem ve mekanizmaların tümünü ifade eden bir bilim dalıdır.

### **Filin Hortumu örnek alınarak yapılan Robot Kol**

Bilim adamlarının robot kol tasarlarırken en çok zorlandıkları konulardan biri kolun hareket özelliğidir. Bir robot kolun işe yarayabilmesi için, o işin gerektirdiği tüm hareketleri yapabilmesi şarttır. Allah doğadaki canlıların uzuvlarını, ihtiyaçlarını tam karşılayabilecek hareket kapasitesine sahip olarak yaratmıştır. Bu konudaki en çarpıcı örneklerden biri de fillerin hortumudur.

Filin 50 bin adet kasla çevrili hortumu mükemmel yapısı sayesinde çok fazla incelik ve hassasiyet gerektiren işlemleri yapabilme kabiliyetine de sahiptir. Ayrıca hayvan hortumunu istediği her yöne doğru hareket ettirebilir. ABD'deki Rice Üniversitesi'nde yapılan robot kol, fil hortumunun ne kadar üstün bir tasarım olduğunu daha net ortaya çıkarmıştır. Fil hortumunda iskelet benzeri tek bir yapı bulunmaz. Bu özellik, hortuma büyük bir hareketlilik imkanı ve hafiflik sağlar. Buna karşın robotik kolun bir omurgası vardır. Fil hortumu her yere yönelebilecek kadar büyük bir hareket serbestliğine sahiptir. Oysa robotik kol sahip olduğu 16 bağlantı sayesinde sadece 32 çeşit hareket yapabilir. Tüm bunlar göstermektedir ki, filin hortumu, her özelliğiyle Allah'ın yaratma sanatındaki kusursuzluğu gözler önüne seren özel bir yapıdır.

Son zamanlarda nanotıp biliminin önde gelenlerinden Robert Freitas tarafından yapay kan üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır. Yapay kan hücreleri henüz teorik olarak varlar ve 'respirosit' (respirocyte) olarak adlandırılmakta. Respirositler 1 mikron çapında köşegen yapılardır ve normal kırmızı kan hücrelerinden 236 kez daha fazla oksijeni dokulara taşırlar. Yapı olarak 18 milyar atomdan oluşurlar. Atomların dizilimi elmadaki gibi tabakalıdır ve atomlar da genelde karbon atomlarıdır. Bu yapısı ile 9 milyar oksijen ve karbondioksit molekülü taşır. %50'si respirositten oluşan 5 ml sıvının taşıyacağı oksijen ve karbondioksit, bedenimizde bulunan 5500 ml kanın taşıdığı ile eşdeğerdir. Kanımızın bir litresini eğer respirositlerle değiştirecek olsak, taşıdığı oksijenin çok fazla olması nedeni ile, nefes alıp veremeden yaklaşık 4 saat soluğumuzu tutabiliriz. Respirositler normal kan ihtiyacının olduğu her durumda kullanılabilceği gibi, uzun dönemli insan dondurma durumlarında (cryonics) damar içi sıvıyı -kanı- değiştirmede de kullanılabilirler.

Nanoteknolojinin tedavi amaçlı kullanılmasının dışında insana ek özellikler kazandırabileceği de öngörülmüyor. Böylece insan yeteneklerinin geliştirilebileceği savunuluyor. Örneğin, vücuttaki tamir mekanizmalarının geliştirilmesi ve iskelet sisteminin sağlamlaştırılması sayesinde insan ömrünün yüzlerce yıl uzatılabilmesi, nano yapılarla insan hafızasının artırılması, insanın görme duyusunun kızıl ötesi ve gece görüşüne sahip olabilecek kadar genişletilebileceği söyleniyor.

## KAYNAKLAR

Tıpta nanoteknoloji kullanımı, Available at: <https://www.biyologlar.com/tipta-nanoteknoloji-kullanimi> [Erişim 18.06.2019]

Metin Gök Z., Özdemir L., 2015, Nanoteknolojinin sağlık alanında kullanımı ve hemşirenin sorumlulukları, Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 18:3

## Offroad'un orman yolları ve ormanlık alanlardaki etkisi (Belgrad ormanı örneği)

Tolga Öztürk\*

\*İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: tozturk@istanbul.edu.tr

### Özet

Belgrad ormanı İstanbul ilinin kuzey kesiminde yer alan, yaklaşık 5000 ha'lık bir alana sahip koruma ormanıdır. Bu ormanlık alan 16 milyondan fazla bir nüfusa sahip böyle bir metropolün tüm sosyal aktivitelerinin gerçekleştirildiği bir alandır. Belgrad ormanı içerisinde ham orman yolu, stabilize ve asfalt orman yolları şeklinde oldukça yoğun bir yol ağı bulunmaktadır. Bu durum, ormanlık alanlara insanların rahatlıkla ulaşmasını sağlaması yanında ormanlık alana farklı zararların verilmesine neden olmaktadır. Offroad olarak isimlendirilen aktiviteler 4x4 çeker araçlarla yol dışında arazi üzerinde yapılan sürüş ve yarışmalardır. Belgrad ormanı içerisinde bu özelliğe sahip araçlar ile orman alanı içerisinde, üretim amaçlı kullanılan sürütme yol ve şeritleri üzerinde ve ormanın her yerine girerek offroad yapılmaktadır. Offroad için özellikle yağışlı veya yağış sonrası dönemlerde zor arazi koşulları tercih edildiğinden ormanlık alanlar içerisinde sürücüler araçları ile ormana, toprağa ve çevredeki ağaçlara zarar vermektedir. Özellikle, orman toprağının sıkışması nedeniyle ilerleyen zamanlarda böyle alanlarda yüzeysel erozyon riski oldukça artmaktadır. Bu yollar daha sonra ormancılık çalışmaları için veya sosyal aktiviteler için kullanılamamaktadır. Bu bölgelerde ayrıca yangın riski olduğundan bu yolların acil durumlarda da kullanımı oldukça zor olmaktadır. Bu çalışmada Belgrad ormanı içerisinde yapılan offroad aktivitelerinin sonuçları anlatılacak ve bu aktivitelerin çevresel zararlarından bahsedilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Offroad, orman yolu, toprak zararları.

### Effects on forest roads and forest areas of offroad (Case of study Belgrad forest)

#### Abstract

The Belgrade forest is a conservation forest in the northern part of Istanbul, with an area of approximately 5000 ha. This forest area is an area where all social activities of such a metropolis have a population of more than 16 million. Within the Belgrade forest there is a dense road network in the form of raw forest roads, stabilized and asphalt forest roads. This situation enables people to reach the forests easily and causes different damages to the forests. The so-called offroad activities are driving and competitions on terrain with 4x4 drive vehicles. In the Belgrade forest, vehicles with this feature are used in the forest area, on the road and lanes used for production purposes, and offroads are made by entering all over the forest. Offroad is preferred especially in rainy or post-rainy periods because of difficult terrain conditions in forest areas with the drivers of vehicles, forest, soil and surrounding trees are damaged. In particular, the risk of surface erosion in such areas increases considerably due to the compaction of forest soils. These roads cannot be used later for forestry or social activities. In these areas, there is also a risk of fire and these roads are very difficult to use in emergencies. In this study, the results of offroad activities carried out in Belgrade forest will be explained and environmental damages of these activities will be explained.

**Keywords:** Offroad, forest road, soil damage.

### GİRİŞ

Offroad (Yol dışı) kelimesinin çıkışı, normal araçların ulaşamadığı yerlere ulaşma isteğinin doğurduğu bir sonuçtur. Günümüzde doğa ve motor sporları kategorisinde gösterilen offroad kara araçlarının araziye uygun hale getirilmesi ve gidilemeyen yerlere gidebilme isteği yanı sıra hobi amaçlı bir spor haline gelmiş ve giderek yaygınlaşmıştır (URL-1) Offroad doğayla mücadelenin yanında grup çalışması ve insanların hem birbiriyle yarışma hem de birlikte çalışmasını sağlayan bir aktivitedir. Offroad için güçlendirilmiş ve modifiye edilmiş 4X4 araçlarla yapılan zorlu bir mücadeledir. Offroad için ülkemizde çeşitli kulüpler bulunmakta ve ülke genelinde

offroad yapılacak alanlar belirlenmiştir. İstanbul ili için Kemberburgaz offroad parkı, Beyoff Riva parkuru, Lopez offroad parkuru, Riva offroad parkuru, Kayışdağı offroad parkuru, Demirciköy offroad parkuru sayılabilir (URL-2).

Belgrad ormanı İstanbul ili için oldukça önemli olan bir orman arazisidir. Yüzyıllardır İstanbul ilinin akciğerleri görevi yanında su koruma havzası olduğu için İstanbul'un su ihtiyacının bir bölümünü de karşılamaktadır. Özellikle son yıllarda Belgrad ormanından halkın yararlanması oldukça artmıştır. Belgrad ormanı içerisinde Bentler, Geyik Üretim Çiftliği, Mesire alanları, Orman deposu, Su Bentleri, Su koruma alanları gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Özellikle yaz aylarında insanların yoğun bir kullanım talebini karşılamaktadır. Belgrad ormanı aynı zamanda ormanın korunması için gerekli silvikültürel müdahaleler ile odun üretimi de gerçekleştirilen bir alandır. Marmara bölgesinde yer almasından dolayı özellikle yaz aylarında yangın riski taşıyan ve yoğun kullanımından dolayı yangın riskine karşı açık bir bölgedir. Belgrad ormanı içerisinde fauna ve flora zenginliği de oldukça fazla olup, ormanlık alan kuş göçlerinin de merkezinde yer alır.

Bu çalışmada Belgrad ormanı içerisinde izinsiz olarak offroad yapan aktivistlerin meydana getirdikleri zararlar incelenecek ve çalışmanın ışığında çeşitli öneriler ortaya konacaktır.

## MATERYAL VE METOD

Belgrad Ormanı, Marmara Bölgesi'nin olduğu kadar, ülkemizin de önemli yerleşim odağı olan İstanbul'un kuzeyindeki eski orman kuşağı üzerinde bulunmaktadır. Belgrad Ormanı coğrafi yönden; Trakya'nın kuzeydoğusunda, Karadeniz ile İstanbul Boğazı arasında, Istranca Dağları'nın Karadeniz'e uzanan kısımlarının güney bakışında bulunmaktadır. Orman, Karadeniz'e kuzey sınırı ile 4-5 km, İstanbul Boğazı'na 3-4 km yaklaşmaktadır.

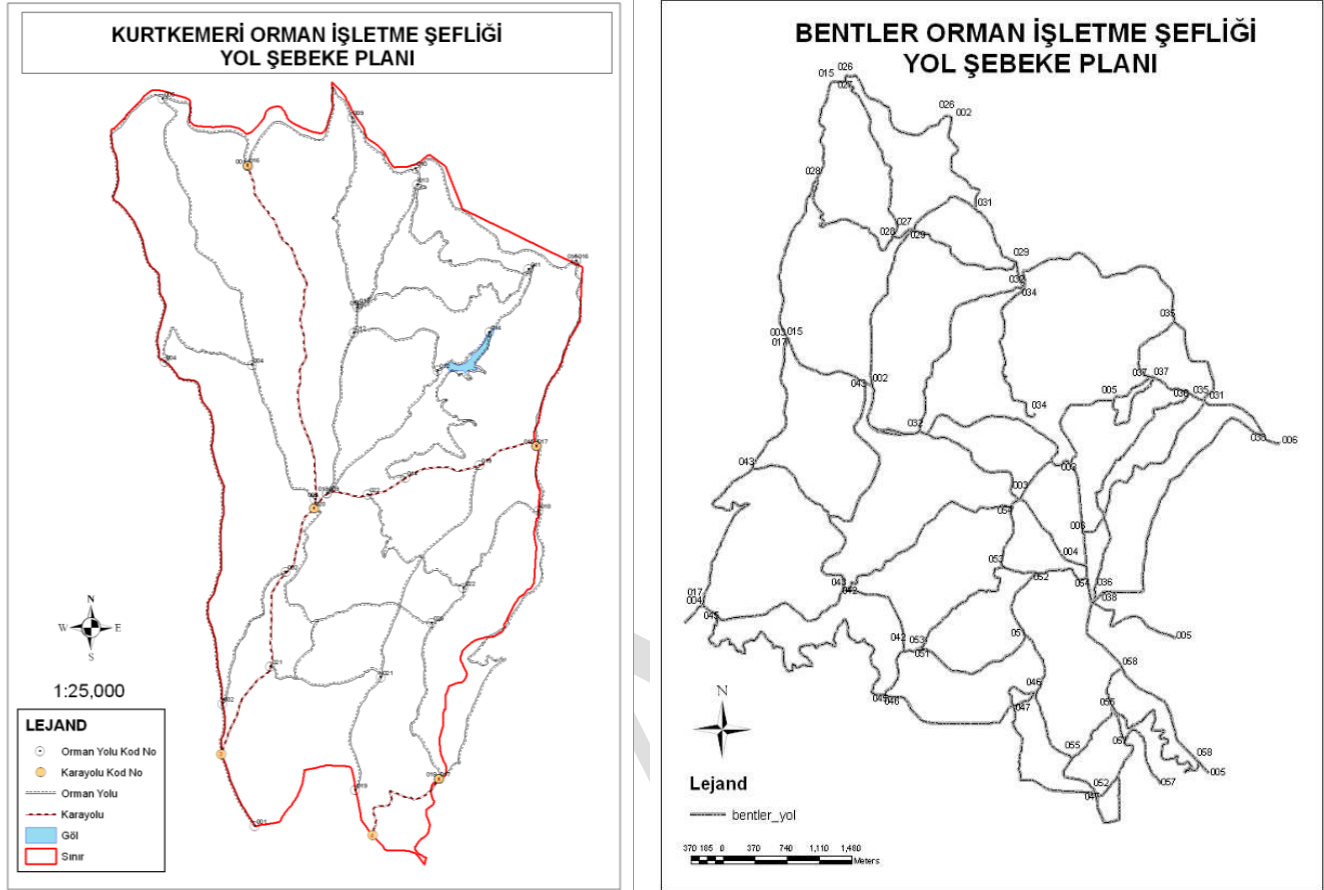
Mevcut Amenajman Planına göre alan, kuzeyde Virankule ve Arapdere Serilerine ilişkin ormanlar; doğuda yine Virankule Serisinin bir bölümü, Bahçeköy yerleşimi ve Bilezikçi Çiftliği Özel Ormanı; güneyde Fatih Ormanı, Azizpaşa Ormanı ve Kemberburgaz yerleşimi; batıda ise Arapdere Serisi baltalıkları ve Ağaçalı - Kemberburgaz sırt yolu ile sınırlandırılmıştır. Belgrad ormanı Greenwich'e göre 28° 00'55" – 29° 00'55" doğu boylamları ile Ekvatora göre 41° 09'44" – 41° 14'40" kuzey enlemleri arasında yer almaktadır. Plan ünitesi, mülki bakımdan İstanbul ili, Eyüp ve Sarıyer ilçelerinin mülki sınırları içerisinde kalmaktadır (Anonim, 2007). Bahçeköy orman İşletmesi ormanları (Belgrad Ormanı) toplam büyüklüğü, orman alanı, açıklıklar ve Bent alanları dahil 5441.71 ha'dır (Şekil 1).



Şekil 1. Belgrad ormanı alanının topografik harita görüntüsü

Belgrad ormanın idaresi İstanbul Orman Bölge Müdürlüğü, Bahçeköy Orman İşletme Müdürlüğü'ne bağlıdır. Bu işletme müdürlüğü iki ayrı işletme şefliğine bölünmüştür. Bunlar Kurtkemerli Orman İşletme Şefliği ve Bentler

Orman İşletme Şefliği'dir. Belgrad ormanı içerisinde uzun yıllardır kullanımdan dolayı oldukça fazla yol miktarı bulunmaktadır. Asfalt, stabilize ve toprak orman yolları alan içerisinde bir orman yolu ağı oluşturmaktadır. Bu yollar haricinde alan içerisinde odun üretim çalışmalarında kullanılan sürütme yol ve şeritleri de yer almaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Kurtkemerli ve Bentler Orman İşletme Şefliklerinin yol durumu (Öztürk ve ark., 2010)

## BULGULAR

Belgrad ormanı içerisinde offroad kullanımından sonra orman yollarında, traktör yollarında ve ormanlık alan içerisinde 4X4 araçların meydana getirdiği zararlar aşağıda sırasıyla gösterilmiştir.

**Orman yolları üzerinde meydana gelen zararlar;** özellikle toprak yol üzerinde büyük zararlar görülmektedir. Öncelikle toprak yolun üst yüzeyi lastik izleriyle deforme olmakta ve araçların geçiş dönemleri yağışlı havalarda veya yağışlı havalardan sonra olduğu için toprak yol üzerindeki deformasyonlar daha geniş ve büyük olmaktadır. Orman yolları kurduktan sonra 4X4 araçların yağışlı havalarda açtıkları izler ve çukurlar bir çığır şeklinde yol üzerinde kalmaktadır (Şekil 3). Yol yüzeyinde meydana gelen zararlar orman yolunu kullanan diğer araçların geçişine engel teşkil etmektedir. Yol yüzeyinde meydana gelen çığırlar daha sonraki yağışlı havalarda erozyona neden olmaktadır. Bu çığır ve çukurlar yol yüzeyinin ıslak kalmasına neden olmakta ve zemin yumuşamaktadır.



**Orman toprağında ve ormanlık alan içinde meydana gelen zararlar;** Orman toprağında meydana gelen zararlar toprağın sıkışması, deforme olması, karışması ve yıpranması şeklindedir. Bu durum, toprağın eğimli alanlarda erozyon ile taşınmasına neden olabilmektedir. Bu erozyon şekli çığırarak toprağı taşınması şeklindedir (Şekil 4). Toprak içerisinde yaşayan canlıların yuvalarının zarar görmesine ve canlıların ortamdaki uzaklaşmasına neden olmaktadır. Dere geçişlerinde meydana gelen zararlar, dere yatağının bozulmasına ve derelerde yaşayan faunanın zarar görmesine neden olmaktadır.



Şekil 4. Ormanlık alan içerisinde meydana gelen zararlar

**Traktör yolları ve şeritlerinde meydana gelen zararlar;** Odun üretimi için açılmış olan traktör yolları ve sürütme şeritleri offroad kullanıcıları için daha fazla tercih edilmektedir. Çünkü bu yollar sadece traktörlerin kullanımı için açılan toprak yollardır ve ormanlık alan içerisine kadar belirli mesafeler boyunca devam etmektedir. Offroad kullanıcıları bu yol ve şeritlerin gözden uzak olması nedeniyle de tercih etmektedirler. Odun üretimi yapılan alanlara giren offroad araçları bu yol ve şeritleri bozmakta ve bu yollardan taşınacak ürün için sorun oluşturmaktadır. Ürün taşınması için yapılacak uygulamalar yolun kapalı olması nedeniyle yapılamamaktadır. Bu durum açık işletme olan ormanlık alanlarımızda zaman kayıplarına ve ekonomik geri dönüşümlere neden olmaktadır. İşletmeler odun üretim periyodların önce bu yolların bakımlarını mutlaka yapmak zorunda kalmaktadırlar.





**Şekil 5.** Traktör yolları ve sürütme şeritlerinde meydana gelen zararlar

## SONUÇ

Günümüzde insanlar güncel çalışma ortamlarından çıkarak farklı uğraşlar yapmak, belirli konularda hobi sahibi olmak istemektedirler. Hobiler farklı farklı birçok konuda olup, insanlar için mutluluk kaynağı oluşturmaktadır. Offroad sporu da insanların hobi amaçlı yaptığı ve doğayla mücadele ettiği bir uğraştır. Doğayla zaman geçirmek ve mücadele adı altında uygun olmayan alanlarda bu tür zor aktiviteleri yapan kişilere huzur vermesi yanında çevresel zararları da beraberinde getirmektedir.

Belgrad ormanı gibi koruma ormanı olan ve yıl içinde binlerce insanın yararlandığı bir alanda yollar çok önemli bir fonksiyona sahiptir. Belgrad ormanının su koruma havzası, bentler, geyik üretim çiftliği ve çok sayıda mesire yerine ev sahipliği yapmaktadır. Belgrad ormanı yangın riskinin de olduğu önemli bir merkezdir. Belgrad ormanında bilinçsizce ve izinsiz yapılan offroad aktiviteleri orman toprağına, doğal hayata çok zarar vermektedir. Orman toprağında ağır 4X4 araçların meydana getirdiği zararlar toprağın sıkışmasına ve toprağın yarılmasına neden olmaktadır. Bu durum yağışlı dönemlerde toprak erozyonuna neden olmaktadır. Yaban hayatında ormanlık alan içerisindeki böcekten kemirgenlere kadar bütün hayvanlar bu araçların geçişinden etkilenmektedir. Aynı zamanda, ormanlık alan içerisinde bulunan ve offroad kullanıcılarının özellikle tercih ettiği sürütme yol ve şeritleri de oldukça deformasyona uğramakta ve bu yollar geçişe kapanabilmektedir. Offroad araçlarının bir diğer çevre zararı da bu araçların yağ, egzoz gibi atıklarının orman toprağına verdiği zararlardır. Özellikle orman yollarının ve diğer traktör yollarının her yıl düzenli bakımlarının yapılması da ekonomik olarak işletme müdürlüğüne ilave yük getirmektedir.

Bu çalışmanın ışığında çeşitli öneriler aşağıda sıralanmıştır;

- Offroad aktiviteleri İstanbul ili içinde ayrılan özel parkurlarda yapılmalıdır.
- İzinsiz olarak yapılan bu aktivitelerin önlenmesi için çeşitli yaptırımların ve koruma tedbirlerinin alınması gerekir.
- Belgrad ormanının genel durumu ve İstanbul ili için önemi açısından halk bilgilendirilmeli ve doğal hayatı koruma açısından uygun aktiviteler yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

Anaonim 2007. Bentler ve Kurtkemerli Amenajman Planları.

Öztürk T, İnan M, Akgül M, Bilici E 2010. Orman yollarında drenaj yapılarının boyutlandırılması ve konumlandırılmasında coğrafi bilgi sistemlerinin kullanılması. İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: Yadop – 4181, İstanbul.

URL-1: [www.damalibayrak.com](http://www.damalibayrak.com)

URL-2: [www.neoldu.com/service/amp/](http://www.neoldu.com/service/amp/)

DRAFT

## Dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) Bileşiminin Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI<sup>1\*</sup>, Neslihan ŞAHİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Sivas, Türkiye

[\\*wserap@yahoo.com](mailto:wserap@yahoo.com)

### Özet

Bu çalışmada, dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiği sentezlenerek, insan meme kanseri (MCF-7), insan glioblastoma (U-87), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan servikal adenokarsinom (HeLa) hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca aynı bileşik sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerine de uygulanarak kanserli ve sağlıklı hücreler arasında seçici davranıp davranmadığı da araştırılmıştır. Bileşiğin hücre canlılığı üzerine etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara  $1 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde ekilerek, %10 FBS ve %1 penisilin içeren DMEM ve RPMI-1640 besi ortamında büyütülmüştür. Hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat beklenilmiş farklı derişimdeki çözeltileriyle (1–100  $\mu$ M) 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Bileşiğin IC<sub>50</sub> (%50 ölüm oranına neden olan derişim değerleri) değerleri GraphPad Prism 7 kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre; bileşik uygulanan hücrelerde, kontrollere göre canlı hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Canlı hücre sayısındaki azalmanın, derişime ve hücre türüne bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Bileşiğin HeLa kanser hücrelerine karşı diğer kanser hücrelerine göre daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Sitotoksik aktivite, Paladyum, MTT, Benzimidazol, N-Heterosiklik karbon

### Investigation of the Cytotoxic Effect of Dichloro[1-(2-methyl-2-propenyl)-3-benzylbenzimidazole-2-ylidene]pyridinepalladium(II)

#### Abstract

In this work, it has been synthesized and investigated that the cytotoxic effects of the dichloro [1-(2-methyl-2-propenyl)-3-benzylbenzimidazole-2-ylidene]pyridinepalladium(II) on the human breast cancer cell (MCF-7), human glioblastoma (U-87), human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa), human colorectal adenocarcinoma (HT-29), human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells. The same compound was also administered to healthy human lung fibroblast (WI-38) cells to determine whether they act selectively between cancer and healthy cells. The effect of the compound on cell viability was determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method. Cells were grown in DMEM and RPMI-1640 media containing 10% FBS and 1% penicillin, seeded in 96-well plates at  $1 \times 10^5$  cells / mL and allowed to grow 24 h prior to dosing different concentrations (1-100  $\mu$ M) of the compound for 48 hours. The IC<sub>50</sub> (concentration values resulting in 50% mortality) values of the compound were calculated using GraphPad Prism 7. According to the results, it has been seen cancer cells treated with the compound have a lower number of viable cells compared with the control. It has been seen that the decrease in living cells was determined the concentration and cell type-dependent. It has been observed that the compound has a higher cytotoxic effect against HeLa cancer cells than other cancer cells.

**Keywords:** Cytotoxic activity, Palladium, MTT, Benzimidazole, N-heterocyclic carbene

### GİRİŞ

Kanser son yıllarda önlenemez bir hızla artış göstererek, ülkemizde ve dünyada en büyük sağlık problemi haline gelmiştir. 2018 yılında tüm dünyada yeni kanser vaka sayısının 18.1 milyon olacağı ve bunlardan 9.6 milyon vakanın ölümlerle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir (Bray ve ark., 2018). Kanser bulaşıcı bir hastalık olmayıp, birçok kanser türünün oluşumunda çevresel faktörlerin önemli rollerinin yanı sıra, genetik faktörlerin de rol

aldıkları bilinmektedir. Kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarının fazla olmasının yanısıra tedavisinin pahalı olması insanlara sosyoekonomik sorunlar da yaşatmaktadır.

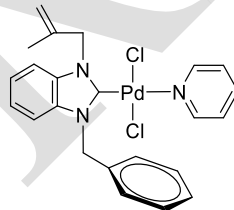
İlerleyen teknoloji sayesinde günümüzde kanser tedavisinde standart olarak kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin yanısıra aşılarda, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş ve gen terapileri de kullanılmaya başlanmıştır (Baykara, 2016). Araştırmacılar, bu hastalığın tedavisi için yeni yöntemler bulmak, tabiatta doğal olarak var olan bitkisel tedavi edicileri keşfetmek veya yeni sentetik tedavi edici ilaçlar sentezlemek için çalışmalar yapmaktadırlar. 1944 yılında Wooley, benzimidazolün pürinlere benzer davranabileceğini bildirmiştir (Wooley, 1944). Bu çalışmadan sonra, benzimidazol türevlerinin, antihipertansif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antitümör, lipid modulatör ve antikoagulan gibi biyolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir (Al-Blewi ve ark., 2018; Hussain ve ark., 2018; Özil ve ark., 2018; Kaur ve ark., 2018; Khan ve ark., 2018; Mostafa ve ark., 2019; Vausselin ve ark., 2016). Cis-platin, Rosenberg ve arkadaşları tarafından bulunan ilk metal bazlı antikanser ilaç örneğidir (Rosenberg ve ark., 1965). Birçok kanser türünün tedavisinde cis-platin, nedaplatin, okzaliplatin, karboplatin ve lobaplatin gibi platin bileşikler antitümör terapi için kullanılmakla birlikte bu bileşiklerin saç dökülmesi, nörotoksisite, kusma, nefrotoksisite, ishal gibi bazı yan etkileri bulunmaktadır (Dasari ve Tchounwou, 2014; Ho ve ark., 2016; Mehmood, 2014;). Bu nedenle toksisitesi düşük yeni anti-kanser ilaç adayları bileşiklerin elde edilmesi sağlık açısından büyük önem taşımaktadır ve yeni ilaç adayları üzerine araştırmalar devam etmektedir. Bu amaçla rutenyum, gümüş, paladyum, titanyum, demir, kobalt gibi farklı metallere N-heterosiklik türevli bileşikler sentezlenmiş ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir [Deng ve ark., 2019; Gou ve ark., 2016; Lv ve ark., 2015; Mohamed ve ark., 2018].

Çalışmamızda, dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiği sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiğin sitotoksik etkisi, insan meme kanseri (MCF-7), insan glioblastoma (U-87), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan servikal adenokarsinom (HeLa) hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca bileşik sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücrelerine de uygulanarak, bileşiğin sağlıklı ve kanserli hücreler arasında seçici özelliğe sahip olup olmadığı da araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Bileşiğin sentezlenmesi

Dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiği literatüre göre sentezlenmiştir (Şahin, 2019). (Şekil 1).



Şekil 1. Dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiği

### Bileşiğin seyreltik çözeltilerinin hazırlanması

Bileşik DMSO'da çözülerek stok çözeltisi hazırlandı ve besi yeri ile seyreltilerek farklı derişimlerdeki örnekler hazırlandı.

### Sitotoksik Etkinin belirlenmesi; MTT ölçümü

Bileşiğin insan meme kanseri (MCF-7), insan glioblastoma (U-87), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan servikal adenokarsinom (HeLa) hücreleri ve sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi (Skehan ve ark., 1990). MCF-7, U-87, Ishikawa, HT-29, HeLa hücreleri 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomycin içeren DMEM besi yerinde, WI-38 hücreleri ise RPMI-1640 besi yerinde ve 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Üstel olarak büyüyen hücreler pasajlanarak 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat beklenildikten sonra bileşiğin farklı

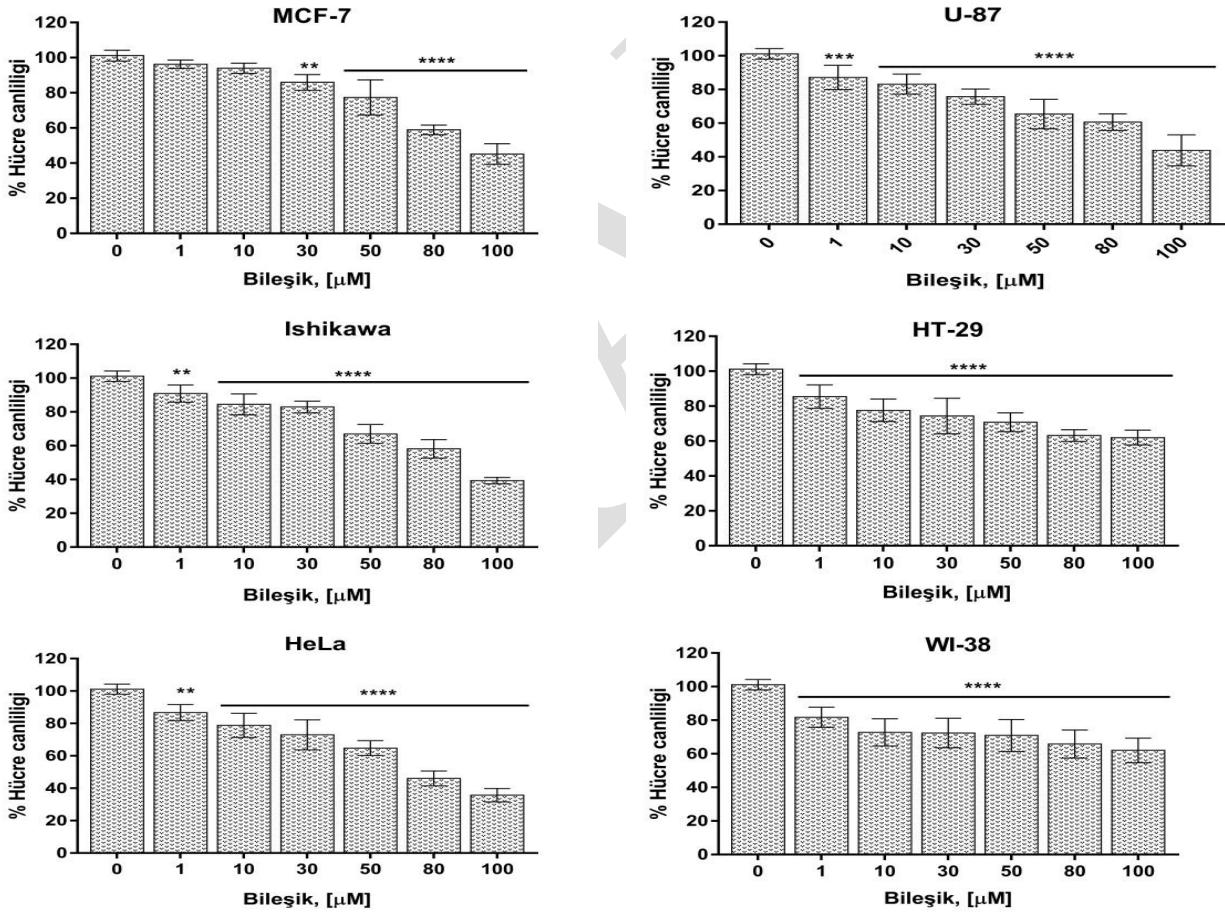
derişimleri (1–100 µM) uygulandı. Bileşik uygulamasından 48 saat sonra herbir kuyuya MTT eklendi ve 2 saat inkübatörde beklemeye bırakıldı. İki saatin sonunda plakalar inkübatörden alındı ve hücrelere zarar vermeden plaka içindeki besi yeri aspire edildi. Herbir kuyuya 100 µL DMSO eklendi ve plakalar 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerine inkübe edilerek absorbans değerleri Elisa cihazında 570 nm dalga boyunda okundu. Deneyler dokuz tekrarlı olarak yapıldı (n=9) ve GraphPad Prism7 kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri saptandı.

### İstatistiksel çalışmalar

Araştırma kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar dokuz tekrarlı yapıldı (n=9), sonuçlar standart sapmalarıyla (± SEM) birlikte verilmiştir. GraphPad Prism7 grafik ve istatistik programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak one-way analizi uygulanmış ve anlamlılık için \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001 seçilmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Bileşiğin insan MCF-7, U-87, Ishikawa, HT-29, HeLa kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkisi MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kullanılarak belirlenmiştir (Skehan ve ark., 1990). MTT, sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla kullanılan kolorimetrik yöntemlerden birisidir.



**Şekil 2.** Dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiğinin MCF-7, U-87, Ishikawa, HT-29, HeLa kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücreleri sitotoksik etkisi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar ±SEM olarak verilmiştir. (Kontrole göre anlamlılık; \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p < 0.0001)

Sarı renkli MTT tetrazolyum tuzu, canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenaz enzimi varlığında çözünmeyen mor renkli formazon yapıya dönüşmektedir. Yeni formazon yapı, farklı organik çözücüler yardımıyla çözünür hale getirilmektedir. Şekil 2’de; x eksen bileşiğin derişimlerini, y eksen ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Bileşiğin derişimindeki artışla paralel olarak canlı MCF-7, U-87, Ishikawa, HT-29, HeLa kanser

hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücre sayısında azalma yani sitotoksik etkide artış gözlenmiştir. Şekil 2'deki grafiklerden yararlanılarak, bileşiğin MCF-7, U-87, Ishikawa, HT-29, HeLa kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücrelerinin % 50'sini öldürdükleri derişim değeri (IC<sub>50</sub>) saptanmıştır (Tablo 1). IC<sub>50</sub> değeri; kanser hücrelerinin %50'sinin öldürülmesi için gerekli derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Bileşiğin hücrelere uygulanmasından 48 saat sonra tüm hücrelerin canlılıklarında anlamlı azalış gözlenmiştir. Ancak HeLa kanser hücre canlılıklarındaki azalma daha belirgin olup, bu hücre için IC<sub>50</sub> değeri 73.44 ± 0.05µM olarak bulunmuştur.

**Tablo 1.** Bileşiğin insan meme, glioblastom, endometrium, kolorektal, servikal kanser hücreleri ve insan sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri<sup>a</sup> 'nde 48 saat için IC<sub>50</sub> değeri (IC<sub>50</sub>, µM<sup>b</sup>)

Hücre hattı	IC <sub>50</sub> , (µM) <sup>b</sup>
MCF-7	95.11 ± 0.03
U-87	90.45 ± 0.04
Ishikawa	93.52 ± 0.03
HT-29	>100
HeLa	73.44 ± 0.05
WI-38 <sup>a</sup>	>100

<sup>a</sup> Sağlıklı hücre, <sup>b</sup> Bileşiğin uygulanmasından 48 saat sonra hücre canlılığı deneysel kısımda açıklanan MTT ölçümü ile yapıldı. Herbir IC<sub>50</sub> değeri birbirinden bağımsız yapılan 3 ayrı deneyin (n=9) sonucu ± SEM olarak verildi.

WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücre hattı ve HT-29 kanser hücre hattının IC<sub>50</sub> değeri >100 µM olarak bulunmuştur. MCF-7, U-87, Ishikawa kanser hücreleri için IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla; 95.11, 90.45 ve 93.52 µM olarak bulunmuştur. IC<sub>50</sub> değerinin düşük olması yüksek sitotoksik etkiye işaret etmektedir. Bu nedenle bileşik, HeLa kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksik etki gösterirken, WI-38 normal hücreler ile HT-29 kanser hücrelerine karşı düşük sitotoksik etkigöstermiştir. Ayrıca MCF-7, U-87, Ishikawa kanser hücreleri üzerine benzer sitotoksik etki göstermiştir. Bileşiğin sitotoksik etkisinin doza ve hücre hattı türüne göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca bileşiğin, WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücrelerine karşı HeLa kanser hücrelerine göre daha düşük sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bileşiğin, insan servikal kanser hücreleri (HeLa) ve WI-38 normal hücreler arasında yaklaşık 1.5 kat seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur.

## SONUÇ

Kanser, tüm dünyada ciddi oranlarda ölüme sebep olan hastalıkların başında gelmektedir. Kanserinin modern tedavisi birçok farklı ilaç içermesine rağmen, bu ilaçların yan etkileri nedeniyle yeni anti kanser ilaçların keşfine yönelik araştırmalar önem kazanmakta olup yeni anti kanser ilaçların geliştirilmesiyle ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Günümüzde inorganik ilaçlar, tıbbi tedavi edicilerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır ve son otuz yıldır Cis-platin bileşiği [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] ve analogları kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Cis-platin bileşiğinin suda çözünürlüğünün az olması, toksisitesinin olması gibi dezavantajları bilim adamlarını daha iyi tedavi ediciler ve daha az zararlı bileşikler bulmaya yönlendirmiştir. Benzimidazol yapısı ilaç keşfi ve tıbbi biyokimya da önemli bir yapıdır.

Bu çalışmada, dikloro[1-(2-metil-2-propenil)-3-benzilbenzimidazol-2-iliden]piridinpaladyum(II) bileşiği sentezlenerek, insan meme kanseri (MCF-7), insan glioblastoma (U-87), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan servikal adenokarsinom (HeLa) hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bileşiğinin sitotoksik etkisinin derişim ve hücre türüne göre değiştiği gözlenmiştir. Bileşiğin en yüksek sitotoksik etkisi HeLa kanser hücrelerinde gözlenmiş olup insan servikal kanser hücreleri (HeLa) için yaklaşık 1.5 kat seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Sitotoksik etki çalışmaları Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (SCÜTAM)'da yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Al-Blewi FF, Almeahmadi MA, Aouad MR, Bardaweel SK, Sahu PK, Messali M, Rezki N, El Ashry ESH 2018. Design, synthesis, ADME prediction and pharmacological evaluation of novel benzimidazole-1,2,3-triazole-sulfonamide hybrids as antimicrobial and antiproliferative agents. *Chem Cent J.* 12(1):110. doi: [10.1186/s13065-018-0479-1](https://doi.org/10.1186/s13065-018-0479-1).
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018. Global cancer statistics. *GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424. doi: [10.3322/caac.21492](https://doi.org/10.3322/caac.21492).
- Baykara O 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi.* 5(3):154-165.
- Dasari S, Tchounwou PB 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740:364-378.
- Deng J, Li T, Su G, Qin QP, Liu Y, Gou Y 2018. Co (III) complexes based on  $\alpha$ -N-heterocyclic thiosemicarbazone ligands: DNA binding, DNA cleavage, and topoisomerase I/II inhibitory activity studies. *J. Mol. Struct.* 1167: 33-43.
- Gou Y, Wang J, Chen S, Zhang Z, Zhang Y, Zhang W, Yang F 2016.  $\alpha$ - N- heterocyclic thiosemicarbazone Fe (III) complex: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. *Eur. J. Med.Chem.* 123: 354-364.
- Ho GY, Woodward N, Coward JIG 2016. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 102:37-46. doi: [10.1016/j.critrevonc.2016](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016).
- Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Khan AA, Shaikh PA, Khan RA 2018. Evaluation of Transition Metal Complexes of Benzimidazole-Derived Scaffold as Promising Anticancer Chemotherapeutics. *Molecules.* 23(5). doi: [10.3390/molecules23051232](https://doi.org/10.3390/molecules23051232).
- Kaur G, Silakari O 2018. Benzimidazole scaffold based hybrid molecules for various inflammatory targets: Synthesis and evaluation. *Bioorg Chem.* 80:24-35. doi: [10.1016/j.bioorg.2018.05.014](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.05.014).
- Khan MT, Razi MT, Jan SU, Mukhtiar M, Gul R, IzharUllah -, Hussain A, Hashmi AM, Ahmad MT, Shahwani NA, Rabbani I 2018. Synthesis, characterization and antihypertensive activity of 2-phenyl substituted benzimidazoles. *Pak J Pharm Sci.* 31(3(Supplementary)):1067-1074.
- Kuo HL, Lien JC, Chung CH, Chang CH, Lo SC, Tsai IC, Peng HC, Kuo SC, Huang TF 2010. NP-184[2-(5-methyl-2-furyl) benzimidazole], a novel orally active antithrombotic agent with dual antiplatelet and anticoagulant activities. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 381(6):495-505. doi: [10.1007/s00210-010-0505-x](https://doi.org/10.1007/s00210-010-0505-x).
- Lv G, Guo L, Qiu L, Yang H, Wang T, Liu H, Lin J 2015. Lipophilicity-dependent ruthenium N-heterocyclic carbene complexes as potential anticancer agents. *Dalton Trans.,* 44(16): 7324-7331.
- Mehmood RK 2014. Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Onco Rev.* 8(2):256. doi: [10.4081/oncol.2014.256](https://doi.org/10.4081/oncol.2014.256).
- Mohamed HA, Khuphe M, Boardman SJ, Shepherd S, Phillips RM, Thornton PD, Willans CE 2018. Polymer encapsulation of anticancer silver-N-heterocyclic carbene complexes. *RSC advances,* 8(19): 10474-10477.
- Mostafa AS, Gomaa RM, Elmorsy MA 2019. Design and synthesis of 2-phenyl benzimidazole derivatives as VEGFR-2 inhibitors with anti-breast cancer activity. *Chem Biol Drug Des.* 93(4):454-463. doi: [10.1111/cbdd.13433](https://doi.org/10.1111/cbdd.13433). Epub 2018 Nov 28.
- Özil M, Parlak C, Baltas N 2018. A simple and efficient synthesis of benzimidazoles containing piperazine or morpholine skeleton at C-6 position as glucosidase inhibitors with antioxidant activity. *Bioorg Chem.* 76:468-477. doi: [10.1016/j.bioorg.2017.12.019](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.019).
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 205(4972):698-699.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82:1107-12.
- Şahin N 2019. PEPPSI-type 2-methyl-2-propenyl-functionalized N-heterocyclic carbene-palladium complexes: Synthesis, structural characterization and catalytic activity on Suzuki-Miyaura reaction. *J. Mol. Struct.,* 1177: 193-198.
- Vausselin T, Séron K, Lavie M, Mesalam AA, Lemasson M, Belouzard S, Fénéant L, Danneels A, Rouillé Y, Cocquerel L, Foquet L, Rosenberg AR, Wychowski C, Meuleman P, Melnyk P, Dubuisson J 2016.

Identification of a New Benzimidazole Derivative as an Antiviral against Hepatitis C Virus. *J Virol.* 90(19):8422-34. doi: [10.1128/JVI.00404-16](https://doi.org/10.1128/JVI.00404-16).  
Woolley DW 1994. Some Biological Effects Produced By Benzimidazole And Their Reversal By Purines. *J Biol Chem.* 152:225-232.

DRAFT



## Dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum(II) Kompleksinin Antikanser Aktivitesi

Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI<sup>1\*</sup>, Neslihan ŞAHİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup> Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, Sivas, Türkiye

[\\*wserap@yahoo.com](mailto:wserap@yahoo.com)

### Özet

Bu çalışmada, dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum(II) kompleksinin sentezi ve antikanser aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Kompleksin insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve normal insan akciğer fibroblast (WI-38) hücreleri üzerine antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Hücreler, 96 oyuklu plakalara  $1 \times 10^5$  hücre/mL ekilerek, kompleksin farklı derişimleri ile (1-100  $\mu$ M) 48 saat boyunca muamele edilmiştir. MTT analiz sonuçları, kompleksin derişime bağılı olarak antikanser aktivitesinin arttığını göstermiştir. Kompleksin HeLa ve K562 kanser hücrelerinde 100  $\mu$ M'dan daha küçük  $IC_{50}$  değerine sahip olduğu bulunmuştur. Kompleksin antikanser aktivitesinin hücre hattı türüne ve derişime bağılı olarak değıştiğı gözlenmiştir. Ayrıca, kompleksin WI-38 normal insan fibroblast hücrelerinde, HeLa ve K 562 insan kanser hücrelerine göre daha düşük antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser aktivite, Rutenyum, MTT, *p*-Simen

### Anticancer Activity of Dichloro-[1-(2-metallyl)benzimidazole]-(*p*-cymene)ruthenium(II) Complex

#### Abstract

In this study, it was aimed to investigate the synthesis and anticancer activity of dichloro-[1-(2-metallyl)benzimidazole]-(*p*-cymene)ruthenium(II) complex. The anticancer activity of the complex was investigated on human cervical adenocarcinoma (HeLa), human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa), human glioblastoma (U-87), human colorectal adenocarcinoma (HT-29), human chronic myeloid leukemia (K562) cells and normal human lung fibroblast (WI-38) cells using MTT measurement at 48 h. The cells were plated at a cell density of  $1 \times 10^5$  cells/mL in 96-well plates and treated by different concentrations (1-100  $\mu$ M) of complex during 48 hours. The results of MTT analysis showed that the anticancer activity of the complex increased due to concentration. The complex has been found to have an  $IC_{50}$  value of less than 100  $\mu$ M against HeLa and K-562 cancer cells. Anticancer activity of the complex was observed to vary depending on cell line type and concentration. Furthermore, it has been observed that the complex had lower anticancer activity in WI-38 normal human fibroblast cells than HeLa and K 562 human cancer cells

**Keywords:** Anticancer activity, Ruthenium, MTT, *p*-Cymene

## GİRİŞ

Benzimidazol türevleri, doğal olarak birçok üründe ve çeşitli ilaçlarda bulunan ilginç heterosiklik bileşiklerdir. Ayrıca modern ilaç keşiflerinde önemli bir farmakofor olup, antitümör, antifungal, anti-enflamatuar gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere de sahiptirler (Ashok ve ark., 2018; Bistrovic ve ark., 2018; Ganie ve ark., 2018; Kenchappa ve ark., 2016; Khafali ve ark., 2018; Sharma ve ark., 2017; Vausselin ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2015). B12 vitamini veya metaloproteinler gibi çeşitli biyolojik aktif bileşikler, benzimidazolün geçiş metali kompleksleridir. Bu nedenle, benzimidazol türevli geçiş metali kompleksleri, bazı önemli biyolojik moleküllerin model yapısını oluşturmaktadırlar. Organometalik bileşiklerin spesifik bir grubunu oluşturan rutenyum kompleksleri de, biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi odağı haline gelmişlerdir (Biancalana ve ark., 2017; Chen ve ark., 2018; Thota ve ark., 2018).

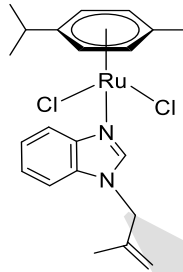
Kanser tüm Dünya'da ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölümle sonuçlanan ikinci sıradaki hastalıktır (Web, 2019). 2018 yılında tüm dünyada 18.1 milyon yeni kanser vakasının olacağı öngörülmektedir (Bray ve ark., 2018). Kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarının fazla olmasının yanısıra tedavisinin pahalı olması insanlara sosyoekonomik sorunlar da yaşatmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisi için yeni anti-kanser ilaç adayları terapötiklerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara her zaman ilgi vardır.

Çalışmamızda, dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum (II) kompleksi sentezlenerek, insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve normal insan akciğer fibroblast (WI-38) hücreleri üzerine antikanser aktivitesi araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kompleksin sentezlenmesi

Dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum(II) kompleksi literatüre göre sentezlenmiştir (Şahin ve ark., 2019). (Şekil 1).



Şekil 1. Dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum(II) kompleksi

### Kompleksin seyreltik çözeltilerinin hazırlanması

Kompleks DMSO'da çözülerek stok çözeltisi hazırlandı ve besi yeri ile seyreltilerek farklı derişimlerdeki örnekler hazırlandı.

### Antikanser aktivite belirlenmesi; MTT ölçümü

Kompleksin insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve sağlıklı insan akciğer fibroblast (WI-38) hücreleri üzerine antikanser aktivitesi MTT testi ile belirlendi (Skehan ve ark., 1990). HeLa, Ishikawa, U-87, HT-29, K562 hücreleri 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomycin içeren DMEM besi yerinde, WI-38 hücreleri ise RPMI-1640 besi yerinde ve % 95 nem, 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Üstel olarak büyüyen hücreler pasajlanarak 1x10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde 96 kuyuku plakalarda ekilerek, bir gece boyunca inkübatörde bekletildi. Ertesi gün hücrelere farklı derişimlerde kompleks (1–100 µM) uygulandı. 48 saat sonra MTT ölçümü yapılarak kompleksin antikanser aktivitesi belirlendi. Kompleksin herbir hücre hattı için IC<sub>50</sub> değeri (kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılık oranını% 50 azaltan kompleks derişimi olarak tanımlanmıştır), GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak hesaplandı.

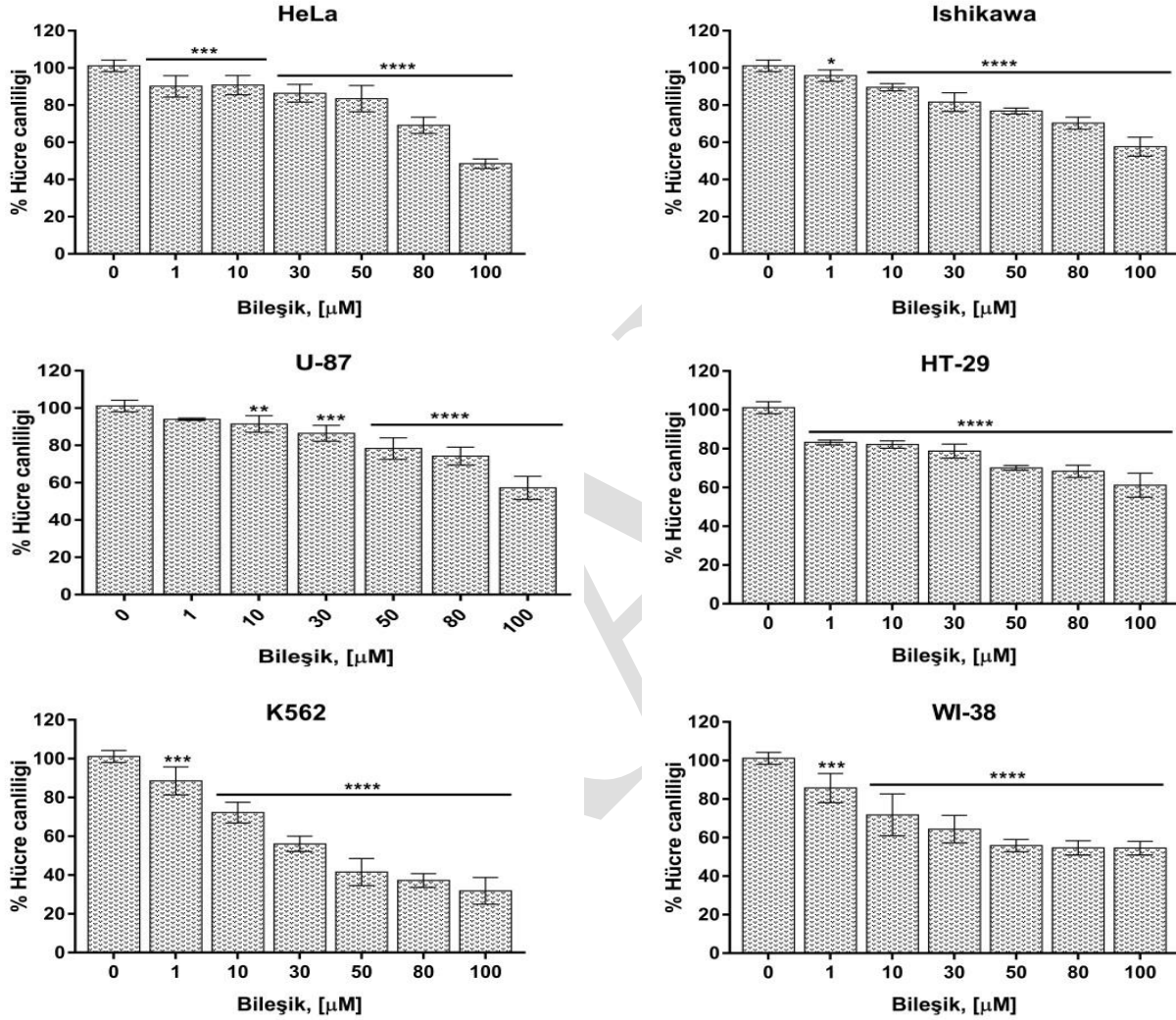
### İstatistiksel çalışmalar

Araştırma kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar dokuz tekrarlı yapıldı (n=9), sonuçlar standart sapmalarıyla (± SEM) birlikte verilmiştir. GraphPad Prism7 grafik ve istatistik programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak one-way analizi uygulanmış ve anlamlılık için \*p <0.05, \*\*p < 0.005, \*\*\*p < 0.0005, \*\*\*\*p <0.0001 seçilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Kompleksin insan HeLa, Ishikawa, U-87, HT-29 ve K562 insan kanser hücreleri ve WI-38 sağlıklı insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antikanser aktivitesi MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) kullanılarak belirlenmiştir. MTT, sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesi amacıyla

en sık kullanılan kolorimetrik yöntemler arasında yer almaktadır. MTT tetrazolium tuzunun sulu çözeltisi sarımtırak renklidir. Canlı hücre varlığında, mitokondrilerindeki dehidrojenaz enzimi yardımıyla sarı renkli çözelti, mor renkli ve çözünmeyen formazon yapıya dönüştürülmektedir. Oluşan yeni formazon yapı, farklı çözücüler yardımıyla çözünür hale getirilerek absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılmaktadır. Şekil 2’de; x eksenini kompleksin derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Şekil 2’e göre, kompleksin derişimindeki artışla paralel olarak canlı HeLa, Ishikawa, U-87, HT-29, K562 kanser hücreleri ve WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücre sayısında azalma yani antikanser aktivitede artış gözlenmiştir.



**Şekil 2.** Dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-sime)rutenyum(II) kompleksinin HeLa, Ishikawa, U-87, HT-29, K562 kanser hücreleri ve WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücreleri üzerine antikanser aktivitesi. Deneyler 9 tekrarlı yapılmış (n=9) ve sonuçlar  $\pm$ SEM olarak verilmiştir. (Kontrole göre anlamlılık; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Şekil 2’deki grafiklerden yararlanılarak, kompleksin HeLa, Ishikawa, U-87, HT-29, K562 kanser hücreleri ve WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücrelerinin % 50’sini öldürdükleri derişim değerleri ( $IC_{50}$ ) hesaplanmıştır (Tablo 1).  $IC_{50}$  değeri; kanser hücrelerinin %50’sinin öldürülmesi için gerekli derişim değeri olarak tanımlanmaktadır. Kompleksin hücrelere uygulanmasından 48 saat sonra tüm hücrelerin canlılıklarında anlamlı azalış gözlenmiştir. Ancak, HeLa ve K562 kanser hücre canlılıklarındaki azalma daha belirgin olup, bu hücrelerin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $94.39 \pm 0.08 \mu M$  ve  $35.40 \pm 0.03 \mu M$  olarak bulunmuştur. WI-38 normal insan akciğer fibroblast hücreleri ile birlikte, Ishikawa, U-87 ve HT-29 kanser hücrelerinin  $IC_{50}$  değerleri ise  $>100 \mu M$  olarak bulunmuştur.  $IC_{50}$  değerinin düşük olması yüksek antikanser aktiviteye işaret etmektedir. Bu nedenle kompleks,

HeLa ve K562 kanser hücrelerine karşı yüksek antikanser aktivite gösterirken, WI-38 normal hücreler ile Ishikawa, U-87 ve HT-29 kanser hücrelerine karşı düşük antikanser aktivite göstermiştir.

**Tablo 1.** Kompleksin insan servikal, endometrium, glioblastom, kolorektal, kronik myeloid lösemi kanser hücreleri ve insan normal akciğer fibroblast hücreleri<sup>a</sup> 'nde 48 saat için IC<sub>50</sub> değerleri (IC<sub>50</sub>, µM<sup>b</sup>)

Hücre hattı	IC <sub>50</sub> , (µM) <sup>b</sup>
HeLa	94.39 ± 0.08
Ishikawa	>100
U-87	>100
HT-29	>100
K562	35.40 ± 0.03
WI-38 <sup>a</sup>	>100

<sup>a</sup> Normal hücre, <sup>b</sup> Kompleks uygulanmasından 48 saat sonra hücre canlılığı deneysel kısımda açıklanan MTT ölçümü ile yapıldı. Herbir IC<sub>50</sub> değeri birbirinden bağımsız yapılan 3 ayrı deneyin (n=9) sonucu ± SEM olarak verildi.

Kompleksin antikanser aktivitesinin doza ve hücre hattı türüne göre değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca kompleksin, WI-38 insan normal akciğer fibroblast hücrelerine karşı HeLa ve K562 kanser hücrelerine göre daha düşük antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Kompleksin, insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve WI-38 normal hücreler arasında yaklaşık 3 kat seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur.

## SONUÇ

Kanser tüm dünyadaki ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan hastalıktır. Kanser tedavisinde günümüzde var olan radyoterapi, cerrahi operasyonlar, immunoterapi ve kemoterapi gibi birçok alternatif yöntem kullanılmasına rağmen, ilaçların yan etkileri ve ilaca karşı direnç gelişim nedeniyle kanser hala ciddi bir klinik problemdir. Bu nedenle yeni ilaç adayları bileşiklerin sentezi önem arz etmektedir. Metaller ile heterosiklik ligantların oluşturduğu kompleksler, metal-protein benzeri bileşikler oldukları için biyoinorganik kimyada özellikle dikkat çekmektedir. Rutenyum ve benzimidazol içeren komplekslerin içerdikleri gruplara bağlı olarak bu komplekslerin farklı biyolojik aktivitelere (antibakteriyel, antioksidan, antikanser, antifungal, antiviral, antihipertansif, antiülser ve anti-enflamatuar vb.) sahip olabilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle yeni Ru-benzimidazol bileşiklerinin sentezi ve biyolojik aktivitelere araştırılması çalışmalarını güncelliğini korumaktadır.

Bu çalışmada iki avantajlı grup olan rutenyum ve benzimidazol yapılarının yanısıra *p*-simen ve metallil yapılarını da içeren, dikloro-[1-(2-metallil)benzimidazol]-(*p*-simen)rutenyum(II) kompleksinin sentezi ve insan servikal adenokarsinom (HeLa), insan endometrial adenokarsinom (Ishikawa), insan glioblastoma (U-87), insan kolorektal adenokarsinom (HT-29), insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve normal insan akciğer fibroblast (WI-38) hücreleri üzerine antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Kompleksin, derişimindeki artışla paralel olarak hücrelerin canlılık oranlarının azaldığı gözlenmiş olup, bu azalışın HeLa ve K562 hücrelerinde daha belirgin olduğu saptanmıştır. Daha önemli olan bulgu ise, kompleksin özellikle insan kronik myeloid lösemi (K562) hücreleri ve WI-38 normal hücreler arasında yaklaşık 3 kat seçiciliğe sahip olduğu bulunmuştur.

## TEŞEKKÜR

Antikanser aktivite çalışmaları Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (SCÜTAM)'da yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Ashok D, Gundu S, Aamate VK, Devulapally MG 2018. Conventional and microwave-assisted synthesis of new indole-tethered benzimidazole-based 1,2,3-triazoles and evaluation of their antimycobacterial, antioxidant and antimicrobial activities. *Mol Divers.* 22(4):769-778. doi: 10.1007/s11030-018-9828-1.
- Biancalana L, Pampaloni G, Marchetti F 2017. Arene Ruthenium(II) Complexes with Phosphorous Ligands as Possible Anticancer Agents. *Chimia (Aarau).* 71(9):573-9. doi: 10.2533/chimia.2017.573. Review.
- Bistrović A, Krstulović L, Stolić I, Drenjančević D, Talapko J, Taylor MC, Kelly JM, Bajić M, Raić-Malić S 2018. Synthesis, anti-bacterial and anti-protozoal activities of amidinobenzimidazole derivatives and their

- interactions with DNA and RNA. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 33(1):1323-1334. doi: 10.1080/14756366.2018.1484733
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018. Global cancer statistics. GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
- Chen J, Zhang Y, Li G, Peng F, Jie X, She J, Dongye G, Zou Z, Rong S 2018. Chen Cytotoxicity in vitro, cellular uptake, localization and apoptotic mechanism studies induced by ruthenium(II) complex. *J Biol Inorg Chem.* 23(2):261-75. doi: 10.1007/s00775-017-1528-2.
- Ganie AM, Dar AM, Khan FA, Dar BA 2018. Benzimidazole Derivatives as Potential Antimicrobial and Antiulcer Agents: A Mini Review. *Mini Rev Med Chem*; doi: 10.2174/1381612824666181017102930
- Kenchappa R, Bodke YD, Telkar S, Aruna Sindhe M 2016. Antifungal and anthelmintic activity of novel benzofuran derivatives containing thiazolo benzimidazole nucleus: an in vitro evaluation. *J Chem Biol.* 10(1):11-23. doi: 10.1007/s12154-016-0160-x
- Khalifa ME, Gobouri AA, Kabli FM, Altalhi TA, Almalki ASA, Mohamed MA 2018. Synthesis, Antibacterial, and Anti HepG2 Cell Line Human Hepatocyte Carcinoma Activity of Some New Potentially Benzimidazole-5-(Aryldiazenyl)Thiazole Derivatives. *Molecules.* 23(12). doi: 10.3390/molecules23123285.
- Sharma R, Bali A, Chaudhari BB 2017. Synthesis of methanesulphonamido-benzimidazole derivatives as gastro-sparing antiinflammatory agents with antioxidant effect. *Bioorg Med Chem Lett.* 27(13):3007-3013. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.05.017.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82:1107-12.
- Şahin N, Özdemir N, Gürbüz N, Özdemir İ 2019. Novel N-Alkylbenzimidazole-Ruthenium (II) complexes: Synthesis and catalytic activity of N-alkylating reaction under solvent-free medium. *Appl. Organomet.Chem.*, 33(2): e4704.
- Thota S, Rodrigues DA, Crans DC, Barreiro EJ 2018. Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem.* 61(14):5805-5821. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01689.
- Vausselin T, Séron K, Lavie M, Mesalam AA, Lemasson M, Belouzard S, Fénéant L, Danneels A, Rouillé Y, Cocquerel L, Foquet L, Rosenberg AR, Wychowski C, Meuleman P, Melnyk P, Dubuisson J 2016. Identification of a New Benzimidazole Derivative as an Antiviral against Hepatitis C Virus. *J Virol.* 90(19):8422-34. doi: 10.1128/JVI.00404-16.
- Web;<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanserden-korunma/kanserden-korunmalist/436-kanser-%C3%B6nleme-%C3%A7al%C4%B1%C5%9Fmalar%C4%B1.html> (Son erişim tarihi 16.06.2019)
- Zhang Y, Xu J, Li Y, Yao H, Wu X 2015. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel NO-releasing benzimidazole hybrids as potential antihypertensive candidate.. *Chem Biol Drug Des.* 85(5):541-548. doi: 10.1111/cbdd.12442.

## Amine-functionalized graphene oxide supported effective metal nanocatalyst for dimethylamine-borane dehydrogenation in water

Yaşar Karataş, Mehmet Gülcan\*

Chemistry Department, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Zeve Campus 65080 Van, Turkey.

\*mehmetgulcan@yyu.edu.tr

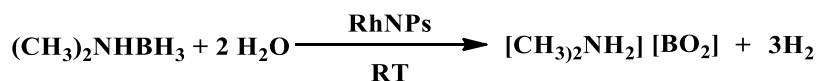
### Abstract

Herein, we report a highly active Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst for the hydrolytic dehydrogenation of dimethylamine-borane under room conditions. The Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was readily prepared and used effectively in the catalytic dehydrogenation of dimethylamine-borane in water at room conditions. The prepared Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was characterized using advanced analytical methods such as XPS, TEM etc. The analyzes shown that Rh metals are uniformly distributed on the GO-NH<sub>2</sub> support surface; the mean particle of catalyst size was found to be 1.598 ± 0.35 nm. The catalytic test showed that DMAB had a high catalytic activity with Rh@GO-NH<sub>2</sub> in aqueous solutions for hydrolytic dehydrogenation of DMAB at room conditions. The study also included kinetic data such as activation parameters for different temperatures, catalyst and substrate concentration experiments.

**Keywords:** Catalyst, Dehydrogenation, Dimethylamine-borane, Hydrogen, Rhodium

### INTRODUCTION

Recently, the one of the most important obstacles to overcome with hydrogen technologies is the safe and efficient storage [Rand and Dell, 2005]. The need for large mass storage materials is increasing day by day. Because of hydrogen gas has a very low density; the liquefaction and compression of hydrogen gas are very difficult for the transportation at ambient conditions [Sen et al., 2017]. For this purpose, there are many compounds which have been used as solid hydrogen storage materials such as boron nitrogen (B-N) compounds (NH<sub>3</sub>BH<sub>3</sub>, NR<sub>3</sub>BH<sub>3</sub>, (R-H or alkyl), chemical containing boron (LiBH<sub>4</sub>, NaBH<sub>4</sub>, Ca(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Mg(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, hydrazine (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), mesoporous-microporous materials in recent times [Günbatar et al., 2018]. B-N compounds appear to be more advantageous because of their high hydrogen storage capacity and the tendency to hold more hydrogen (with boron and nitrogen) among mentioned materials, this feature of the material allows charging and discharging of the material [Friederich et al., 2009]. When compared to hydride and porous materials for the releasing and up taking of hydrogen, the above-mentioned properties at controllable temperature and pressure make the B-N compounds distinguishable. According to literature, the hydrolytic dehydrogenation of dimethylamine – borane (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NHBH<sub>3</sub> was carried out by using an appropriate catalyst at room temperature. The hydrolytic dehydrogenation of DMAB has various advantageous. For instance, DMAB has very high water solubility in room temperature [Wechsler et al., 2008]. Further, the current solution with DMAB has a stable form across to self-hydrolysis at ambient conditions, and 3 moles of H<sub>2</sub> can be obtained from 1 mole of DMAB in aqueous medium, but in only 1 mole H<sub>2</sub> is obtained from 1 mole DMAB in an organic solution. So far, polymer nanogel-supported Ni particles, RuNPs, Pd/C, NiSO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>/KReO<sub>4</sub> and NiSO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> have been tested as catalysts for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB [Günbatar et al., 2018]. Generally, all these catalysts are heterogeneous catalysts and their surface contain a few active atoms. So, the catalytic activity is restricted by the limited surface area in mentioned heterogeneous catalysts. Besides, the literature contains some semi-heterogeneous (metal nanoparticles) catalysts [Stephens et al., 2007] which have been also used for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB. Generally, metal nanoparticles can be dispersible in water to enhance catalyst surface. Such a pathway appears very promising way for rapid hydrogen generation and high catalytic activity [Schatz et al., 2010]. Therefore, it is necessary to develop a metal nanocatalyst which is water-dispersible, and which can used in the hydrolytic dehydrogenation of DMAB.



**Scheme 1:** The hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed by Rh@GO-NH<sub>2</sub> at room temperature

## MATERIALS and METHODS

### The preparation of GO, GO-NH<sub>2</sub> and Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst

The preparation of graphene oxide (GO) [Cao et al., 2010], amine functionalized graphene oxide (GO-NH<sub>2</sub>) [Lin et al., 2011] and Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst has been performed by using a facile impregnation method. To prepare Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst, briefly, 6.22 mg of rhodium (III) chloride and 150 mg amine functionalized graphene (GO-NH<sub>2</sub>) were added to 5.0 mL H<sub>2</sub>O, and the resulting solution was stirred at 600 rpm for 2 h. Then, 17.21 mg NaBH<sub>4</sub> have been used to reduce Rh<sup>+3</sup>@GO-NH<sub>2</sub> and to obtain the Rh NPs@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst. The obtained NPs were washed with 3x10 mL H<sub>2</sub>O and dried in 150 °C for 45 min.

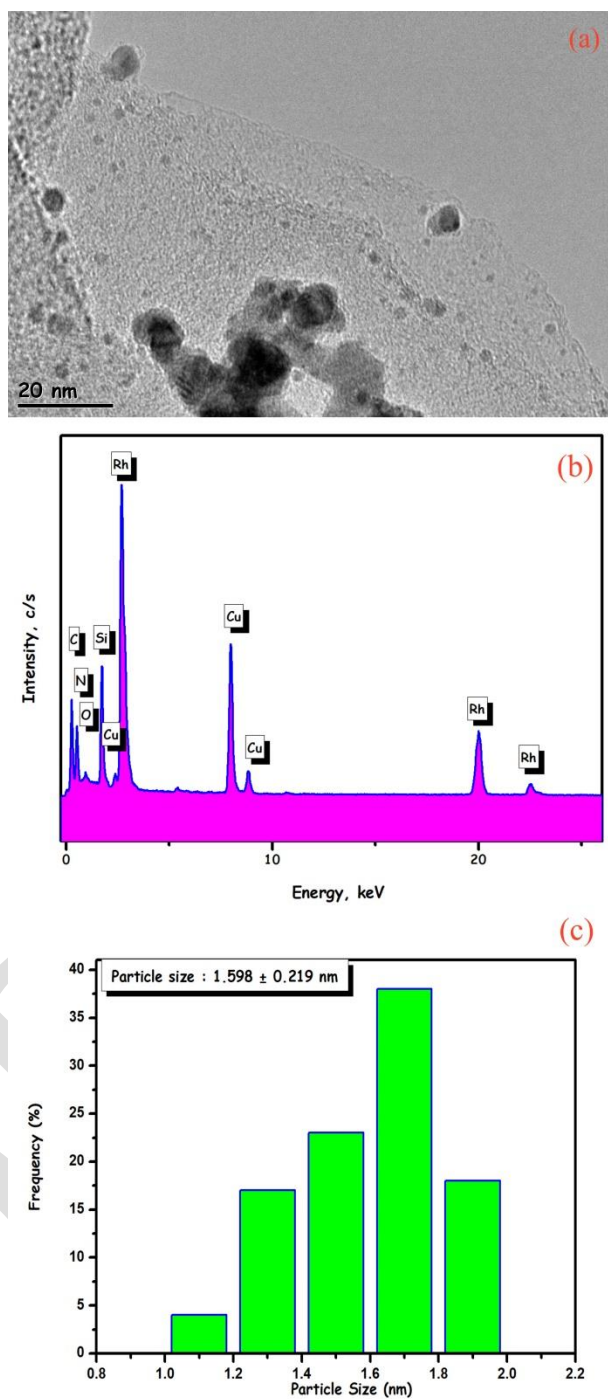
### The catalytic experiments, kinetic and activation parameters of the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed Rh NPs@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst

In order to determine the effect of Rh nanocatalyst concentration on the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst, a serious experiment with various Rh concentration (1.26, 2.52, 3.78, 5.04 mM) were carried out at 1 mM of DMAB (5 mL). Another set of experiments with various DMAB concentrations (50, 100, 150, 200 mM) were performed at 1.26 mM of Rh at room temperature. Besides, the hydrolytic dehydrogenation of DMAB at 25, 35, 45, 55 °C with solution of 10 mL containing 100 mM of DMAB, 1.26 mM of Rh NPs. Activation parameters (E<sub>a</sub>, ΔH<sup>#</sup>, ΔS<sup>#</sup>) were detected using various temperatures experiment data, and Arrhenius-Eyring plots.

## RESULTS

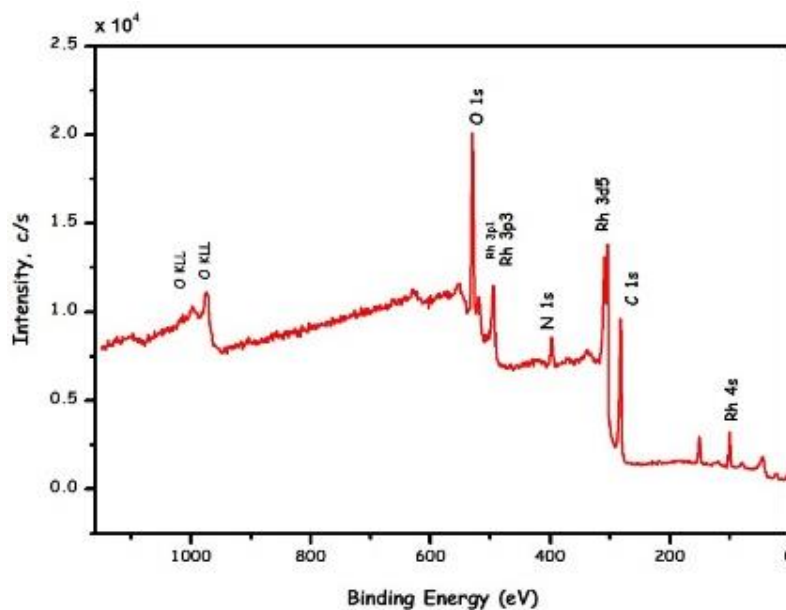
### The characterization of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst

Monodisperse Rh@GO-NH<sub>2</sub> was obtained by the reduction Rh (III) in the presence of NaBH<sub>4</sub> medium containing amine-functionalized graphene at mild conditions. Formation of an agglomerate and precipitate in the solution containing NaBH<sub>4</sub> and Rh (0) nanoparticles was seen without using amine-functionalized graphene. Because of this situation, it can be said that only chloride anion cannot be stabilize the solution medium of metal without amine-functionalized graphene nanosheets. In presence of amine-functionalized graphene nanosheets nanomaterials in the solution, no participate or agglomeration occurs, and the resulting nanoparticles form a very stable structure [Wang et al., 2012]. This result shows that the stabilization of Rh nanoparticles was provided by amine-functionalized graphene. Towards the end of the catalytic reaction, the light brown color turns into dark brown because of the reduction of Rh (III) to Rh (0). The formation of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst can be seen in Fig. 1 (a) by the help of TEM images. The related EDS diagram also indicates the existence of Rh in prepared nanoparticles as shown in Fig. 1 (b). The particle size of Rh@GO-NH<sub>2</sub> were investigated by using the TEM image. More than 100 particles were counted and the results showed in Fig. 1 (c). The average particle size of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was found to be 1.598 ± 0.219 nm, and this size is in good agreement with Rh (0) nanoparticles [Yıldız et al., 2016]. The oxidation state and surface composition of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis. The survey XPS spectrum of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst is seen in Fig. 2. Fig. 2 shows the photopics of Rh with C and O atoms forming the amine-functionalized graphene nanosheets.



**Fig. 1.** (a) TEM image in 20 nm scale (b) EDS Diagram (c) associated size histogram of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst

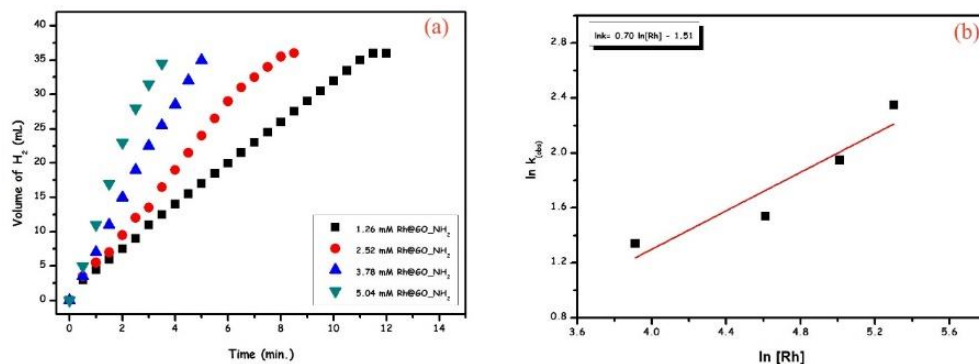




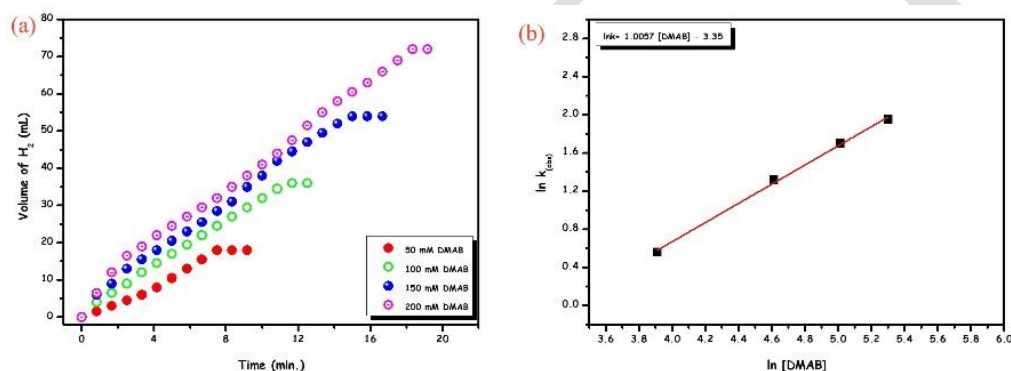
**Fig. 2:** Survey XPS spectra of Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst.

### The detailed kinetic studies of the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed by Rh NPs@GO-NH<sub>2</sub>

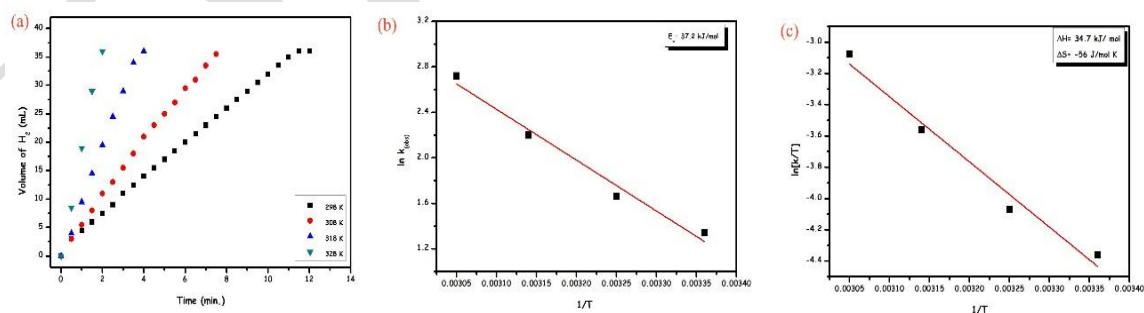
The H<sub>2</sub> production from the hydrolytic dehydrogenation of DMAB with various Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst concentrations at room temperatures are seen in Fig. 3. The catalytic reaction of DMAB using Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was completed shortly (average in 11 min) and 3 mol of H<sub>2</sub> were obtained at room temperature. As seen in Fig. 3 (a), the amount of H<sub>2</sub> released increases almost linearly with the increase in the amount of catalyst. A graphic for a rate versus Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst concentration between ln(k) and ln(cat.) forms a straight line with a slope of 0.70 (Fig. 3(b)). The result revealed that the rate of catalytic reaction of DMAB catalysed by Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was corresponded with the 0.7-order equation. A set of different experiments were carried out to determine the effect of DMAB concentration on the catalytic reaction with the same catalyst concentration at room temperature. The results at different DMAB concentrations are given in Fig. 4 (a). A plot for a rate versus for different DMAB concentrations between ln(k) and ln(DMAB) forms a slope of 1.055 (as shown in Fig. 4(b)). This result indicates that the catalytic reaction of DMAB using Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst is compatible with one-order dependence. The results of reactions were also conducted at different temperatures (25, 35, 45, 55 °C) for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalysed by Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst is given in Fig. 5(a). As seen in the Fig. 5 the volume of H<sub>2</sub> released increases with the increasing temperature. The results of catalytic reaction showed that Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst highly catalyzed the hydrolytic dehydrogenation of DMAB at room temperature and 3 mol of H<sub>2</sub>. Activation energy ( $E_a = 37.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), enthalpy ( $\Delta H = 34.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) and entropy ( $\Delta S = -56 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) values were calculated using Fig. 5 (b). Arrhenius [Wood, 2018] and Eyring [Bonnet and Rayez, 2010] equations (Fig. 5(c)) have been used for those calculations of the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalysed by Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst. The reaction rate constant was obtained from the almost linear portion of the generation H<sub>2</sub> versus time plot in the range of temperature 25–55 °C.



**Fig. 3.** The rate of [H<sub>2</sub>] versus time for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalysed different Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst with a solution containing 100 mM (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NHBH<sub>3</sub> in various Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst concentrations corresponding to [Rh]= 1.26, 2.52, 3.78, 25.04 mM at 25 ± 0.5 °C.



**Fig. 4.** The rate of [H<sub>2</sub>] versus time for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst with different DMAB concentrations at room temperature.



**Fig. 5:** The rate of [H<sub>2</sub>] versus time for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst at various temperatures.

## CONCLUSION

The findings and results about the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed by Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst obtained in this study can be summarized as follows:

- Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was prepared in a stable form using RhCl<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O and amine-functionalized graphene at mild conditions by using a facile impregnation method.
- A set of advanced analytic methods such as TEM, XPS etc. were used to characterize the formation of well dispersed Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst of 1.598 ± 0.35 nm size.
- The hydrolytic dehydrogenation of DMAB with Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst was occurred even at low (25 °C) temperature with 3 mol of H<sub>2</sub>.
- The kinetic studies, the activation energy (E<sub>a</sub> = 37.2 kJ mol<sup>-1</sup>), enthalpy and entropy values (ΔH = 34.7 kJ mol<sup>-1</sup>; ΔS = -56 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) were calculated for the hydrolytic dehydrogenation of DMAB catalyzed by monodisperse rhodium nanoparticles using Arrhenius and Eyring plots.
- The prepared Rh@GO-NH<sub>2</sub> nanocatalyst can have a great potential in both fuel cells and other catalysis reactions in near future in terms of high catalytic activity and stability by the help of amine-functionalized graphene.

## REFERENCES

- Bonnet L, Rayez JC 2010. Dynamical derivation of Eyring equation and the second order kinetic law, *Int. J. Quantum Chem.* 110 (13): 2355-2359.
- Cao A, Luc R, Vesper G 2010. Stabilizing metal nanoparticles for heterogeneous catalysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12: 13499-13510.
- Friederich A, Drees M, Schneider S 2009. Ruthenium catalyzed dimethylamineborane dehydrogenation: Stepwise metal centered dehydrocyclization, *Chem.-Eur. J.*, 15: 10339-10342.
- Günbatar S, Aygun A, Karataş Y, Gülcan M, Şen F 2018. Carbon-nanotube-based rhodium nanoparticles as highly-active catalyst for hydrolytic dehydrogenation of dimethylamine-borane at room temperature, *Journal of Colloid and Interface Science*, 530: 321-327.
- Rand DAJ, Dell RMJ 2005. The hydrogen economy: A threat or an opportunity for lead-acid batteries? *J Power Sources*, 144: 568-578.
- Sen B, Kuzu S, Demir E, Akocak S, Sen F 2017. Monodisperse palladium-nickel alloy nanoparticles assembled on graphene oxide with the high catalytic activity and reusability in the dehydrogenation of dimethylamine-borane, *Int. J. Hydrogen Energy*, 42 (36): 23276-23283.
- Schatz A, Reiser O, Stark WJ 2010. Nanoparticles as semi-heterogeneous catalyst supports, *Chemistry-A European Journal*, 16 (30): 8950-8967.
- Stephens FH, Pons V, Baker RT 2007. Ammonia-borane: The hydrogen source par excellence? *Dalton Trans.*, 7 (25): 2613-2326.
- Lin Y, Jin J, Song M 2011. Preparation and characterisation of covalent polymer functionalized graphene oxide, *J. Mat. Chem.* 21: 3455-3461.
- Yıldız Y, Ulus R, Eris S, Aday B, Kaya M, Sen F 2016 Functionalized multiwalled carbon nanotubes (f-MWCNT) as highly efficient and reusable heterogeneous catalysts for the synthesis of acridinedione derivatives, *Chemistry Select*, 1 (13): 3861-3865.
- Wang X, Xing W, Zhang P, Song L, Yang H, Hu Y 2012 Covalent functionalization of graphene with organosilane and its use as a reinforcement in epoxy composites, *Compos. Sci. Technol.* 72: 737-743.
- Wechsler D, Cui Y, Dean D, Davis D, Jessop PG 2008. Production of H<sub>2</sub> from combined endothermic and exothermic hydrogen carriers, *J. Am. Chem. Soc.*, 130: 17195-17203.
- Wood DA 2018. Thermal maturity and burial history modelling of shale is enhanced by use of Arrhenius time-temperature index and memetic optimizer, *Petroleum*, 4(1): 25-42.

## Catalytic reduction of 2-nitrophenol in water by using carbon-based material supported metal (0) nanoparticles

Suat Taçyıldız, Yaşar Karataş, Mehmet Gülcan\*

Chemistry Department, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Zeve Campus 65080 Van, Turkey.

\*mehmetgulcan@yyu.edu.tr

### Abstract

We reported the improved catalytic property of Ni (0) nanoparticles supported on graphitic carbon nitride as carbon-based material (Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) for the catalytic reduction of 2-nitrophenol in the presence of NaBH<sub>4</sub> at moderate conditions. Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst was synthesized by the deposition-reduction method. Sundry techniques such as XPS, FT-IR, TEM have been applied to explain the structure and morphology of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst. The results show that the Ni (0) nanoparticles are perfectly dispersed on the surface of the mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> support material. The catalytic activity of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst was tested in the catalytic reduction of 2-nitrophenol in water in the presence of NaBH<sub>4</sub> as reductant and the excellent activity of nanocatalyst have been detected against 2-nitrophenol. Other important point is that the nanocatalyst has very high reusability performance (at 3th reuse) for the catalytic reduction of 2-nitrophenol.

### INTRODUCTION

Today, one of the most important environmental threats to life is considered water pollution [Chiou et al., 2013]. The pollutants carried into the human body by means of the water resources are very difficult or impossible to compensate for the human body. Nitrophenol derivatives are among the most dangerous organic pollutants from industry and agriculture [Pandey and Mishra, 2014]. Nitrophenols, including para-, meta- and ortho- nitrophenols, are known to be hazardous and toxic contaminants used in the synthesis of pesticides, pharmaceutical products and dyes [Ma et al., 2017]. They lead directly to poisons in aquatic organisms and many health problems for human life. However, it is difficult to effectively and completely remove the nitrophenol derivatives by conventional wastewater treatment methods [Ivancev-Tumbas et al., 2008]. Up to the present, many methods like membrane filtration [O'Connor and Young, 1989], microbial degradation [Dieckmann and Gray, 1996], photocatalytic degradation [Oturán et al., 2000] electro-Fenton method [Modirshahla et al., 2008], electrocoagulation [Chern and Chein, 2002], adsorption [Canizares et al., 2004], electrochemical treatment [Zhao et al., 2015] and chemical reduction have been used to extract nitrophenol derivatives from water sources. Among the methods mentioned above, the chemical reduction of nitrophenols is considered to be the most effective method for removing nitrophenol derivatives from waste water. In addition, aminophenols, which are the reduction products of nitrophenols, are used for many medical and industrial purposes, which is another proof that the chemical reduction method is effective [Woo and Lai, 2001].

To realize aforementioned one-pot strategy, a suitable high surface area support material that is highly dispersed in aqueous medium and capable of stabilizing the in situ generated metal(0) NPs is required. In this respect, recently, mesoporous graphitic carbon nitride (mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) that is a polymeric 2D material consisting of mainly C and N atoms and a visible-light active semiconductor material has been appeared as a suitable support material for the stabilization of metal NPs. Owing to its special structure and high-surface area (200- 400 m<sup>2</sup>/g). [Li and Wang, 2002] Besides all these advantageous properties, mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> has a unique feature compared to the carbon-based support materials; it enhances the catalytic activity of metal(0) NPs under the visible light owing to the Mott-Schottky effect driven by favorable the work function difference between the mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and metal(0) NPs. [Fan et al., 2014]

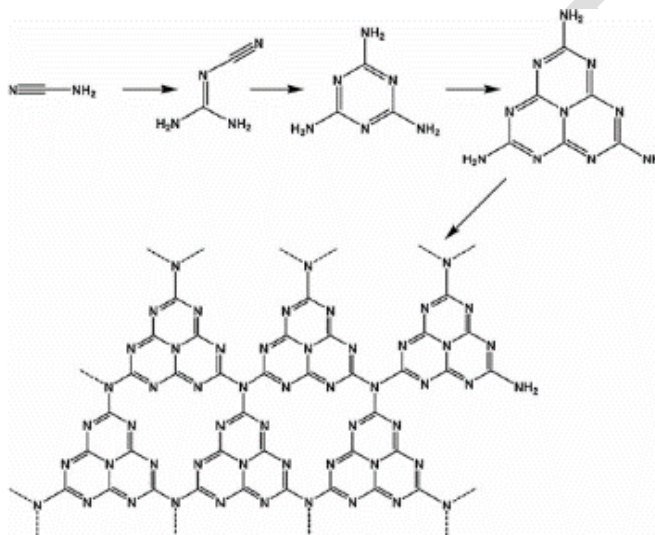
In this work, we prepared Ni (0) nanoparticles supported on graphitic carbon nitride (Ni/ mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) for the catalytic reduction of 2-nitrophenol in the presence of NaBH<sub>4</sub> at moderate conditions. Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst was synthesized by the deposition-reduction method. Sundry techniques such as XPS, TEM, FT-IR have been applied to explain the structure and morphology of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst. The results show that the Ni (0) nanoparticles are perfectly dispersed on the surface of the mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> support material. The catalytic activity of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst was tested in the hydrogenation of nitrophenol derivatives in water in the presence

of NaBH<sub>4</sub> as reductant and the excellent activity of nanocatalyst have been detected against 2-nitrophenol. Other important point is that the nanocatalyst has very high reusability performance (at 3th reuse) for the catalytic reduction of 2-nitrophenol.

## MATERIALS AND METHODS

### Synthesis and Characterization of Mesoporous Graphitic Carbon Nitride (mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)

In the first stage of the project, mesoporous graphitic carbon nitride (mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) was synthesized from a series of polymerization reactions starting from cyanamide according to the relevant reference [Li et al., 2016] (Scheme 1).



**Scheme 1:** Synthesis of Meso Porous Graphitic Carbon Nitride (mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)

For this purpose, 5 g of cyanamide and 12.5 g of colloidal silica were mixed thoroughly in a 50 mL flask and allowed to stand in the oil bath set to 100 °C until the liquid was completely evaporated (about 4 hours). The solid obtained after this time was thoroughly powdered in mortar. The powdered solid temperature Cam taken into a glass or porcelain vessel was placed in a timed tube furnace and heated to 600 °C to increase the temperature to 2-3 °C per minute. It was kept at this temperature under N<sub>2</sub> atmosphere for 4 hours. After this time, the brown-yellow product obtained was taken up in 4 M 50 mL of HF solution and stirred at room temperature for 24 hours. After 24 hours, the solid product was isolated by filtration. It was washed with pure water (3x20 mL) and ethanol (2x20 mL) respectively and dried in a vacuum oven at 60 °C for 2 days. FT-IR spectroscopy technique was used to define the obtained mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> structure. The obtained spectral data were found to be consistent with the bibliographic data [Kim et al., 2007]. FT-IR (selected, cm<sup>-1</sup>) 3197 (-NH<sub>2</sub>, b), 1558 (-C=N, s), 1409 (-CN, s), 1302 (-CN, s), 1232 (-CN, s), 810 (CN<sub>heterocycle</sub>, s) (Fig. 1).

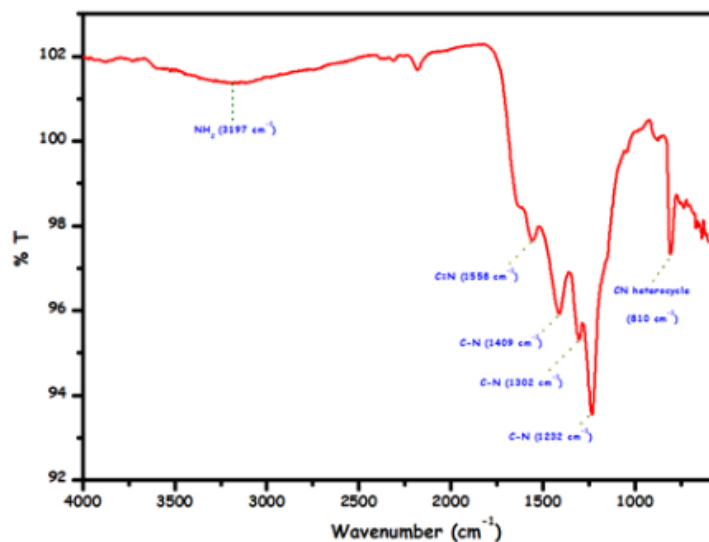


Fig 1. FT-IR spectrum of the mesoporous graphitic carbon nitride (mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) structure

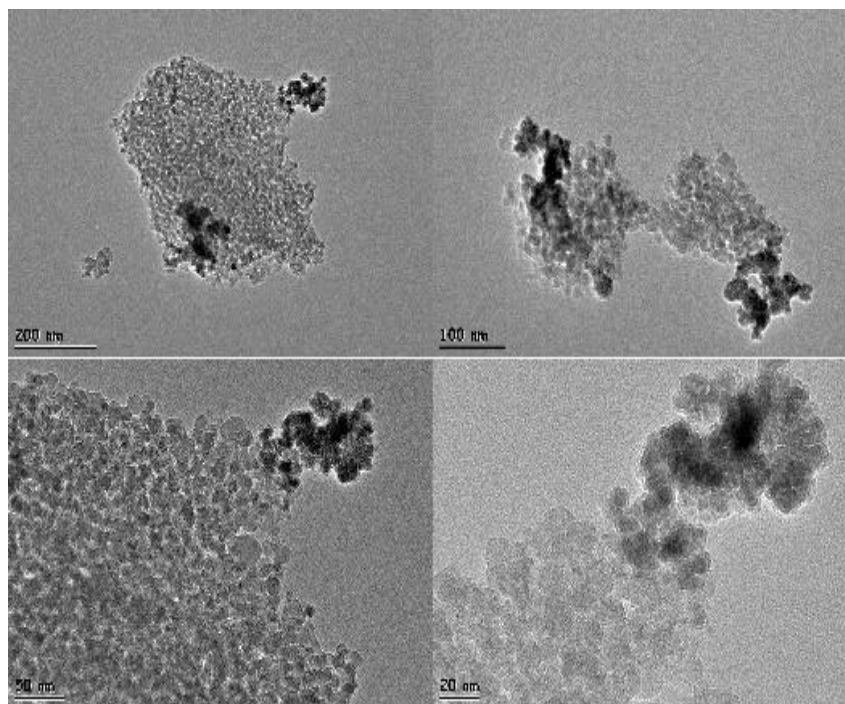
### In-situ formation of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst and its catalytic efficiency in the hydrogenation of nitrophenols

Ni<sup>+2</sup>/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> precatalyst was synthesized by the wet-impregnation method. According to this method, 5.0 mL of aqueous NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O solution (8.26 mg; 34.8 μmol Ni) is mixed with mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (100 mg) at 700 rpm for 3 h. Then the solid portion is isolated and washed 3 times with distilled water. The resulting product (Ni<sup>+2</sup>/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) is dried in vacuum at 373 K and then bottled for use. For each substrate, 10 mg of Ni<sup>+2</sup>/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and 2.0mM (20 μmol) aqueous solution (10 mL) of the nitrophenol derivative (2.78 mg for 2-NP) were taken in a jacketed Schlenk in separate experiments. With the thermostated water circulator (Selecta), the temperature of the system was set at 298 K. After about 15 min of waiting to reach the thermal equilibrium, 0.2 mmol of NaBH<sub>4</sub> (77.2 mg) dissolved in 1.0 ml of water was added to the Schlenk and catalytic reaction was initiated at a stirring rate of 700 rpm (t=0 min). The conversion of the nitrophenol derivative to the corresponding aminophenol was analyzed by Shimadzu UV-3600 UV-vis spectrometer after dilution to 2 mL by withdrawing 100 μL of the reaction solution at certain time intervals. The optical absorption spectra of the nitrophenol derivatives were measured at their characteristic wavelengths (2-NP: 414 nm). The concentration of nitrophenol was calculated using a calibration curve constructed with absorbance of standard solutions.

## RESULTS

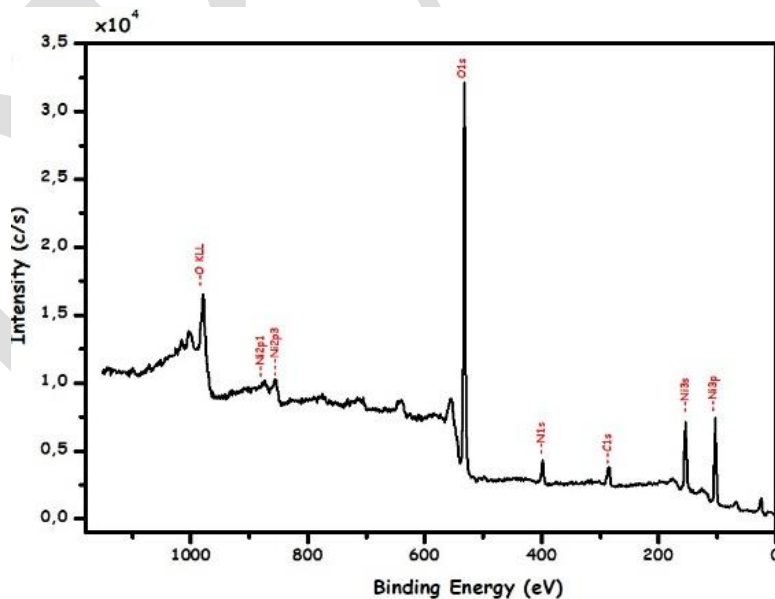
In order to determine the mass metal percentage (theoretical metal loading of 2%) of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst, inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) was used and the percentage metal mass of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst was determined to be 1.22%. The percentage of Ni metal detected was used to calculate catalyst concentrations and activity.

The morphology and particle size distributions of mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> supported Ni (0) nanoclusters were characterized by permeable electron microscopy (TEM). Fig. 2 shows TEM images of different sizes of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst obtained by reduction of 2-nitrophenol under reaction conditions. From the images, it is understood that Ni nanoclusters are distributed over the surface of mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.



**Fig. 2.** TEM images of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst obtained in-reaction by reduction of 2-nitrophenol in different scale.

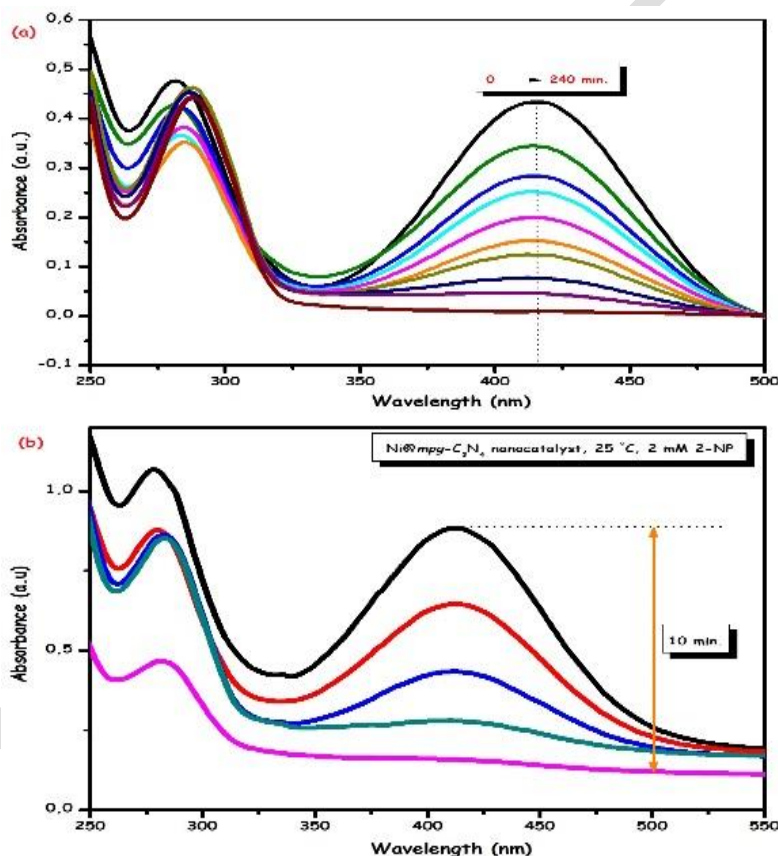
XPS analysis was performed to determine the elemental composition of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst and oxidation step of Ni metal. In Fig. 3, the XPS spectrum in the general scanning mode shows the presence of elements C, O, N and Ni in the nanocatalyst.



**Fig. 3.** Survey XPS spectrum of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst.

A model was selected for the test reaction to investigate the catalytic performance of 2-nitrophenol in the presence of NaBH<sub>4</sub> to the 2-aminophenol derivative in the presence of a Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst. 2-nitrophenol in the alkaline solution shows the strongest absorption band at a wavelength of 414 nm. Thus, kinetic parameters related to monitoring the change of the absorption peak can be obtained. In the absence of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst, complete reduction of 2-nitrophenol in the presence of an equivalent amount of NaBH<sub>4</sub> was carried out for 240 min. It was determined (Fig. 3 (a)). These results show that the self-hydrolysis of NaBH<sub>4</sub> (2) reduces the 2-nitrophenol very slowly.

However, in the presence of a very low concentration of Ni (II) cation (2.08 μmol) decorated on the surface of mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst obtained simultaneously shows the simultaneous reduction of 2-nitrophenol to 2-aminophenol (Fig. 4 (b)). It was found to occur much faster (10 min.) than experiments without catalyst.

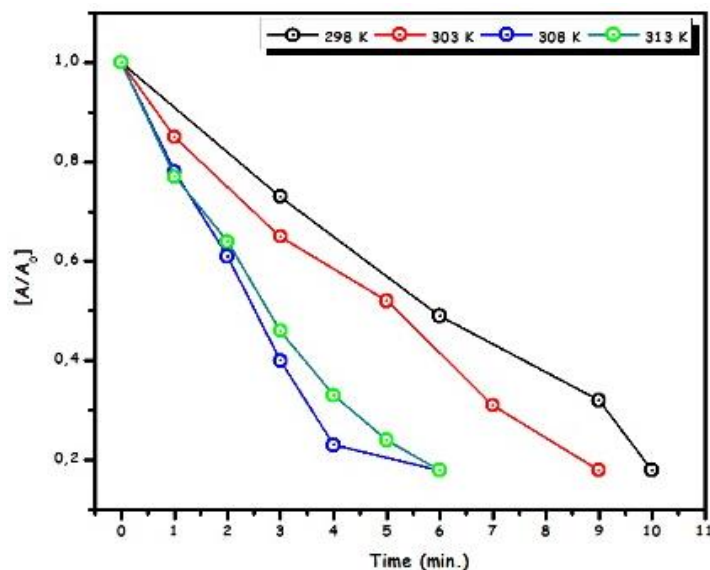


**Fig. 4.** UV-Vis spectra for reduction of 2-nitrophenol (20 μmol) in aqueous NaBH<sub>4</sub> (0.2 mmol) solution at room temperature in the presence of (a) Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst and (b) in the presence of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst

The absorption band of 2-nitrophenol at 414 nm shifted to 282 nm after addition of NaBH<sub>4</sub> solution. This indicates the formation of 2-nitrophenolate in the reaction solution, and the intensity of the absorption band is gradually reduced in the presence of the Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst. Fig. 5 shows that the catalytic reduction of 2-nitrophenol to 2-aminophenol occurs within 10 min and that 2-nitrophenol is fully depleted and converted to 2-aminophenol. However, it is estimated that the catalytic system we have developed for this very important reaction will make a significant contribution to the literature, since both an efficient and cheap metal is used.

Experiments were performed at temperatures of 298, 303, 308 and 313 K to investigate the effect of temperature on the catalytic reduction of 2-nitrophenol to 2-aminophenol in the presence of Ni/mpg-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanocatalyst (Fig. 5). As expected, the rate of catalytic reaction was also increased due to the increase in temperature.





**Fig. 5.** Graph of the remaining fraction of 2-nitrophenol (20  $\mu\text{mol}$ ) for 2-nitrophenol ( $A / A_0$ ) in aqueous sodium borohydride (0.2 mmol) solution at different temperatures in the presence of Ni/mpg- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanocatalyst (2.08  $\mu\text{mol}$  Ni) versus time

## CONCLUSION

- The Ni/mpg- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanocatalyst was prepared in a reproducible manner by affixing the Ni (II) cation to the mesoporous graphitic carbon nitride surface by the conventional wet-impregnation method and prepared in the presence of the pre-catalyst  $\text{NaBH}_4$ , in aqueous medium and at 298 K temperature in the presence of 2-nitrophenol. It has been found to be an active and cost-effective nanocatalyst for catalytic reduction of 2-aminophenol.
- The Ni/mpg- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanocatalyst was characterized in detail using advanced analytical and spectral methods such as FT-IR, XPS and TEM.
- The catalytic activity of the Ni/mpg- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanocatalyst was tested for efficacy and stability in the catalytic reduction of 2-nitrophenol in aqueous  $\text{NaBH}_4$  media. Under moderate conditions, the Ni/mpg- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanocatalyst was found to be a highly active nanocatalyst in the catalytic reduction of 2-nitrophenol to 2-aminophenol.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by TUBITAK 2209A.

## REFERENCES

- Canizares P, Sáez C, Lobato J, Rodrigo MA 2004. Electrochemical treatment of 4-nitrophenol- containing aqueous wastes using boron-doped diamond anodes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 43: 1944–1951.
- Chiou JR, Lai BH, Hsu KC, Chen DH 2013. One-pot green synthesis of silver/iron oxide composite nanoparticles for 4-nitrophenol reduction, *J. Hazard. Mater.* 248–249: 394–400.
- Chern JM, Chien YW 2002. Adsorption of nitrophenol onto activated carbon: Isotherms and breakthrough curves, *Water Res.* 36: 647–655.
- Dieckmann MS, Gray KA 1996. A comparison of the degradation of 4-nitrophenol via direct and sensitized photocatalysis in  $\text{TiO}_2$  slurries, *Water Res.* 30: 1169–1183.
- Fan Y, Li X, He X, Zeng C, Fan G, Liu Q, Tang D 2014. Effective hydrolysis of ammonia borane catalyzed by ruthenium nanoparticles immobilized on graphitic carbon nitride, *Int. J. Hydrogen Energy*, 39: 19982–19989.

- Goyala A, Bansal S, Kumar V, Singh J, Singhal S 2015. Mn substituted cobalt ferrites ( $\text{CoMn}_x\text{Fe}_{2-x}\text{O}_4$  ( $x=0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0$ )): As magnetically separable heterogeneous nanocatalyst for the reduction of nitrophenols, *Appl. Surf. Sci.* 324: 877–889.
- Ivancev-Tumbas I, Hobby R, Kuchle B, Panglisch S, Gimbel R 2008. p-Nitrophenol removal by combination of powdered activated carbon adsorption and ultrafiltration – comparison of different operational modes, *Water Res.* 42: 4117–4124.
- Kim M, Hwang S, Yu J-S 2007. Novel ordered nanoporous graphitic carbon nitride with  $\text{C}_3\text{N}_4$  stoichiometry as a support for Pt-Ru anode catalyst in DMFC. *J. Mater. Chem.*, 17: 1656-1659
- Li H, Wang L, Liu Y, Lei J, Zhang L 2016. Mesoporous graphitic carbon nitride materials: synthesis and modifications, *Res. Chem. Intermed.* 42: 3979-3998.
- Li XH, Wang XC 2012. Mesoporous g- $\text{C}_3\text{N}_4$  nanorods as multifunctional supports of ultrafine metal nanoparticles: Hydrogen generation from water and reduction of nitrophenol with tandem catalysis in one step Antonietti, *Chem. Sci.* 3: 2170–2174.
- Ma Y, Wu X, Zhang G 2017. Core-shell Ag@Pt nanoparticles supported on sepiolite nanofibers for the catalytic reduction of nitrophenols in water: enhanced catalytic performance and DFT study, *Appl. Catal. B Environ.* 205: 262–270.
- Modirshahla N, Behnajady MA, Mohammadi-Aghdam S 2008. Investigation of the effect of different electrodes and their connections on the removal efficiency of 4-nitrophenol from aqueous solution by electrocoagulation, *J. Hazard. Mater.* 154: 778–786.
- O'Connor OA, Young LY 1989. Toxicity and anaerobic biodegradability of substituted phenols under methanogenic conditions, *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 853.
- Oturan MA, Peirotten J, Chartrin P 2000. Complete destruction of p-nitrophenol in aqueous medium by electro-fenton method, *Environ. Sci. Technol.* 34: 3474–3479.
- Pandey S, Mishra SB 2014. Catalytic reduction of p-nitrophenol by using platinum nanoparticles stabilised by guar gum, *Carbohydr. Polym.* 113: 525–531.
- Woo YT, Lai DY 2001. Aromatic amino and nitro-amino compounds and their halogenated derivatives *Patty's Toxicology*, Wiley, New York, p. 1.
- Zhao P, Feng X, Huang D, Yang G, Astruc D 2015. Basic concepts and recent advances in nitrophenol reduction by gold- and other transition metal nanoparticles, *Coord. Chem. Rev.* 287: 114–136.

## Sıçanlarda oluşturulan deneysel böbrek iskemisi/reperfüzyon hasarında akut agomelatin uygulaması koruyucu rol üstlenir mi?

Suat Tekin\*, Damla Aykora, Dilara Altay Öztürk, Mehmet Refik Bahar, Süleyman Sandal

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: suat.tekin@inonu.edu.tr

### Özet

Bir organa gelen kan akımının durmasına bağlı olarak doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. Hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açar. Bir melatonin (MT1/MT2) reseptör agonisti ve serotonin antagonisti olan Agomelatin'in antioksidan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma iskemiyeye bağlı olarak oluşan doku hasarında agomelatinin etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı. Çalışmada yaklaşık 250-300 gr ağırlığında 40 adet *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçan kullanıldı (n=40). Kontrol grubuna (KG) herhangi bir uygulama yapılmadı, Sham Grubuna (SG) böbrek dokusunda 1 saat iskemisi 24 saat reperfüzyon her iki böbreğe de uygulandı, uygulama gruplarına ise sham gruba uygulanan cerrahi uygulanmadan önce agomelatinin 20 ve 40 mg/kg'lık konsantrasyonu oral olarak verildi. 24 saat sonra sıçanlar dekapite edilerek kan dokuları toplandı ve kan dokuda BUN ve kreatin seviyesi ölçüldü. Uygulanan agomelatinin her iki konsantrasyonunun iskemiyeye bağlı olarak artan BUN ve kreatin seviyesinin azalttığı (p<0.05) belirlendi. Bu sonuçlar agomelatinin böbrek dokusunda iskemiyeye bağlı olarak hasarın azaltılmasında etkili olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Agomelatin, İskemi, Reperfüzyon, Oksidatif Stres

### Does acute agomelatin application play a protective role in experimental kidney ischemia / reperfusion injury in rats?

#### Abstract

Depending on the stopping of blood flow to an organ, tissue remains hypoxic and hypoxic tissue damage occurs. Decreases energy levels in the cell and accumulates toxic metabolites in the tissue. Agomelatin, a melatonin (MT1 / MT2) receptor agonist and serotonin antagonist, has been reported to have antioxidant effects. This study was carried out to investigate the effects of agomelatin on tissue damage due to ischemia. 40 *Sprague Dawley* male rats weighing approximately 250-300 g were used in the study (n = 40). No was applied to the control group (KG), the Sham Group (SG) was applied to both kidneys for 1-hour ischemia in kidney tissue for 1 hour, while the groups were given 20 or 40 mg / kg concentration of agomelatin before the surgery was applied to the sham group. After 24 hours, rats were decapitated and blood tissues were collected and blood and creatine levels were measured in the blood tissue. Both concentrations of agomelatin were determined to decrease BUN and creatinine levels due to ischemia (p <0.05). These results indicate that agomelatine may be effective in reducing the damage due to ischemia in kidney tissue.

**Keywords:** Agomelatine, Ischemia, Reperfusion, Oxidative Stress

### GİRİŞ

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler, organ transplantasyonu esnasında, süreli kesilmesi) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemisi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar (1) ve hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücre disfonksiyonu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır (2). İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemisi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (3). İskemi reperfüzyon hasarı dakikalardan saatlere varan gelişim sürecinin moleküler sinyal yolları perspektifinden tam olarak

açıklanamamış önemli bir patolojik fenomendir. Bir çalışmada pratik bakış açısından İ/R süreci 3 faza ayrılmıştır; Faz-1 hasarın oluşmasıyla saniyelerden dakikalara kadar gerçekleşen ve fosfolipaz aktivasyonun, intrasellüler kalsiyum, eikozanoidler, diğer lipit molekülleri, protein kinazlar, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve P-selectin gibi adhezyon moleküllerinin ön formlarının sebep olduğu değişikliklerin gerçekleştiği süreç. Faz-2: İ/R sonrası dakikalardan saatlere kadar geçen süreç olup inflamatuvar sitokinlerin (esas tümör nekroz faktörü- alfa, interlökin-1) protein sentezinin aktif transkripsiyonun gerçekleştiği ve memrandan kinazların aktive olacağı sitoplazmaya doğru sinyallerin gönderildiği ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu için çekirdeğe sinyallerin gönderilip inflamatuvar evrenin başladığı bölümüdür ve faz-3: birkaç saatten günlere kadar olan İ/R sürecidir ve moleküler kronik savunma mekanizmalarından IL-10 tipi anti-inflamatuvar sitokinlerin, geç adhezyon moleküllerinin ve diğer TGF-beta gibi diğer büyüme faktörlerinin ortaya çıkmasıyla ilişkili olan fazdır. Bu fazla birlikte İ/R nin moleküler süreci tamamlanmış olur (4). Farklı çalışmalar iskemik periyod sonrası reperfüzyonun birçok dokuda hasara sebep olduğunu göstermiş ve bu sürece iskemi/reperfüzyon hasarı denmiştir (5). İskemi ve reperfüzyon sırasında, oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi kalsiyum artışı ve membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması ile aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşur, bunlar oksidatif strese neden olur (6). Bir melatonin (MT1/MT2) reseptör agonisti ve serotonin 5-HT<sub>2C</sub> reseptör antagonisti (7) ve yapısal olarak melatonin homoloğu olan agomelatin gündüz sedasyonuna sebep olmadan antidepresan özellikleri ile beraber düzenli ve kaliteli uyku sağlayan özellikleri ile dikkat çekmektedir (8). Depresyon tanısı olan yetişkinlerin tedavisinde kullanılan agomelatinin ayrıca anksiyete bozukluğu ve duygu durum bozukluğu tedavisinde de etkinliği ispatlanmıştır (8). Diğer birçok antidepresana göre daha az yan etkisi olması ve uyku kalitesine katkıları göz önüne alındığında nöroprotektif etkisi de söz konusuysen agomelatinin akut ve kronik antioksidan etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan böbrek iskemi reperfüzyon hasarında agomelatinin serum BUN ve kreatin seviyeleri üzerindeki etkiyi araştırmak amacıyla yapıldı.

## **MATERYAL VE METOT**

Çalışmada yaklaşık 250-300 g ağırlığında *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçan kullanıldı (n=40). Sıçanlar üzerinde yapılan uygulamalar İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Deney süresince sıçanlar tekli kafeslerde 20±2 °C'de sıcaklıkta, uygun nemde ve 12 saat gece-gündüz döngüsü sağlanan ortamda barındırıldı. Tekli barınma koşulları ve kafes stresine alışması bakımından sıçanlar deneye başlamadan 5 gün önce tekli kafeslere alışması sağlandı.

### **Deney Gruplarının Oluşturulması:**

Hayvanlar rastgele atama yöntemine göre eşit olarak 4 gruba ayrıldı (n=10).

Grup1: Bu grup kontrol gurubu olup herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup2: Bu grup sham gurubu olup sıçanların böbrek dokusunda 1 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyona bağlı olarak hasar oluşturuldu.

Grup3: Sham grubuna uygulanan cerrahi uygulamaların tamamı bu gruptaki sıçanlara da uygulandı, cerrahi uygulama öncesi 20 mg/kg oral tek doz agomelatin uygulandı.

Grup4: Sham grubuna uygulanan cerrahi uygulamaların tamamı bu gruptaki sıçanlara da uygulandı, cerrahi uygulama öncesi 40 mg/kg oral tek doz agomelatin uygulandı.

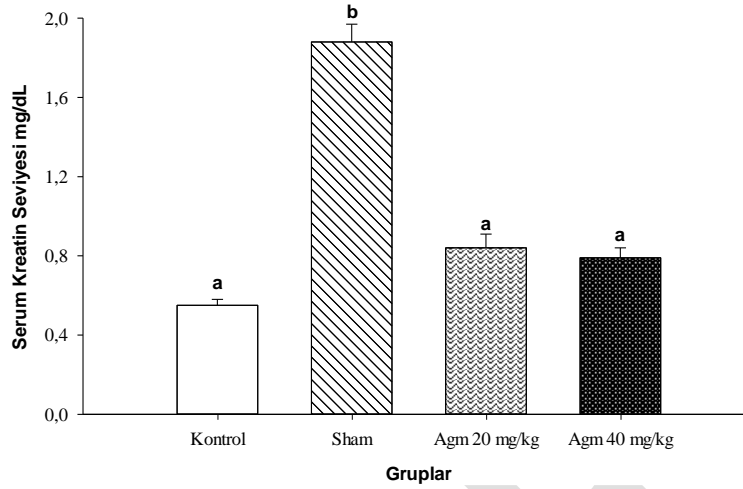
Deney bitiminde sıçanlara ötanazi uygulandı ve kan dokuları toplandı, toplanan kanlar serumlarına ayrıldı ve ELISA yöntemiyle grupların BUN ve kreatin seviyeleri ölçüldü.

### **Verilerin İstatistiksel Analizi:**

Analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 for Windows paket programı kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk Shapiro Wilk testi ile incelendi, nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Önemli farklılık belirlendiğinde çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

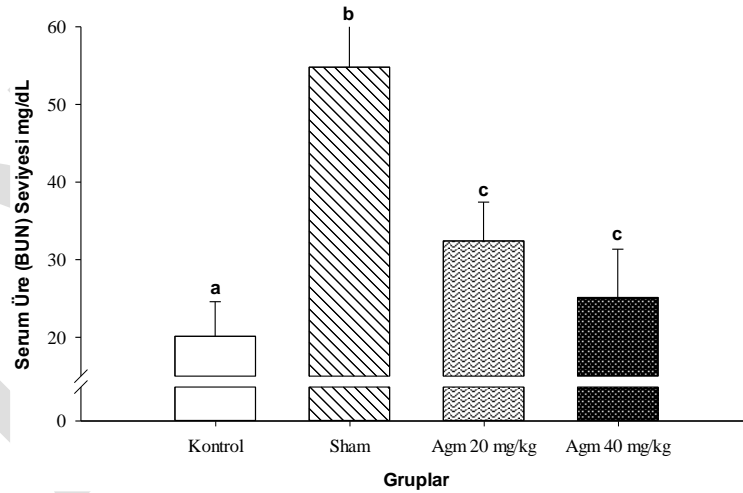
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Agomelatin uygulamasının serum kreatin seviyesi üzerindeki etkileri Şekil 1’de sunulmuştur. İskemiye bağlı olarak artan serum kreatin seviyesinin agomelatin uygulamasına bağlı olarak azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ).



**Şekil 1.** Deney ve uygulama gruplarının serum kreatin düzeyleri. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort. ± SS olarak ifade edildi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir;  $a,b,c,p<0.05$ )

Agomelatin uygulamasının serum üre (BUN) seviyesi üzerindeki etkileri Şekil 2’de gösterilmiştir. İskemiye bağlı olarak artan serum BUN seviyesinin agomelatin uygulamasına bağlı olarak azaldığı belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 2.** Deney ve uygulama gruplarının serum BUN düzeyleri. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort. ± SS olarak ifade edildi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir;  $a,b,c,p<0.05$ )

## SONUÇ

Tüm bu sonuçlar agomelatinin iskemiye bağlı olarak böbrek dokusunda oluşan hasarı azalttığını göstermektedir. Mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik yapılacak ek deneyler agomelatinin böbrek dokusunda nasıl bir fizyolojik yolak üzerinden etki ettiğini açıklayabilmek adına oldukça önemlidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi BAP (Proje no: TYL-2019-1762) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Enver, O., Leyla, K., Tansel, S. (2004). Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostaglandin E1 (PGE1) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ
2. Önal, A., Astarçioğlu, H., Örmen, M., Atila, K., Sarıoğlu, S. (2004). Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi, Ulus Travma Derg, 10(3):160-167
3. Şener, G., Yeğen, B.Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı, akt: Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr, 1990; 137:1-53.
4. Toledo-Pereyra, L.H., Toledo, A.H., Walsh, J., Lopez-Neblina, F. (2004). Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. Experimental and Clinical Transplantation, 2: 174-177.
5. Küçük, A., Yücel, M., Erkasap, N., Tosun, M., Köken, T., Özkurt, M., Erkasap, S. (2012). The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats, Molecular Biology Reports, Volume 39, Issue 10, pp 9775–9782.
6. Paller, M.S., Hoidal, J.R., Ferris, T.F. (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat, The Journal of Clinical Investigation; 74(4), 1156-1164.
7. Jia, P., Liu, C., Wu, N., Jia, D. & Sun, Y. (2018). Agomelatine protects against myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. American Journal of Translational Research, 10:5, 1310-1323.
8. Green, B. (2011). Focus on agomelatine, Current Medical Research and Opinion Journal, 27:4, 745-749.

## Functionalized graphene supported transition metal (0) nanoparticles: effective catalysts for the catalytic reduction of thioflavin-T in water

Rahel YILDIRIM, Yaşar KARATAŞ, Mehmet GÜLCAN\*

Chemistry Department, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Zeve Campus 65080 Van, Turkey.

\*mehmetgulcan@yyu.edu.tr

### Abstract

In this study, we report our results on the ex-situ generation of transition metal (0) nanoparticles supported on functionalized graphene and their notable catalytic performance in terms of the activity, lifetime and reusability in the catalytic reduction of thioflavin-T in water at room temperature under air. The catalytic reduction of thioflavin-T was monitored using UV-vis spectrophotometer and these new metal (0) nanoparticles were characterized by advanced techniques.

**Keywords:** Functionalized graphene, Nanoparticles, Reduction, Thioflavin-T, Transition metal.

### INTRODUCTION

Water pollution with organic dyes has become a serious environmental pollution and poses serious threats to the aquatic ecosystem [Ali, 2012]. Most organic dyes are considered potential carcinogens that can lead to health risks, while at least 15% annually produces large quantities of 700,000–1,000,000 tons of paint, including discharge from printing, textiles, paper, paint, plastics, leather, food and other industries [Dojčinović et al., 2011]. Meanwhile, even very low concentrations of dye in the water absorb intensely sunlight and thus prevent the penetration of sunlight into the water to support the photosynthesis of life in the water, and finally prevent the ecological balance in the water ecosystem [Ji et al., 2015]. Various technologies have been used to remove these dyes, including physical, chemical and biological methods. However, most of them are often very expensive and also produce large amounts of sludge, which calls for further disposal. Therefore, a cost-effective method to remove dyes is required to solve these urgent color water pollution problems [Wang et al., 2017].

Thioflavin-T is a cationic benzothiazole dyestuff, also known as basic yellow (Fig. 1). It shows a large increase in fluorescence in the presence of amyloid fibrils [Maskevich et al., 2007]. As is known, the binding of proteins to regular, fibrous structures known as amyloid fibrils and the accumulation and storage of such aggregates in organism tissues, neurodegenerative Alzheimer's and Parkinson's diseases, cataracts, and the like. causes a number of serious diseases such as [Selkoe, 2003]. Thioflavin dye is used for the determination of biological structures in tissues and proteins. Although the mechanistic background of this fluorescence increase is not completely clear, it has been speculated that inhibited rotation around the benzothiazole-dimethylaniline axis is a determining factor in limited environments [Kumar, 2008]. However, it is known that thioflavin-T interacts with DNA [Ilanchelian and Ramaraj, 2004]. Thioflavin-T shows an absorption band at 412 nm and a dense emission band at 450 nm in buffer (pH 8) solution. In a study, dimer thioflavin-T formation was observed in aqueous solution at low temperatures and showed an increase in the intensity of the absorption bands at 364 and 460 nm caused by dimer thioflavin-T.

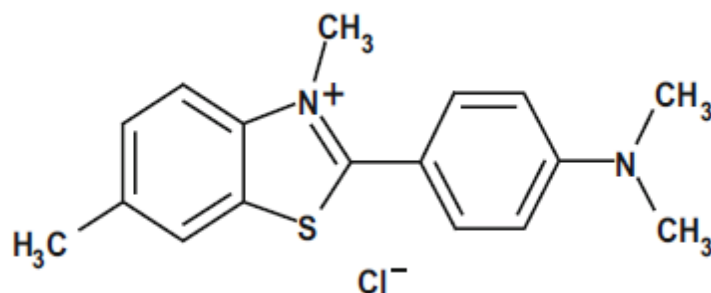


Fig. 1. The chemical structure of thioflavin-T

## MATERIALS and METHODS

### Synthesis of Sulphonated Reduced Graphene Oxide (rGO-SO<sub>3</sub>H)

150 mg GO was taken into 150 mL of water and sonicated in an ultrasonic bath for 30 minutes. 1.2 g of NaBH<sub>4</sub> dissolved in 30 mL of water was added dropwise to the obtained dispersion mixture, and the gas evolution was complete (until reduction was complete). The pH of the reduced mixture is measured and, if necessary, dropwise addition of 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution will be adjusted to pH 9-10 and the pH adjusted solution is stirred at 80 °C for 1 hour. After this time, the black mixture was filtered and washed with distilled water (3x20 mL) and then dried in a vacuum oven. The dried reduced graphene oxide (rGO) was dispersed in 150 mL of purified water with the aid of an ultrasonic bath to ensure good dispersion and the mixture was placed in the water bath. RGO-pure water in the water bath at 0 °C diazonium salt solution (sulfanilic acid, 1 N HCl and 10 mL of purified water) will be added gradually, and after addition, the mixture is stirred at room temperature overnight. The resulting mixture was filtered, washed with distilled water (3 x 20 mL) and dried in a vacuum oven set to 80 °C (Fig. 2).

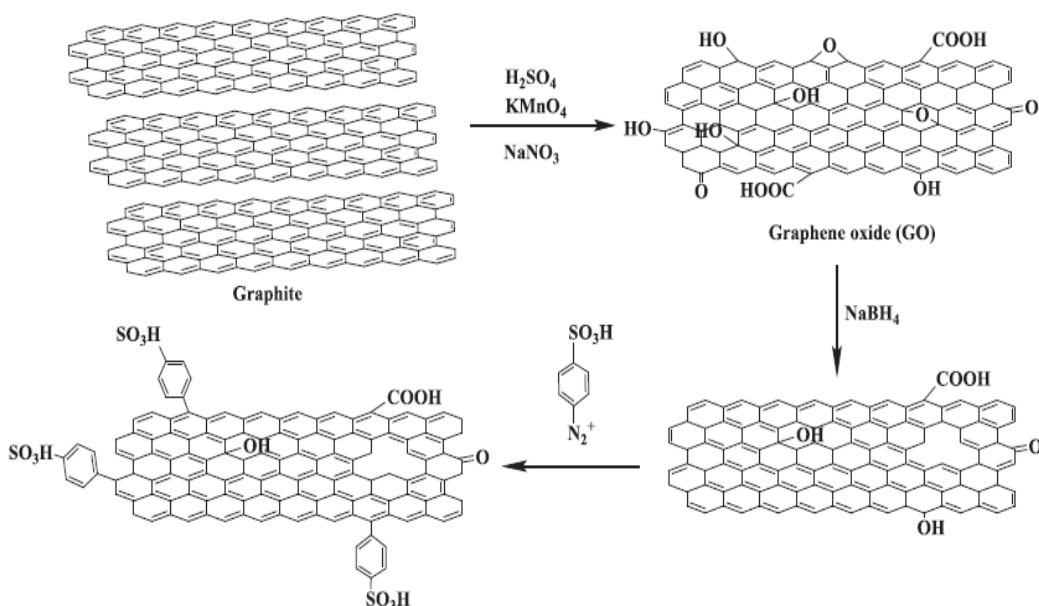


Fig. 2. Sulphonated reduced graphene oxide synthesis protocol

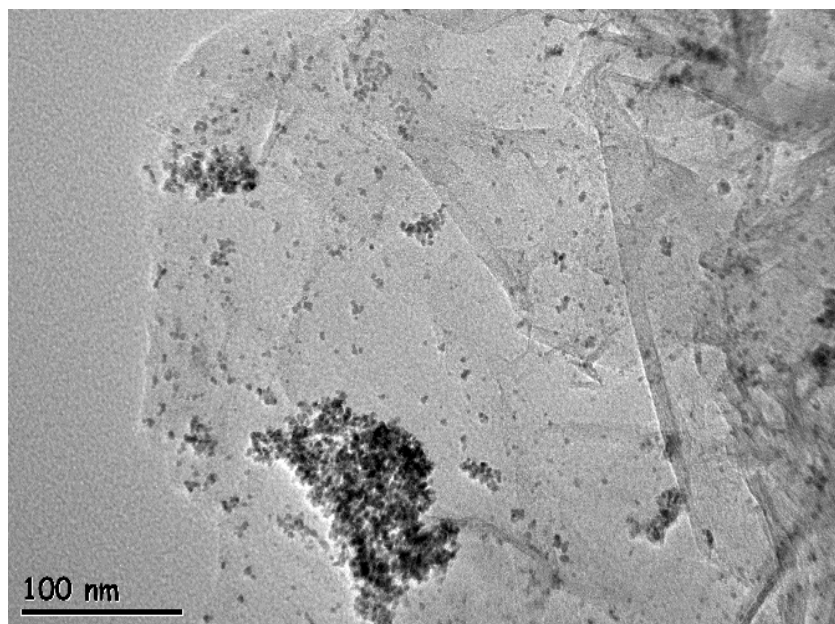
### Preparation of Sulphonated Reduced Graphene Oxide Supported Ag (0) Nanoclusters and Investigation of Catalytic Performance in The Catalytic Reduction of Thioflavin-T

Aqueous solution of thioflavin-T to be used in the study was prepared and placed in a jacketed Schlenk adjusted to room temperature. The mixture was stirred for 15 minutes to achieve thermal equilibrium. While the catalytic reaction is going on, samples will be taken from the reaction vessel and diluted at certain time intervals and the conversion efficiency of thioflavin-T is analyzed by Shimadzu UV-3600 UV-vis spectrophotometer in our laboratory. The absorption spectra were calculated using the characteristic absorption peak (412 nm) of thioflavin-T. Thioflavin-T concentration was calculated using a calibration curve generated by the absorbance of standard solutions.

## RESULTS

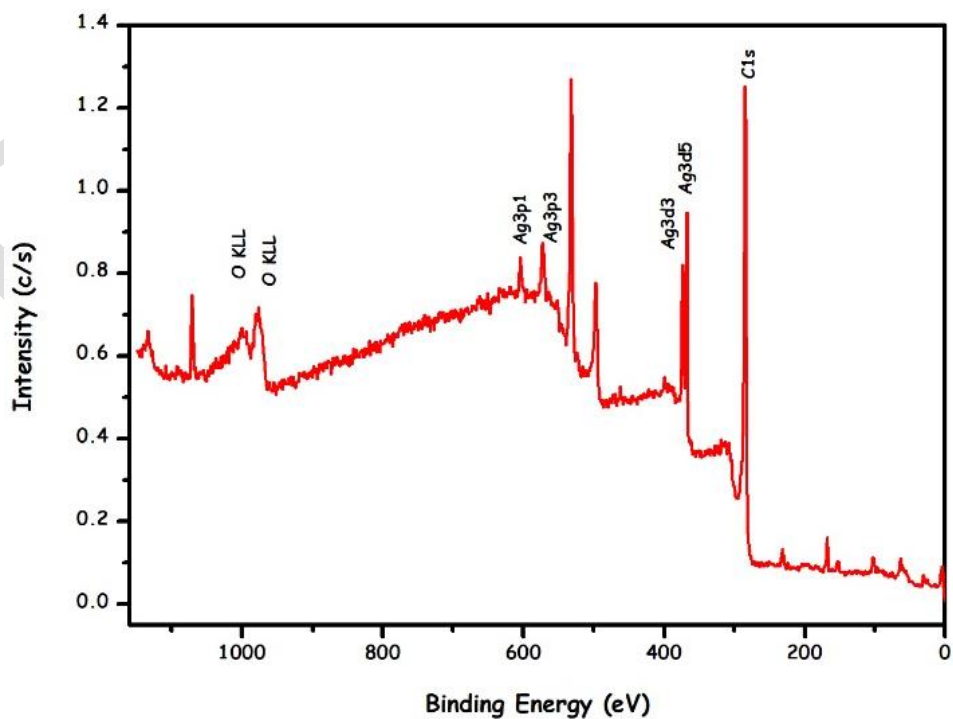
The morphology and particle size distributions of GO-SO<sub>3</sub>H supported Ag(0) nanoclusters were characterized by transmission electron microscopy (TEM). Fig. 3 shows TEM image in 100 nm scale of the Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst obtained by reduction of thioflavin-T under in-reaction conditions. From this images, it is understood that Ag (0) nanoclusters are distributed over the surface of GO-SO<sub>3</sub>H.





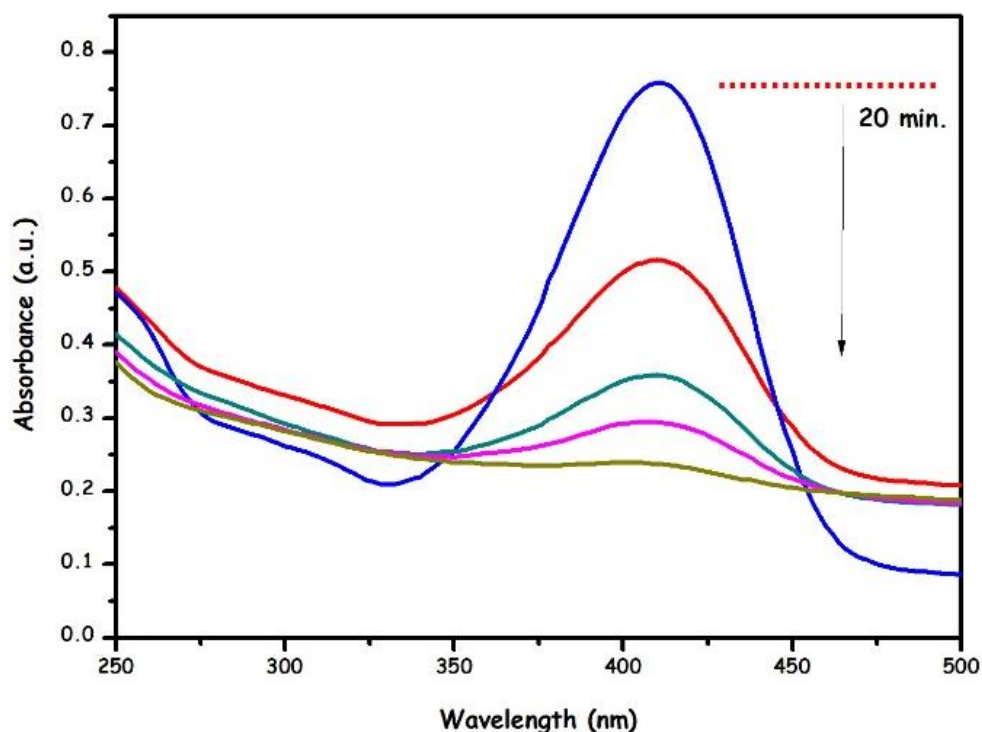
**Fig. 3.** TEM images of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst obtained by reduction of thioflavin-T under reaction conditions

XPS analysis was performed to determine the elemental composition of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst and oxidation step of Ag metal. In Fig. 4, the XPS spectrum in the general scanning mode shows the presence of elements C, O and Ag in the nanocatalyst.



**Figure 4:** Survey XPS spectra of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst.

Thioflavin-T; A model for the test reaction was selected to examine the catalytic performance in reduction in the presence of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst. Thioflavin-T shows the strongest absorption band in aqueous solution at 412 nm wavelength. Thus, kinetic parameters related to monitoring the change of the absorption peak can be obtained. In the absence of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst, the absorption peak of thioflavin-T was found to be unchanged. These results showed that the self-reduction of Thioflavin-T did not occur. However, in the presence of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst, the catalytic reduction of thioflavin-T is completed in as little as 20 minutes. (Fig. 5).



**Fig. 5.** UV-Vis spectra for reduction of Thioflavin-T in aqueous solution at room temperature in the presence of Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst

## CONCLUSION

- The Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst was prepared in a reproducible manner by affixing the Ag (I) cation to the sulphonated reduced graphene oxide surface by the conventional wet-impregnation method and prepared in aqueous medium and at 298 K, in the presence of Thioflavin-T. It has been found to be an active and cost-effective nanocatalyst for catalytic reduction of Thioflavin-T.
- The Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst was characterized in detail using advanced analytical and spectral methods such as ICP-OES, XPS, TEM.
- The catalytic activity of the Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst was tested for efficacy and stability in the catalytic reduction of Thioflavin-T in aqueous solution under moderate conditions. Finally, the Ag@GO-SO<sub>3</sub>H nanocatalyst was found to be a highly active nanocatalyst in the catalytic reduction of thioflavin-T.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Van YYU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project ID: FBA-2019-7791).

## REFERENCES

- Ali I 2012. New Generation Adsorbents for Water Treatment. *Chem. Rev.* 112, 5073–91.
- Dojčinović BP, Roglić GM, Obradović BM, Kuraica M.M, Kostić M.M, Nešić J, Manojlović DD, 2011. Decolorization of reactive textile dyes using water falling film dielectric barrier discharge. *J. Hazard. Mater.* 192, 763–71.
- Ilanchelian M, Ramaraj R, 2004. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNAJ. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 162, 129–37.
- Ji K, Deng J, Zang H, Han J, Arandiyana H, Dai H, 2015. Fabrication and high photocatalytic performance of noble metal nanoparticles supported on 3DOM InVO<sub>4</sub>–BiVO<sub>4</sub> for the visible-light-driven degradation of rhodamine B and methylene blue. *Appl. Catal. B* 165, 285–95.
- Kumar S, Singh A.K, Krishnamoorthy G, Swaminathan R, 2008. Thioflavin T Displays Enhanced Fluorescence Selectively Inside Anionic Micelles and Mammalian Cells. *J. Fluoresc.* 18, 1199-205.
- Maskevich A.A, Stsiapura V.I, Kuzmitsky V.A, Kuznetsova I.M, Povarova O.I, Uversky V.N, Turoverov K.K, 2007. Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form. *J. Proteome Res.* 6, 1392.
- Selkoe D.J, 2003. Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426, 900-4.
- Wang N, Hu Y, Zhang Z, 2017. Sustainable catalytic properties of silver nanoparticles supported montmorillonite for highly efficient recyclable reduction of methylene blue. *Appl. Clay Sci.* 150, 47–55.

## Efficient removal of radioactive uranium from aqueous solutions using high surface area metal-organic framework: UTSA-76

Mehmet Öztürk, Özlem Selçuk Zorer\*, Mehmet Gülcan\*

Chemistry Department, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Zeve Campus 65080 Van, Turkey.

\*selcukozlems@gmail.com; mehmetgulcan@yyu.edu.tr

### Abstract

In this study, firstly, structural / morphological characteristics of UTSA-76 MOF structure which constitutes a very important class of porous materials were examined in accordance with the literature. Then, the adsorption properties of UTSA-76 with porous structure and large surface area in the removal of uranium (VI) cation from aqueous solutions was investigated. After the spectroscopic and morphological characterizations adsorption behavior of uranium ions on the UTSA-76 MOF structure. Temperature, pH, mixing time and solution concentration parameters were observed to determine optimum uranium adsorption conditions on MOF structure. The adsorption capacity of the uranium ion was determined and the kinetic, equilibrium and thermodynamic parameters were calculated and adsorption results were applied to different adsorption isotherm models.

**Keywords:** Adsorption, Metal-organic framework, UTSA-76, Uranium.

### INTRODUCTION

In the near future, the shortage of traditional energy resources and increasing energy security issues and long-term sustainable energy supply are considered as one of the most serious challenges facing human society. Given the various environmental concerns associated with the burning of fossil fuels such as global warming, pollution and loss of biodiversity, demand for alternative energy sources such as hydropower, nuclear, geothermal, solar and wind energy has gained great importance in both science and technology. Among these energy sources, nuclear energy has been considered as an effective cost-effective technology and hence the need for uranium raw material in the nuclear industry has been increased [Li et al., 2016; Dresselhaus and Thomas, 2001]. Meanwhile, as a naturally occurring stable heaviest element, a certain amount of uranium is dissolved in the oceans, and it is estimated that this soluble uranium is 1000 times greater than land. As a result of this, significant opportunities for the development of versatile and new materials have emerged to separate and recover the predominantly uranium (VI) form of uranium in aqueous media. As a result, the development of new adsorbent materials, including various porous materials for uranium (VI) removal, has received great interest in recent years [Ku et al., 1977; Verma and Dutta, 2015].

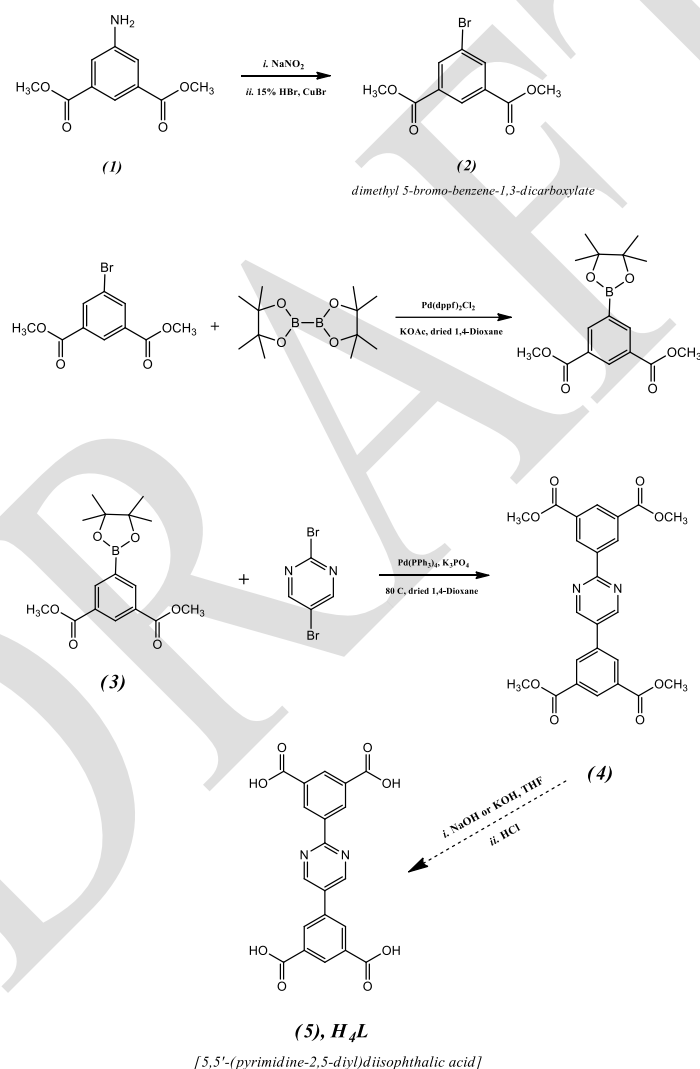
Uranium is known as one of the most dangerous contaminants due to its chemical toxicity and radioactive nature [Stalder et al., 2012]. In addition to natural resources, various human activities, such as mining, nuclear power generation, military activities and uranium-containing phosphate fertilizers, are seen as the main source of uranium spreading to the environment [Nriagu et al., 2012]. Uranium has four different oxidation steps, usually represented by  $U^{3+}$ ,  $U^{4+}$ ,  $UO_2^+$  (5+) and  $UO_2^{2+}$  (6+). Due to its high chemical reactivity, uranium can easily react with other elements to form complexes of different structures. The major uranyl cation readily reacts with various anions such as hexavalent uranium, carbonate, phosphate, sulfate, chloride and fluoride as  $UO_2^{2+}$ . In low pH (pH <5) aqueous solutions, when the uranyl ion is very stable, when the pH is close to 7, the uranyl ion reacts with phosphate and carbonate anions to form stable complexes. In particular, uranyl carbonate complexes containing  $UO_2(CO_3)_2^{2-}$  and  $UO_2(CO_3)_3^{4-}$  are known as predominant anion species for drinking water sources with pH values of 7 to 10 [Katsoyiannis and Zouboulis, 2013]. Uranyl cation ( $UO_2^{2+}$ ) is known as a very strong Lewis acid [Shakur et al., 2017]. Therefore, it shows high affinity to groups carrying strong donor (electron donor) atoms. Consequently, the fact that the materials used in uranium adsorption carry such groups of groups makes the adsorbent material more selective and highly efficient. When the metal-organic lattice compounds, which are briefly summarized above, are used for the removal of radioactive uranium by adsorption from aqueous solutions, it is seen that some of them are materials according to this theory. In this context, in the proposed project work, the structural and morphological properties of the UTSA-76 coded MOF structures which are metal-organic lattice materials and which contain Lewis basic groups are summarized above will be examined. It is anticipated that said

MOF structures containing Lewis basic groups may be an effective and selective adsorbent material by strongly interacting with the uranium (VI) cation, which is considered to be a strong Lewis acid, soluble in waste water.

## MATERIALS and METHODS

### Synthesis of Organic Linker (H<sub>4</sub>L) and UTSA-76 MOF Structure

Synthesis of H<sub>4</sub>L (5,5-(pyrimidine-2,5-diyl)diisophthalic acid) organic binding molecule to be used in the synthesis of the UTSA-76 MOF structure; a series of chemical reactions (see *Scheme 1*). For UTSA-76 synthesis; organic linker H<sub>4</sub>L (15.0 mg, 0.037 mmol) and Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (30.0 mg, 0.129 mmol) in 8 mL of solvent mixture (DMF/MeCN/H<sub>2</sub>O, 6/1/1, v/v) into a capped vial with a volume of 20 mL. Then, 50 μL of 37% HCl will be added to this mixture and the vial should be closed and the oven will be heated to 80 °C for 24 hours. At the end of this period, the mixture obtained will be filtered off after cooling to room temperature and washed several times with DMF, and then the UTSA-76 MOF structure of the formula [Cu<sub>2</sub>L(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>·5DMF·3H<sub>2</sub>O have been synthesized [Li et al., 2014].



**Scheme 1.** Synthesis protocol of H<sub>4</sub>L organic linker

## U(VI) Adsorption Studies On UTSA-76 MOF Structure

The uranium adsorption study on UTSA-76 adsorbent from the solution medium was carried out by using the batch method in a multi-magnetic stirrer heater. The uranium acetate solutions at different concentrations and pHs were contacted with UTSA-76 at different temperatures for varying periods. For pH adjustment, CH<sub>3</sub>COOH and NaOH solutions were used. At the end of the adsorption process, uranium solutions with adsorbent were separated by filtration with filter paper. Arsenazo-III method was applied spectrophotometrically for the amount of uranium remaining in solution medium.

The amount of adsorbed uranium was calculated from the difference between initial and equilibrium concentration; The amount of adsorbed uranium per adsorbent  $q_e$  (mg/g), adsorption percentage (%), and dissolution coefficient  $K_d$  (mL/g) were determined using the following formulas.

$$q_e = \frac{(C_i - C_e) \cdot V}{m} \quad (\text{mg/g})$$

$$\% \text{ Ads. Verimi} = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100$$

$$K_d = \frac{m_i - m_s}{m_s} \times \frac{V}{m} \quad (\text{mL/g})$$

Equality in;  $C_i$  is the starting ( $C_e$ ) concentration of U (VI) at equilibrium (mg/L);  $m_i$  is the amount of U (VI) present in the medium initially ( $\mu\text{g}$ ), the amount of U (VI) remaining in the solution after the adsorption of  $m_s$  ( $\mu\text{g}$ );  $V$  solution volume (mL);  $m$  indicates the amount of adsorbent (g).

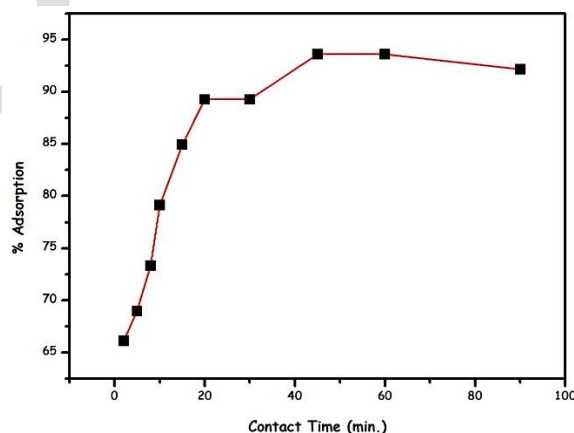
## RESULTS

Uranium ion adsorption onto UTSA-76; The effects of contact time, temperature, pH and initial concentration parameters were investigated. In Table 1, the optimum parameter values obtained in the adsorption studies of uranium and thorium ions on UTSA-76 are given.

**Table 1:** Optimum parameter values

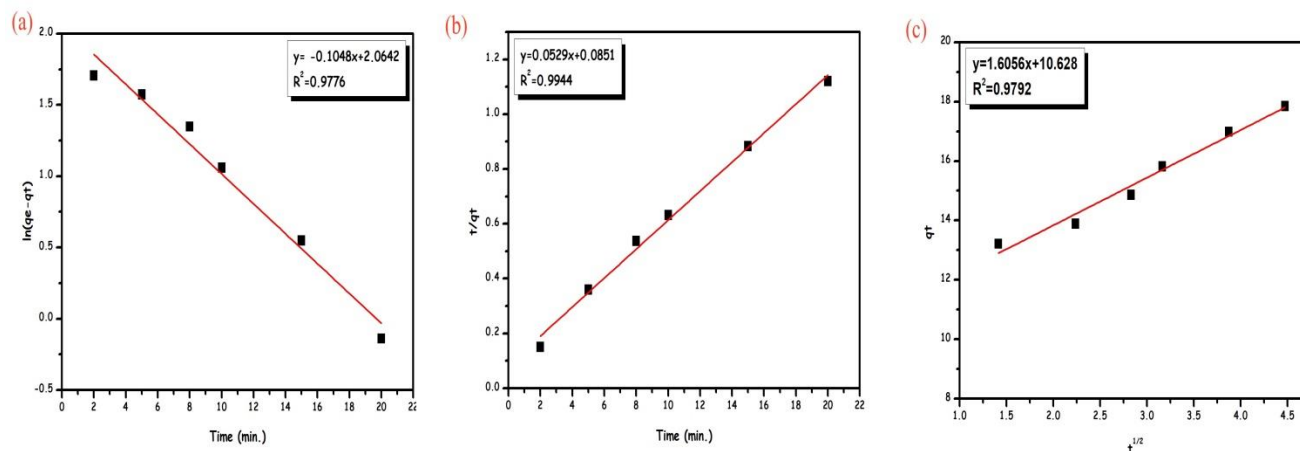
Contact Time (min.)	pH	Temperature (°C)	initial Con. (mg/L)
45	5.0	30	12

UTSA-76 adsorption of uranium ions on the adsorption study of the parameters affecting the optimum conditions; contact time was 45 min, pH 5.0, temperature 30 °C and initial concentration 12 mg /L.



**Figure 1:** Effect of contact time on adsorption of uranium on UTSA-76

## Adsorption Kinetics



**Figure 2:** Pseudo first order (a) and pseudo first order (b) adsorption kinetics for uranium ions (c) in-particle diffusion model.

Since  $R^2$  is closer to 1 in 2<sup>nd</sup> degree kinetics, adsorption proceeds through 2<sup>nd</sup> degree kinetics. The values of  $q_{e1} = 7.82$  and  $q_{e2} = 18.9$  are based on the kinetics that are close to  $q_e = 18.72$  (2<sup>nd</sup> degree kinetic). The linear graph of intraparticle diffusion indicates the presence of intraparticle diffusion in adsorption. The fact that the line does not pass through the origin indicates that it can control the adsorption rate in other kinetic models. The parameter values of the intraparticle diffusion model were obtained as  $R^2 = 0.972$ ,  $K_{id} = 1.6056$  mg/g. dk<sup>1/2</sup>, I = 10.628.

## CONCLUSION

As a result, in this study, the UTSA-76 adsorbent in the MOF structure carries pyrimidine groups which are described as basic groups, high surface area (BET surface area 2820 m<sup>2</sup>/g) and large pore volume (1.09 cm<sup>3</sup>/g) uranium adsorption as a material having a high adsorption capacity.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Van YYU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project ID: FBA-2018-7108).

## REFERENCES

- Dresselhaus MS, Thomas IL 2001. Alternative Energy Technologies, *Nature*, 414: 332–7.
- Katsoyiannis IA, Zouboulis AI 2013. Removal of uranium from contaminated drinking water: A mini review of available treatment methods, *Desalin. Water Treat.* 51: 2915–25.
- Ku T, Knauss KG, Mathieu GG 1977. Uranium in open ocean: Concentration and isotopic composition, *Deep-Sea Res.* 24: 1005–17.
- Li B, Wen, H-M, Wang H, Wu H, Tyagi M, Yildirim T, Zhou W, Chen B 2014. A porous metal–organic framework with dynamic pyrimidine groups exhibiting record high methane storage working capacity, *J Am. Chem. Soc.* 136: 6207-6210.
- Li L, Ma W, Shen S, Huang H, Bai Y, Liu H 2016. A Combined experimental and theoretical study on the extraction of uranium by amino-derived metal–organic frameworks through post-synthetic strategy, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8: 31032–41.
- Nriagu J, Nam DH, Ayanwola TA, Dinh H, Erdenechimeg E, Ochir C, Bolorma TA 2012. High levels of uranium in groundwater of Ulaanbaatar, Mongolia, *Sci. Total Environ.* 414: 722–6.

- Shakur HR, Saraee KRE, Abdi MR, Azimi G 2017. Influence of monovalent cations and CuO nanoparticles on X-nanozeolite in uranium anionic species separation from contaminated drinking water, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25: 782–92.
- Stalder E, Blanc A, Haldimann M, Dudler V 2012. Occurrence of uranium in Swiss drinking water, *Chemosphere*, 86: 672–9.
- Verma S, Dutta RK 2015. A facile method of synthesizing ammonia modified graphene oxide for efficient removal of uranyl ions from aqueous medium, *RSC Adv.* 5: 77192–203.

DRAFT



## Orman yönetiminde insansız hava aracı uygulamaları

Ender Buğday<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: enthere@gmail.com

### Özet

Uydu ve hava araçları yardımıyla elde edilen görüntüler, uzaktan algılama teknikleriyle dönüştürüldükten sonra ormancılıkta çeşitli alt faaliyet dallarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu kullanılan araçlara İnsansız Hava Araçları (İHA) da eklenmeye başlamıştır. İHA, diğerlerine oranla düşük maliyetlerle elde edilmesi ve pratik kullanımı sayesinde karşılaşılan problemlere uygun ve hızlı çözümler getirmektedir. Ormancılık çalışmalarında izleme, yönetme ve karar verme süreçlerinde İHA'lerden elde edilen veriler kullanılabilir. Bu çalışmanın amacı, her geçen gün yaygınlaşan İHA kullanımının Türkiye ve dünya literatüründe zamansal ve mekansal olarak nasıl bir seyir içerisinde olduğunu, hangi alanlarda kullanıldığını ve orman yönetiminde yaygın olarak hangi alanlarda tercih edildiğini ortaya koymaktır. Bu çalışmada, Scopus ortamında İHA kullanımı ile ilgili anahtar yapılar kullanılarak (drone forestry, UAV forestry, UAS forestry, and aircraft forestry) 2007 ile 2019 yılları arasında üretilen çalışmaların ülkelere (ilk 10 ülke ve Türkiye şeklinde), yıllara, çalışma yapılan bilim alanına ve üretilen yayın tipine göre dört farklı başlık altında gruplanarak ifade edilmiştir. Toplam 1265 esere ulaşılmış ve "UAV" ve "Forestry" ikili anahtar kelime kullanımının diğerlerine oranla (596 adet) sayıca yaygın kullanıldığı görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, İHA kullanımının ormancılık sektörü içerisinde potansiyeli ortaya konularak sektörün geliştirilmesine yönelik çeşitli öneriler sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ormancılık, insansız hava aracı, drone.

### Applications of unmanned aerial vehicle in forest management

#### Abstract

The images obtained with the help of satellite and air vehicles are widely used in various sub-activities in forestry after being transformed by remote sensing techniques. Recently unmanned aerial vehicles (UAVs) have been added to these vehicles. UAV provides fast and convenient solutions to the problems encountered due to its low cost and practical use. In forestry studies, data obtained from UAVs can be used in monitoring, managing and decision-making processes. The aim of this study is the use of Turkey and world literature UAV widespread with each passing day, the temporal and the spatial how in a course, what areas it is used and forest management widely to reveal which areas are preferred. In this study, Scopus environment UAV using key structures associated with the use (drone forestry, UAV forestry, UAS forestry, and aircraft forestry) of works produced between 2019 and 2007, the country (in the form of the top 10 countries, and Turkey), the year the work done by the field of science and According to the type of publication produced are expressed under four different headings. A total of 1265 items were reached and UAV and Forestry double keywords were widely used in comparison to others (596). Also, in this study, various suggestions are presented for the development of the sector by revealing the potential of the use of UAV within the forestry sector.

**Keywords:** Forestry, unmanned aerial vehicle, drone.

### GİRİŞ

Ormancılık çalışmaları geniş bir yelpazede yürütülen uzun vadeli ve zor şartları bünyesinde barındıran faaliyetlerdir (Şafak ve Gül, 2012). Planlama, karar verme ve yönetim aşamalarından oluşan bu faaliyetlerin gerçekleştirilmesinde önemli bir bilgi ihtiyacı bulunmaktadır (Eker ve Özer, 2015; Buğday, 2016). Geçmişten bu yana uydu ve hava araçları ile elde edilen görüntüler ormancılık alanında yarayışlı bilgiye dönüştürülerek yaygın olarak kullanılmaktadır (Çakır ve ark., 2005). Çeşitli meteorolojik olumsuz şartlar nedeniyle her an bilgiye ulaşmak veya elde etmek imkanı dahilinde olmamaktadır (Arıca ve ark., 2007). Bu alanda pratik açıdan uygulama kolaylığı bulunduğundan dolayı insansız hava araçları (İHA) yarayışlı fırsatlar sunmaktadır (Buğday, 2018; Şahin,

2018). Kolay uygulanması, hızlı dönüş alınması ve özellikle çalışmaya göre rahat kullanım özgürlüğü sağlaması İHA tabanlı araçların ilerleyen dönemlerde de artan bir ivmeyle yaygınlaşacağına bir göstergesi olarak görülebilir.

İHA geçmişten günümüze özellikle uluslararası alanda ve çeşitli ortamlarda çalışma konusu olmuştur. Bunların genellikle ilk çıkış noktaları İHA'ların sektörlerde kullanımı, İHA koordinasyon yazılım ve kodlamaları şeklinde görülmektedir (Vincent and Rubin, 2004). Günümüze gelindiğinde bilgisayar bilimleri, mühendislik, yeryüzü bilimleri, ziraat ve ormancılık vs. çeşitli sektörlerde yayın yapan dergilerde sıklıkla çalışmalarda kullanılan bir araç haline gelmiştir.

Ormancılık faaliyetleri içerisinde drone ve benzeri araçlar çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları: Ormanların haritalanması (Tang ve Shao, 2015; Buğday, 2018), Orman envanter çalışmaları (Wallace ve ark., 2012), 3 boyutlu harita yapımı (Nex ve Remondino, 2014), Orman yangınları ile mücadele (Zhao ve ark., 2018), Orman zararlıları ile mücadele (Dash ve ark., 2018) ve Yaban hayatı takibi (Linchant ve ark., 2015) vb. şeklinde sıralanabilir.

Bu çalışmanın amacı, her geçen gün yaygınlaşan İHA kullanımının Türkiye ve dünya literatüründe zamansal ve mekansal olarak nasıl bir seyir içerisinde olduğunu, hangi alanlarda kullanıldığını ve orman yönetiminde yaygın olarak hangi alanlarda tercih edildiğini ortaya koymaktır.

## **MATERYAL VE METOT**

Bu çalışmada, Scopus (SCOPUS, 2019) ortamında İHA kullanımı ile ilgili anahtar yapılar kullanılarak (drone forestry, UAV forestry, UAS forestry ve aircraft forestry) 2007 ile 2019 yılları arasında üretilen çalışmaların ülkelere (ilk 10 ülke ve Türkiye şeklinde), yıllara, çalışma yapılan bilim alanına ve üretilen yayın tipine göre dört farklı başlık altında gruplanarak ifade edilmiştir.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular gruplanarak başlıklar halinde sırasıyla sunulmuştur.

### **Aircraft and forestry**

Yıllara göre; "Aircraft and forestry" taraması sonucunda Scopus veri tabanında Şekil 1a'da görüldüğü üzere artan bir trend bulunmaktadır. 2019 yılı şubat ayı itibariyle yapılan taramada yaklaşık 15 adet yayının olduğu görülmektedir. Yayın türüne göre; yapılan sorgulamada, bu yayınların büyük çoğunluğunun (%55.2) makale türünde, %39.9'unun tebliğ ve %4.9'ünün ise diğer yayın türlerinde yayımlanan eserlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 1b). Çalışma yapılan bilim alanına göre; eserler mühendislik, bilgisayar bilimleri, yeryüzü bilimleri ve tarım-orman alanında yaygın olarak yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 1c). Ülke bazlı yapılan taraya göre; Amerika Birleşik Devletleri'nin birinci sırada, Çin'in ikinci ve İspanya'nın ise üçüncü sırada olduğu, Türkiye'nin ise bu alanda geliştirilebilir bir durum sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 1d).

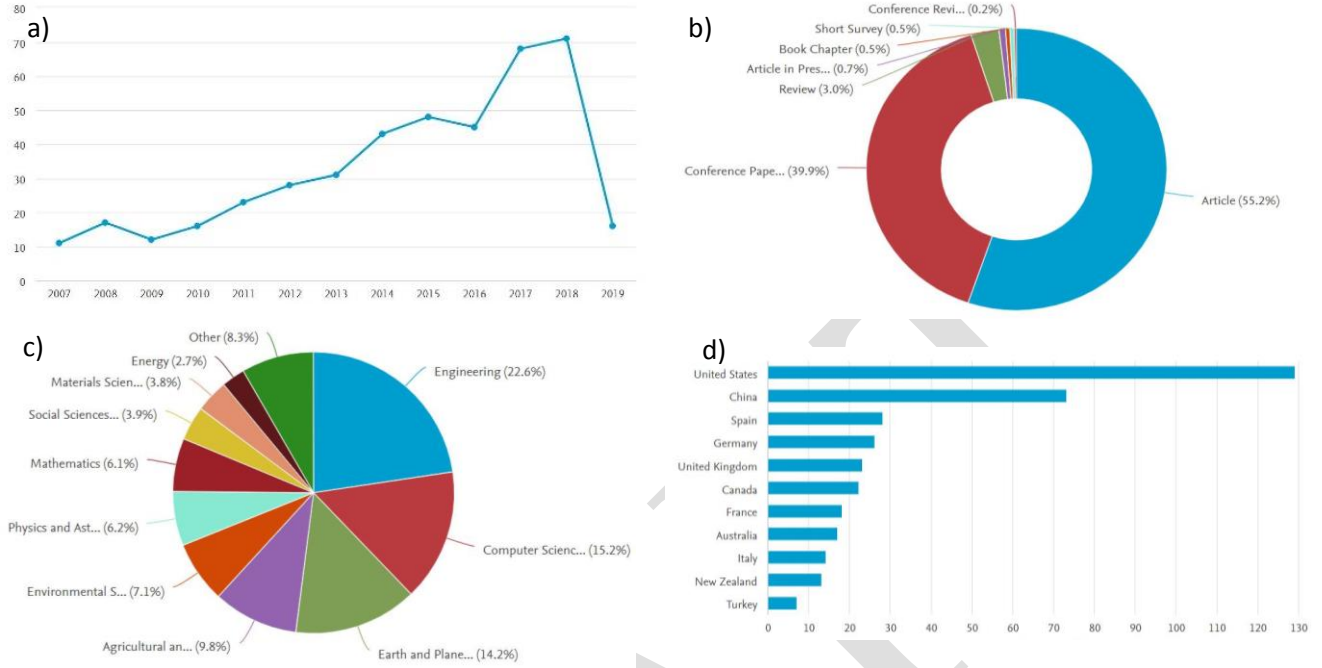
### **Drone and forestry**

Yıllara göre; "drone and forestry" taraması sonucunda Scopus veri tabanında Şekil 2a'da görüldüğü üzere artan bir trend bulunmaktadır. 2019 yılı şubat ayı itibariyle yapılan taramada yaklaşık 15 adet yayının olduğu görülmektedir. Yayın türüne göre; yapılan sorgulamada, bu yayınların büyük çoğunluğunun (%48.9) makale türünde, %46.7'sinin tebliğ ve %4.4'ünün ise diğer yayın türlerinde yayımlanan eserlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 2b). Çalışma yapılan bilim alanına göre; eserler bilgisayar bilimleri, mühendislik, yeryüzü bilimleri ve tarım-orman alanında yaygın olarak yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 2c). Ülke bazlı yapılan taraya göre; Amerika Birleşik Devletleri'nin birinci sırada, Almanya'nın ikinci ve Malezya'nın ise üçüncü sırada olduğu, Türkiye'nin ise bu alanda geliştirilebilir bir durum sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 2d).

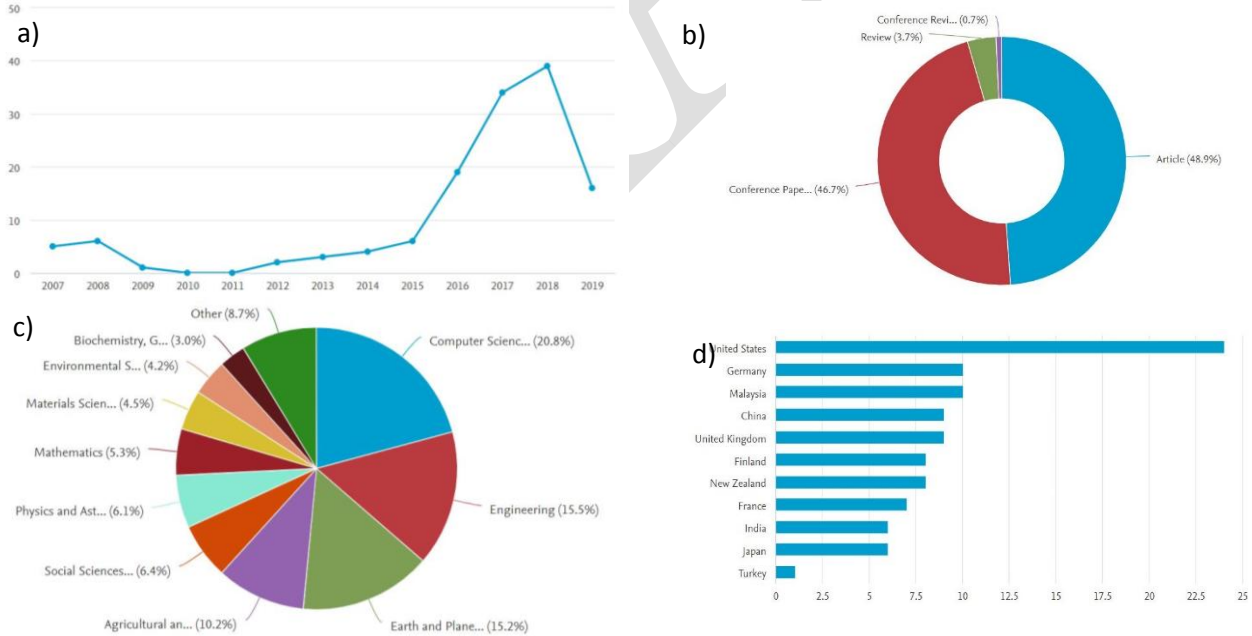
### **UAS and forestry**

Yıllara göre; "UAS and forestry" taraması sonucunda Scopus veri tabanında Şekil 3a'da görüldüğü üzere artan bir trend bulunmaktadır. 2019 yılı şubat ayı itibariyle yapılan taramada yaklaşık 12 adet yayının olduğu görülmektedir. Yayın türüne göre; yapılan sorgulamada, bu yayınların büyük çoğunluğunun (%52.4) makale türünde, %42.9'unun tebliğ ve %4.7'sinin ise diğer yayın türlerinde yayımlanan eserlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3b). Çalışma yapılan bilim alanına göre; eserler yeryüzü bilimleri, bilgisayar bilimleri, mühendislik ve sosyal bilimler alanında yaygın olarak yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 3c). Ülke bazlı yapılan

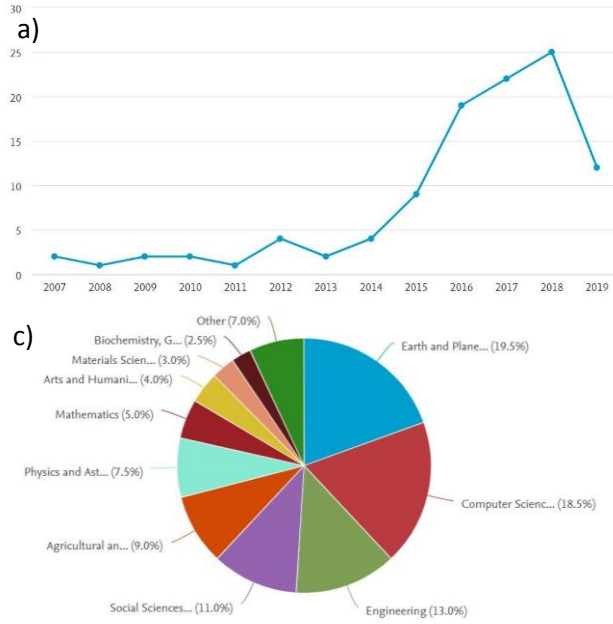
taraya göre; Amerika Birleşik Devletleri'nin birinci sırada, Kanada'nın ikinci ve İspanya'nın ise üçüncü sırada olduğu, Türkiye'nin ise bu alanda geliştirilebilir bir durum sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 3d).



Şekil 1. Scopus veri tabanında “aircraft and forestry” ikili anahtar kelimesi sonuçları: a) Yıllara göre doküman sayısı, b) dökümanların türlerine göre dağılımı, c) Yayımlanan alanları, d) ülkeler sıralaması



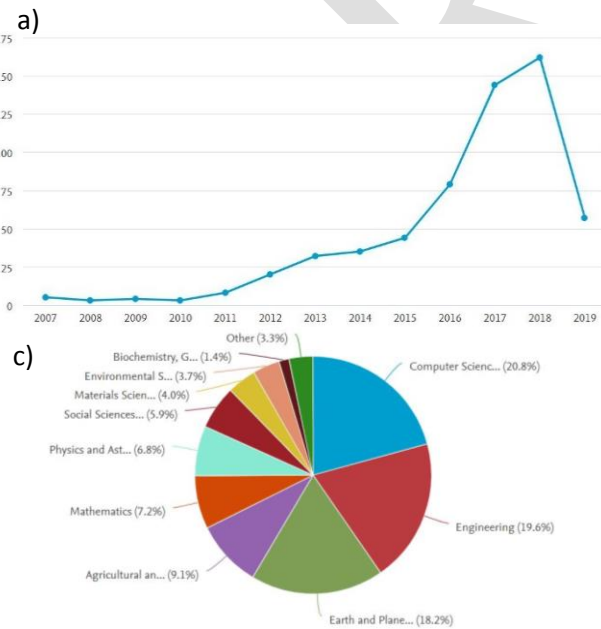
Şekil 2. Scopus veri tabanında “drone and forestry” ikili anahtar kelimesi sonuçları: a) Yıllara göre doküman sayısı, b) dökümanların türlerine göre dağılımı, c) Yayımlanan alanları, d) ülkeler sıralaması



Şekil 3. Scopus veri tabanında “UAS and forestry” ikili anahtar kelimesi sonuçları: a) Yıllara göre doküman sayısı, b) dökümanların türlerine göre dağılımı, c) Yayımlanan alanları, d) ülkeler sıralaması

### UAV and forestry

Yıllara göre; “UAV and forestry” taraması sonucunda Scopus veri tabanında Şekil 4a’da görüldüğü üzere artan bir trend bulunmaktadır. 2019 yılı şubat ayı itibariyle yapılan taramada 50’den fazla yayının olduğu görülmektedir. Yayın türüne göre; yapılan sorgulamada, bu yayınların büyük çoğunluğunun (%53.2) makale türünde, %44.6’sının tebliğ ve %2.2’sinin ise diğer yayın türlerinde yayımlanan eserlerden oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4b). Çalışma yapılan bilim alanına göre; eserler bilgisayar bilimleri, mühendislik, yeryüzü bilimleri ve tarım-orman alanında yaygın olarak yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4c). Ülke bazlı yapılan taraya göre; Çin’in birinci sırada, Amerika Birleşik Devletleri’nin ikinci ve İspanya’nın ise üçüncü sırada olduğu, Türkiye’nin ise bu alanda geliştirilebilir bir durum sergilediği tespit edilmiştir (Şekil 4d).



Şekil 4. Scopus veri tabanında “UAV and forestry” ikili anahtar kelimesi sonuçları: a) Yıllara göre doküman sayısı, b) dökümanların türlerine göre dağılımı, c) Yayımlanan alanları, d) ülkeler sıralaması

## SONUÇ

Bu çalışma Scopus veri tabanında yer alan ve çeşitli indekslerce taranan dergiler üzerinden yürütülmüştür. Toplam 1265 esere ulaşılmış ve “UAV” ve “Forestry” ikili anahtar kelime kullanımının diğerlerine oranla (596 adet) sayıca yaygın kullanıldığı görülmüştür. İHA ile ilgili çalışmalar son yıllarda hızla artmıştır. Ormanlık alanında benzer çalışmaların artacağı beklenmektedir. İHA kullanımı, ormanlık sektörü içerisinde hemen hemen tüm faaliyet alanlarında karar verme sürecinde ve planlama aşamalarında etkin olarak kullanılabilir büyük bir potansiyele sahiptir. İHA kullanımı ile, ormanlık sektörünün geliştirilmesine yönelik çeşitli yazılımlarla da desteklenerek orman yönetiminde problemler daha hızlı ve güvenilir olarak çözüme kavuşturulabilir. İlerleyen dönemlerde pratik kullanıma sahip İHA (drone) araçları ormanlık sektörü içerisinde yer alacağından bu araçları kullanacak personelin yetiştirilmesi verimlilik açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Arıca, B., Çalışkan, E., Gümüş, S., Acar, H. H. 2007. Orman yollarının uzaktan algılama ve cbs ile planlanmasının değerlendirilmesi. TMMOB Harita ve Kadastro Mühendisleri Odası, Ulusal Coğrafi Bilgi Sistemleri Kongresi, 30 Ekim –02 Kasım 2007, KTÜ, Trabzon.
- Buğday, E. 2016. Ormanlıkta Üretimin Planlaması ve Hassas Ormanlık Anlayışı. Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi, 2(1-2), 54-57.
- Buğday, E. 2018. Capabilities of using UAVs in Forest Road Construction Activities. European Journal of Forest Engineering, 4(2), 56-62.
- Çakır, G., Kadioğulları, A. İ., Karahalil, U., Sönmez, T. 2005. Orman ekosistem envanterinin uzaktan algılama ve coğrafi bilgi sistemleri ile gerçekleştirilmesi.
- Dash, J., Pearse, G., Watt, M. 2018. UAV multispectral imagery can complement satellite data for monitoring forest health. Remote Sensing, 10(8), 1216.
- Eker, M., Özer, D. 2015. Üretim işlerinde hassas ormanlık yaklaşımı: Kavramsal çerçeve. Türkiye Ormanlık Dergisi, 16(2), 183-194.
- Linchant, J., Lisein, J., Semeki, J., Lejeune, P., Vermeulen, C. 2015. Are unmanned aircraft systems (UAS s) the future of wildlife monitoring? A review of accomplishments and challenges. Mammal Review, 45(4), 239-252.
- SCOPUS, 2019. Elsevier's Scopus, the largest abstract and citation database of peer-reviewed literature, Available at: <https://www.scopus.com/> [Erişim 25.02.19]
- Şafak, İ., Gül, A. U. 2012. Orman mühendislerinin orman işlevlerine ve ormanlık faaliyetlerine verdikleri önem düzeylerinin değerlendirilmesi. SDÜ Orman Fakültesi Dergisi (13), 123-133.
- Şahin, M. 2018. Drone Journalism. The Proceedings & Abstracts of ICSSER 2018 Antalya.
- Tang, L., Shao, G. 2015. Drone remote sensing for forestry research and practices. Journal of Forestry Research, 26(4), 791-797.
- URL-1. Scopus. Web sitesi: <https://www.scopus.com/>. Erişim tarihi: 25 Şubat 2019
- Vincent, P., Rubin, I. 2004. A framework and analysis for cooperative search using UAV swarms. In Proceedings of the 2004 ACM symposium on Applied computing (pp. 79-86). ACM.
- Wallace, L., Lucieer, A., Watson, C., Turner, D. 2012. Development of a UAV-LiDAR system with application to forest inventory. Remote Sensing, 4(6), 1519-1543.
- Zhao, Y., Ma, J., Li, X., Zhang, J. 2018. Saliency detection and deep learning-based wildfire identification in UAV imagery. Sensors, 18(3), 712.

## Investigation of antibacterial properties of textile surfaces treated with zeolite-added chitosan

Aybige Akdağ<sup>1\*</sup>, Mehmet Orhan<sup>2,3</sup>

1\* Institute of Natural and Applied Science, Department of Textile Sciences, Faculty of Engineering, Bursa Uludag University, Bursa, Turkey

2 Textile Materials Technology, Department of Textile Technology, Faculty of Textiles, Engineering and Business, University of Borås, Borås, Sweden

3 Department of Textile Engineering, Faculty of Engineering, Bursa Uludag University, Bursa, Turkey

\*aybige.akdag@outlook.com

### Abstract

Here, we aimed to reduce bacterial growth caused by sweat in active individuals and to increase antioxidant property by using purely natural materials.

In this study, the solutions prepared by using chitosan and natural zeolite were applied to 100% cotton fabric with the impregnation method. These fabrics were characterized by SEM and FTIR and examined by antibacterial efficiency tests by ASTM 2149 after the treatments. The minimum inhibitor tests were performed to determine the ideal chemical concentration of the solutions exhibited antibacterial activity. In order to observe the effects of the prepared solutions on the fabrics, the efficiency of studying by analyzing the test results, SEM images and FTIR spectra were evaluated. As a result, natural zeolite and chitosan materials provide good antibacterial activity on cotton fabric. It has believed that this novel method can help improve the performance of active-wear garments with no harmful effect on skin thanks to purely natural materials.

**Keywords:** Chitosan, zeolite, cotton, antibacterial

### INTRODUCTION

The development of antimicrobial textiles has been one of the most active and important research areas in recent years, involving activities in the discovery and applications of new antimicrobial agents, novel functional fibers, new chemical finishes, and nanotechnologies. Antimicrobial Textiles Market size is estimated to be valued at USD 6.97 billion in 2015 and is projected to reach USD 10.28 billion by 2022, at a CAGR of 5.9% from 2017 to 2022. In this study, 2016 has been considered the base year, and 2017 to 2022, the forecast period for projecting the market size of antimicrobial textiles (MarketsandMarkets, 2017).

Oxidative stress causes oxidative damage if protective control mechanisms are not sufficient. It is known that oxidative stress caused by UV exposure causes skin cancer (Kensler, Trush, 1984). Chronological and photoaging are common in the skin, and oxidative stress plays an important role in this aging process (Wartanowicz et al., 1984). Ultraviolet (UV) rays, atmospheric gas, microorganisms, and pollutions cause oxidative stress on the skin (Karaca, Güder, 2009).

Natural materials tend to use much fewer toxins in their production process because they do not need to be fundamentally changed. They also tend to be more hypoallergenic, and they are better for the environment. Chitin and chitosan have antimicrobial activity in vitro and in vivo against many microorganisms including algae, fungi, molds, and bacteria. Antimicrobial activity of chitosan is affected that molecular weight, degree of deacetylation, etc. (Şahan, 2013). Chitin is the second widely available biopolymer after cellulose. Chitosan is produced by deacetylation of chitin with using alkali. During the deacetylation reaction, as it has seen at Fig.1. The acetyl group (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O) is replaced by the amino (NH<sub>2</sub>) group. These free amino groups form the basis of the physical and chemical properties of chitosan (Sivashankari, Prabakaran, 2016).

Because of the polycationic structure of chitosan, it is thought that the microorganism changes the permeability of the cell membrane and causes the death of the microorganism that cannot get nutrients to its structure (Fei Liu et al., 2001, Zheng, Zhu, 2003).

The structures of zeolites consist of a three-dimensional framework of SiO<sub>4</sub> and AlO<sub>4</sub> tetrahedra. The aluminum ion is small enough to occupy the position in the center of the tetrahedron of four oxygen atoms, and the isomorphous replacement of Al<sup>3+</sup> for Si<sup>4+</sup> raises a negative charge in the lattice (Ćurković et al., 1997).

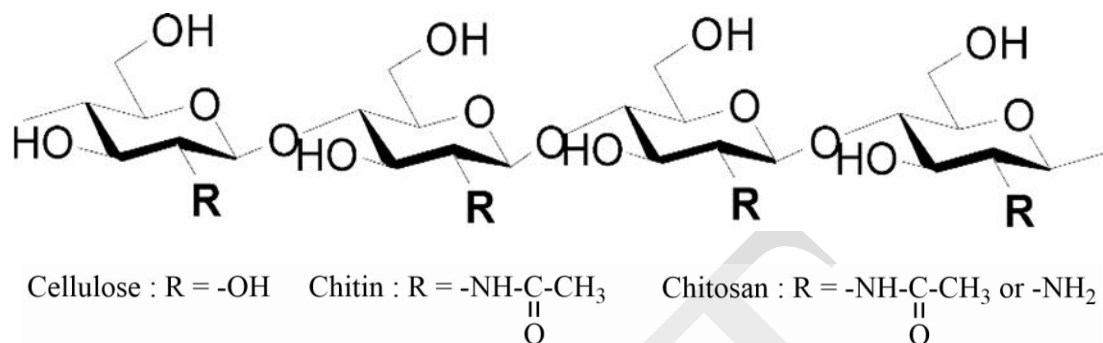


Fig. 1. Chemical structure of chitosan

The natural zeolites found in nature are formed as crystals in small cavities of basaltic rocks for years or as glass changing by interacting with volcanic tuffs or saline water. The channels are shown in Fig. 2 in the structure of the zeolite allow ions and molecules to pass easily through the structure of the zeolite.

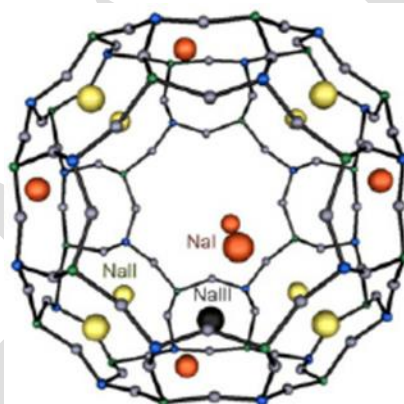


Fig. 2. Zeolite crystal (Demontis, P. at all., 2010)

The ions in the structure of zeolites are not in fixed positions and can move within the structure without changing the lattice structure. The strong ion exchange property of the clinoptilolite allows it to bind heavy metals (Jha, Singh, 2016). In a study on the removal of cadmium and lead heavy metals from wastewaters by using natural zeolite and treated zeolite, it was observed that lead and cadmium ions can pass into the pores of the zeolite, lattice cavities and be replaced by ions such as sodium, calcium, and potassium (Curkovic, 1997). According to the results of the studies, activated natural zeolite increased the TAS (Total Antioxidant Status) value by 26% by 10 times as compared to other known antioxidants (Grancaric et al., 2012). In a study of mice exposed to sarin gas, decontamination with zeolite to the skin of the mice increased the survival rate and resistance of the mice to 4 times more sarin gas (Vuceedmilovic et al., 2001). In addition to these properties, the particles of natural zeolite (clinoptilolite) scatter light wavelengths of the electromagnetic spectrum and increase UV protection.

Zeolite and chitosan were investigated in many studies in term of antibacterial activity and the removal of heavy metals from aqueous solution. Antibacterial activity of zeolite and chitosan composites and the effect of zeolite on composite strength were investigated (Yu et al., 2013).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The woven cotton (CO) fabric (319 g/m<sup>2</sup>) was used for this study. The fabric was bleached with a cold pad-batch method using hydrogen peroxide (50%) and sodium hydroxide (47 Be°). After that, the fabric was washed at 95°C with soap and dried with the hot flue. Chitosan from shrimp shells with 85% deacetylation degree was purchased from Sorel Kimya, Turkey. Natural zeolite contained 90-95% clinoptilolite was purchased from Rota Madencilik, Turkey. Mesoporous area of zeolite was 28-30 m<sup>2</sup>/g, microporous area 10-12 m<sup>2</sup>/g, pore diameter was 4 Å. Acetic Acid (70%) and soft water were also used during the treatments.

### Instruments

Isolab 500 mL beaker was used to prepare the solution. Mathis laboratory type padding machine and Ernst Benz stenter were used in this study. The surface morphologies of the swatches were observed with a ZEISS EVO 40 field emission scanning electron microscope. The structure of the swatches was analyzed by the attenuated total reflection Fourier transforms infrared spectroscopy (ATR-FTIR), and spectra were obtained using a Termoscientific FTIR spectrometer. The standard procedure was followed, in which samples were coated with gold for 150 s before a scanning electron microscopy examination. Stiffness Measurements were performed on SDL ATLAS device according to ASTM D4032 standard.

### Methods

The solution was prepared with acetic acid to adjusted pH:3.5. Firstly, chitosan was added slowly and mixing 1500-1700 m/d during 3h to completely dissolved of the chitosan. After that, clinoptilolite added to the solution and all of them mixed together during 1h more. In order to evaluate the effect of zeolite on the surface formation and antibacterial efficacy, zeolite of different weights was added to the solution. The recipe can be seen in Table 1.

Table 1. Recipe of the solution

Recipe	Untreated	1	2	3	4
Chitosan (g/L)	-	15	15	15	15
Zeolite (g/L)	-	-	5	10	15

The solution was treated on fabric by impregnation method. The squeezing pressure on fabrics was 2 bar, cylinder rotation speed was 8 m/s, and pick up was 80%. After application, the fabrics were dried according to 100°C, 6% moisture value, and then fixed to 5 seconds at 140°C.

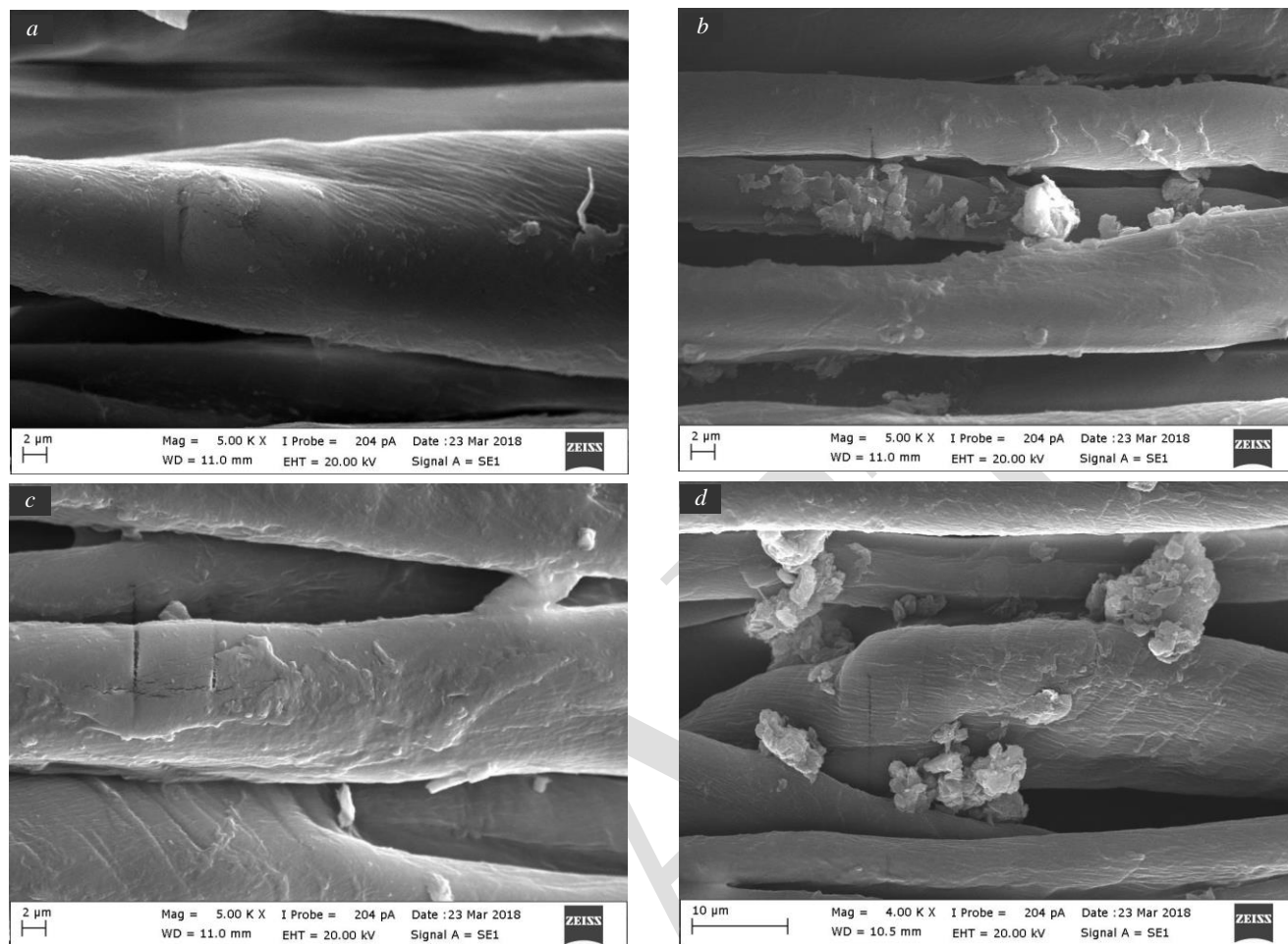
For the quantitative method, the antibacterial activity on the fabric was evaluated by ASTM 2149 and on solution CLSI M02 Disc Diffusion. In ASTM 2149, the bacterial culture concentration of about 10<sup>5</sup> CFU/mL was applied to samples for testing. All the samples were incubated at 37°C and shaken in a wrist-action shaker for 10, 20, 30 minutes. In the CLSI method after 24 h incubation at 37°C, zone diameters were measured in millimeters and evaluated. *S. aureus* and *E. coli* were used at antibacterial tests.

## RESULTS and DISCUSSION

### Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis

SEM images of cotton samples are given in Figure 3. The various impurities have seen around the untreated cotton fiber surface. The cotton fiber has a coarser and rough surface with a plurality of visible channels, and the fibrillar structure is clearly visible. After the zeolite application, it was observed that the chemical substance adhered to the fiber surfaces and dispersed homogeneously on the surface. After chitosan application, chitosan formed a thin film layer on the fiber surface and bonded to the fiber surface. The SEM images of the solution-treated cotton fabric prepared with 15 g/L chitosan and 20 g/L zeolite showed clear distribution of the film layer and zeolite particles on the fibers.

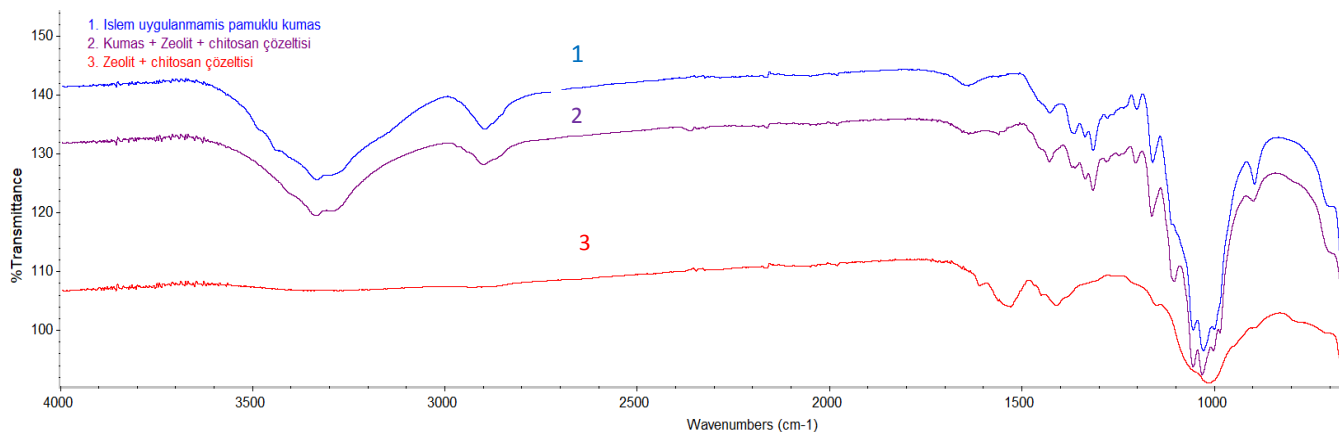




**Fig. 3.** SEM images of cotton fabrics (a-untreated, b- 20 g/L zeolite, c- 15 g/L chitosan, d- 15 g/L chitosan+20 g/L zeolite)

### Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis

Although the proper thin film exists on SEM images, no new bands appeared to be indicative of any modifications to the cotton fabric on the FTIR spectrum. The change in the transmittance band at  $1645\text{ cm}^{-1}$  results from the deformation vibration of the hydroxyl groups. The wide band resulting from the bending vibration of the adsorbed water at  $1558\text{ cm}^{-1}$  is observed for all clinoptilolite forms. The resulting broadband is expected to improve water absorption after drying due to the porous nature of the zeolite (Ng et al., 2008). Peaks between  $1500$  and  $1000\text{ cm}^{-1}$  FTIR are due to the high calcite content. Peaks observed between  $1000$  and  $600\text{ cm}^{-1}$  are present in all clinoptilolite forms and produce a characteristic band at  $836\text{ cm}^{-1}$  for all forms (Al-Degs et al., 2003). After the reaction between the aldehyde group ( $\text{C}=\text{N}$ ) of chitosan and the hydroxyl group ( $\text{OH}$ ) of cotton, a characteristic absorption band in the range of  $1720\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$  should emerge (Liu et al., 2001).



**Fig. 4.** FTIR spectrum of 1- untreated cotton fabric, 2- 15 g/L chitosan+20 g/L zeolite treated cotton fabric  
3- solution of 15 g/L chitosan+20 g/L zeolite

### Stiffness Values

The hardness values of untreated and treated cotton fabrics are shown in Table 2. The film layer formed by chitosan on the fabric surface caused an increase in the stiffness of the fabric. It is seen that the increase in hardness is higher in the recipe where zeolite and chitosan are together.

**Table 2.** Stiffness values of fabrics

	Untreated	1	2	3	4
Stiffness Values (kg)	0.65	1.81	1.88	1.94	2,01

### Antibacterial Activity

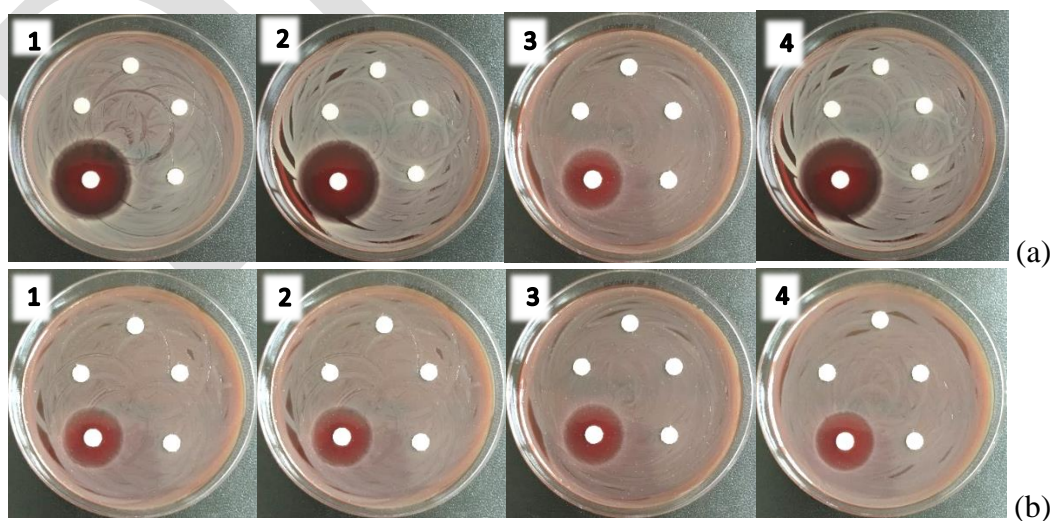
#### Antibacterial Activity of Solutions

When we look at both the numerical values in Table 3. and the disk images in Figure 5. We see that the zone diameter is satisfactory, and no bacterial growth occurs at the point where the solution is located. It is clearly seen that adding zeolite to chitosan increases the zone diameter for *E. coli*, but the zeolite amount is not distinctly affective parameter for zone diameter. Namely, we could not say that; the more amount of zeolite added to chitosan the more zone diameter is.

**Table 3.** Antibacterial activity values against *S. aureus* (AATCC 6538)<sup>a</sup> and *E. coli* (AATCC 35218)<sup>a</sup> according to CLSI M02 disk diffusion test method

No	Sample	Concentration (mL)	Zone diameter (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Chitosan solution	5	66	57
		10	73	57
		15	76	57
		20	81	57
2	Chitosan solution + 5 g/L Zeolite	5	64	63
		10	64	63
		15	66	66
		20	69	66
3	Chitosan solution + 10 g/L Zeolite	5	65	65
		10	65	65
		15	66	66
		20	76	68
4	Chitosan solution + 20 g/L Zeolite	5	65	65
		10	67	66
		15	68	66
		20	68	66
5	Cefoxitin		290	220

<sup>a</sup>: Each Müller Hinton II medium was inoculated with bacteria at a concentration of 0.5 Mcfarland.



**Figure 5.** Antibacterial activity values against *S. aureus* (a) (AATCC 6538) and *E. coli* (b) (AATCC 35218) according to CLSI M02 disk diffusion test method

## Antibacterial Activity of Fabrics

Antibacterial activity of chitosan and zeolite impregnated fabrics were tested according to ASTM E 2149 method, and the results are shown in Table 4. After 24 hours, the antibacterial treated surfaces were found to be highly effective against *S. aureus* and satisfactorily effective against *E. coli*. These results show us to the known antibacterial activity of chitosan.

**Table 4.** Antibacterial activity values against *S. aureus* (AATCC 6538)<sup>a</sup> and *E. coli* (AATCC 35218)<sup>b</sup> according to ASTM E 2149 test method

No	Sample	Bacterial reduction (%)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	Untreated fabric	21.6	108.0
2	Chitosan solution	-99.9	-88.08
3	Chitosan solution + 5 g/L Zeolite	-99.9	-99.1
4	Chitosan solution + 10 g/L Zeolite	-99.9	-74.6
5	Chitosan solution + 20 g/L Zeolite	-99.9	-91.8

Bacteria concentration transferred to each sample weighing 1 gram calculated as;

**a:**  $4,77 \times 10^5$  (log 5,68) cfu\*/ml, **b:**  $2,80 \times 10^5$  (log 5,45), cfu\*/ml \* cfu: Colony forming unit

**Note:** (+) % bacterial values indicate an increase in the number of bacteria. (-) % bacterial values indicate a decrease in the number of bacteria. A value of (-) 100 indicates that all bacteria on the surface have died.

## CONCLUSION

We have investigated the characterization of zeolite added chitosan on cotton fabric surfaces and their antibacterial activity for getting antibacterial and antioxidant cotton fabric.

SEM studies support that zeolite added chitosan can be introduced into the cotton surface. The zeolite added chitosan cotton surfaces provided significant inactivation against *S. aureus* and *E. coli*, even at a lower concentration while the untreated surfaces did not show any antibacterial activity. The using of zeolite and chitosan on the cotton fabric offers several specific advantages such as antibacterial efficiency and antioxidant activity, for the production of functional materials. As a continuation of this study, washing durability of application should study.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Assoc.Prof.Dr. Saliha Şahin for contributions about the antioxidant investigation. The authors are also grateful for application equipment support from Sanko Holding Compony Isko Division.

## REFERENCES

- Al-Degs Y.S., Tutunji, M.F., Baker, H.M. 2003. Isothermal and kinetic sorption behaviour of Pb<sup>2+</sup> ions on natural silicate minerals, *Clay Minerals*, 38(4): 501-9.
- Ćurković, L., Cerjan-Stefanović, Š., Filipan, T. 1997. Metal ion exchange by natural and modified zeolites. *Water Research*, 31(6), 1379-1382.
- Guo Z., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, P. 2005. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(20), 4600-4603.
- Grancaric, A. M., Prlic, I., Tarbuk, A., Marovic, G. 2012. Activated natural zeolites on textiles: Protection from radioactive contamination. *Intelligent Textiles and Clothing for Ballistic and NBC Protection*. Springer, Dordrecht. 157-176.
- Fei Liu, X., Lin Guan, Y., Zhi Yang, D., Li, Z., De Yao, K. 2001. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324-1335.

- Jha, B., Singh, D. N. 2016. Basics of zeolites. *In fly ash zeolites s.5-31*. Springer, Singapore.
- Marketsandmarkets, 2017. Antimicrobial Textiles Market by Agent Treated Textiles, Application and Region-Global Forecast to 2022, Available at: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/antimicrobial-textile-market-254286152.html> [02.07.2019].
- Karaca S, Güder H, 2009. Dermatolojide antioksidan sistem/Antioxidant system in dermatology. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 3.2: 32.
- Kensler, T. W., Trush, M. A. 1984. Role of oxygen radicals in tumor promotion. *Environmental Mutagenesis*, 6(4), 593-616.
- Liu, X. D., Nishi, N., Tokura, S., Sakairi, N. 2001. Chitosan coated cotton fiber: preparation and physical properties. *Carbohydrate Polymers*, 44(3), 233-238.
- Ng, E. P., Delmotte, L., Mintova, S., 2008 Environmentally benign synthesis of nanosized aluminophosphate enhanced by microwave heating. *Green Chemistry*, 10(10), 1043-1048.
- Sivashankari, P. R.; Prabaharan, M. 2017. Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. *Chitosan Based Biomaterials* 1: 117-133.
- Vucemilovic, A., Jukic, I., Subotic, B., Hadzija, M. 2001. The zeolites as skin decontaminants against nerve agent sarine in vivo. Croatian Military Academy.
- Wartanowicz, M., Panczenko-Kresowska, B., Ziemiański, Ś., Kowalska, M., Okolska, G. 1984. The effect of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 28(3), 186-191.
- Yu, L., Gong, J., Zeng, C., Zhang, L. 2013. Preparation of zeolite-A/chitosan hybrid composites and their bioactivities and antimicrobial activities. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 3652-3660.
- Zheng, L. Y., Zhu, J. F. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.

## Salusin- $\beta$ insan over kanseri hücrelerinde proliferasyona neden olur: *In vitro* bir araştırma

Suat Tekin\*, Dilara Altay Öztürk, Mehmet Refik Bahar, Süleyman Sandal

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: suat.tekin@inonu.edu.tr

### Özet

2003 yılında salusin adını verilen çok fonksiyonlu biyoaktif peptid yapılı bir hormon keşfedilmiştir. Bu hormon idrarda, kanda ve dokularda salusin- $\alpha$  (Sal- $\alpha$ ) ve salusin- $\beta$  (Sal- $\beta$ ) olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Preprosalusin'den köken alan Sal- $\alpha$  28 aminoasitten, Sal- $\beta$  ise 20 aminoasitten oluşmaktadır. Bu çalışma salusin beta'nın insan over kanser hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır. Çalışmada insan over kanseri (A2780) hücre hattı kullanıldı. Salusin- $\beta$ 'nin 0.1, 1, 10 ve 100 nM'lik konsantrasyonları kültür ortamına eklendi. 12, 24 ve 48 saat süreyle hücre canlılığı üzerindeki etkiler MTT yöntemi kullanılarak belirlendi. Uygulanan Salusin- $\beta$ 'nin doz ve zaman bağımlı olarak A2780 hücre canlılığını arttırdığı görüldü ( $p < 0.05$ ). Tüm bu sonuçlar fazla salusin- $\beta$  salgısının kanser hücrelerinin çoğalmasında arttırdığını ve kısır döngüye sürükleyebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, Salusin- $\beta$ , MTT, A2780

### Salucin- $\beta$ causes proliferation of cancer cells on human: An *in vitro* research

#### Abstract

In 2003, a multi-functional bioactive peptide-based hormone called salusin was discovered. This hormone is present in two forms: salusin- $\alpha$  (Sal- $\alpha$ ) and salusin- $\beta$  (Sal- $\beta$ ) in the urine, blood and tissues. Sal- $\alpha$  originating from preprosalucine consists of 28 amino acids and Sal- $\beta$  consists of 20 amino acids. This study was designed to determine the effects of salusin beta on human ovarian cancer cell viability. Human ovarian cancer (A2780) cell line was used in the study. 0.1, 1, 10 and 100 nM concentrations of salusin- $\beta$  were added to the culture medium. The effects on cell viability for 12, 24 and 48 hours were determined using the MTT assay method. Salusin- $\beta$  was found to increase the A2780 cell viability by dose and time ( $p < 0.05$ ). All these results suggest that excess salusin- $\beta$  secretion can increase the proliferation of cancer cells and drag it into the loop.

**Keywords:** Cancer, Salusin- $\beta$ , MTT, A2780

### GİRİŞ

Over kanseri, kadın üreme organlarında görülen kanser türlerinden biri olup en zor tedavi edilen kanser türleri arasındadır. Çoğunlukla yumurtalıkların yüzey tabakasından itibaren gelişir. Over kanserinin en yaygın türleri üst yüzey tabakasında rastlanan epitelyal türü ve yumurta hücrelerinde rastlanan, üreme hücresi tümörüne neden olan türüdür. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların sağlıklı hücreler üzerine olan olumsuz etkileri, tedavi sürecinde başarının artması için yüksek biyoyumlu ajanların keşfini, tasarlanmasını ve sonrasında kullanımını gerektirmektedir. 2003 yılında Shichiri ve arkadaşları salusin adını verdikleri çok fonksiyonlu biyoaktif peptid yapılı bir hormon keşfetmişlerdir (1). Bu hormon idrarda, kanda ve dokularda salusin- $\alpha$  (Sal- $\alpha$ ) ve salusin- $\beta$  (Sal- $\beta$ ) olmak üzere iki formda bulunmaktadır (2,3). Preprosalusin'den köken alan Sal- $\alpha$  28 aminoasitten, Sal- $\beta$  ise 20 aminoasitten oluşmaktadır (1,4). Preprosalusin; insanlarda damarlar ve böbreklerden salgılanmasına rağmen kan plazması ve idrarda varlığı gösterilmiştir (1,2). Ayrıca insan böbrek dokularında salusin'in her iki formu ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) da bulunmasına rağmen yapılan araştırmalar genellikle kardiyovasküler sistemi üzerine yoğunlaşmıştır (1, 5, 6). Yapılan çalışmalarla salusin- $\beta$ 'nin aterosklerotik plaklar, adrenal medulla, böbrekler, endotelial hücreler, fibroblastlar, hipofiz, hipotalamus, timus, kan damarları, kemik iliği, makrofajlar ve vasküler düz kas hücrelerinde varlığı ortaya konmuştur (7). Salusin $\alpha$  ve  $\beta$  formunun en önemli fonksiyonu, sistemik bir hipotansif etki yaratarak arteriyel basıncın düşürülmesini sağlamak olduğu ileri sürülmektedir (7, 8). Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda salusin'in ratların birçok organında (mide, ince bağırsak, karaciğer, böbrekler, adrenal medulla, timus, lenf nodu, kemik iliği, dalak dahil) çok iyi eksprese edildiği (9, 10, 11) ve ratların tükürük bezi, akciğer, adrenal korteks,

iskelet kası, testis, kalp ve aort da ise çok az miktarda sentezlendiği immunohistokimyasal olarak ortaya konmuştur (9). Salusin'in her iki formu karşılaştırıldığı zaman, Salusin-β'nin salusin-α'dan idrar ve dolaşımdaki seviyeleri 2-10 kat fazla olup (5,7) mitojenik etkisi de daha kuvvetlidir. Salusin-β deneysel çalışmalarda kullanılan polipropilen ve polistiren özellikteki tüplerin yüzeyine kolayca yapıştığı için miktarları azalmaktadır. Bundan dolayı salusin-β ile ilgili araştırmalar daha çok fizikokimyasal olayları kapsamaktadır (12). Salusin-β, sıçanlarda kan basıncında ve kalp atış hızında hızlı ve geçici düşüşe neden olurken, salusinα'ya göre hemodinamik etkileri daha fazladır (1). Ayrıca salusin-β kardiyak kontraktilitenin direkt bastırılmasından ziyade parasempatik uyarıyı da sağlamaktadır (5). Ratlarda salusin-β'nin, sistemik dolaşım yoluyla arka hipofiz ve hipotalamus nöronları üzerinde baskı oluşturduğu belirtilmiştir (13). Hipotalamusta meydana gelen salgılar ile açığa çıkan hipotalamik cevaplar neticesinde sıvı alımının düzenlenmesi, alınan besin miktarı, susama, harcanan enerji miktarı, vücut ağırlığı, üreme, kan basıncı gibi yaşamsal fonksiyonlar kontrol edilmektedir (13). Saito ve ark. yaptığı çalışmada deneysel olarak dehidratasyona maruz bırakılan ve tuz yüklemesi yapılan sıçanlarda hipotalamus supraoptik ve paraventriküler nükleusda, medianeminensde, arka hipofizde salusin-β seviyesinin önemli miktarda arttığı rapor edilmiştir (14). Salusin-β'nin fizyolojik rolleri halen büyük oranda gizemini korumaktadır. Bu çalışmada neredeyse kanser üzerindeki etkileri hiç bilinmeyen salusinlerin kanser patofizyolojisindeki rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Hücre Kültürü

Proje kapsamında hücre tipi olarak insan over kanser hücre serisi (A2780) serisi kullanıldı. Tüm hücreler 25 cm<sup>2</sup> kültür flasklarında, RPMI-1640 medyum (içerisine %10 FCS, 100 U/mL penisilin ve 0.1 mg/mL streptomisin ilave edilerek hazırlanan) ile beslenildi. Karbondioksitli (%5 CO<sub>2</sub>) inkübatör de, 37 OC'de ve nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirildi. Hücreler konfluent olduğunda, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flasklar dan sökülerek sayımları yapılacak ve her kuyucuğa 15x10<sup>3</sup> hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu plaklara aktarıldı. 96 well plate içerisine ekimleri yapılan (her kuyucuk için 15x10<sup>3</sup> hücre) hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı (Panasonic CO<sub>2</sub> inkübatörü) ve hücrelerin flask tabanına yapışması sağlandı. Test Edilecek salusin-β formunun (0.1, 1, 10 ve 100 nM'lık konsantrasyonları) hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara ilave edildi, 12, 24 ve 48 saat CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda MTT assay yöntemi kullanılarak hücre canlılığında meydana gelen değişiklikler MTT assay yöntemi kullanılarak belirlendi.

### MTT Assay

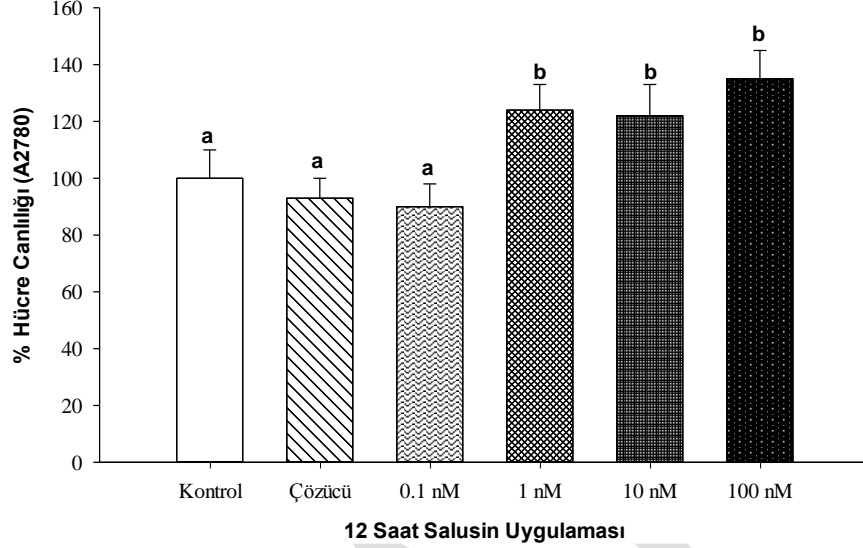
Sitotoksik etkiler, sitotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid (MTT) assay yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlanarak, 12, 24 ve 48 saat sal-β ile inkübe edilen 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra kuyucuklara DMSO eklendi ve inkübasyon durdurularak plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri, ELISA cihazında (Synergy HT ABD) 550 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol kuyucukları (Sadece medium bulunan kuyucuklar) okutulurken, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Bu deneyler farklı günlerde, birbirinden bağımsız olarak 10 kez tekrarlandı.

### Verilerin İstatistiksel Analizi:

Analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 for Windows paket programı kullanıldı. Normal dağılıma uygunluk Shapiro Wilk testi ile incelendi, nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Önemli farklılık belirlendiğinde çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi. p<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

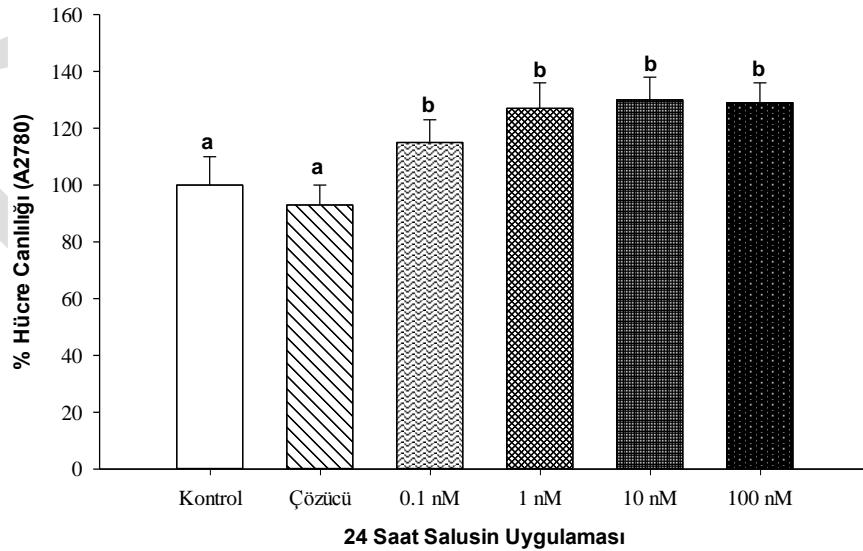
## BULGULAR ve TARTIŞMA

12 saat süreyle Sal- $\beta$  uygulamasının A2780 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 1’de sunulmuştur. Uygulanan Sal- $\beta$ ’nın 0.1 nM konsantrasyonu dışındaki diğer konsantrasyonlarının hücre canlılığını arttırdığı görüldü ( $p<0.05$ ).



**Şekil 1.** 12 saat süreyle salusin uygulamasının A2780 hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği değişiklikler (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir; <sup>a,b</sup> $p<0.05$ ).

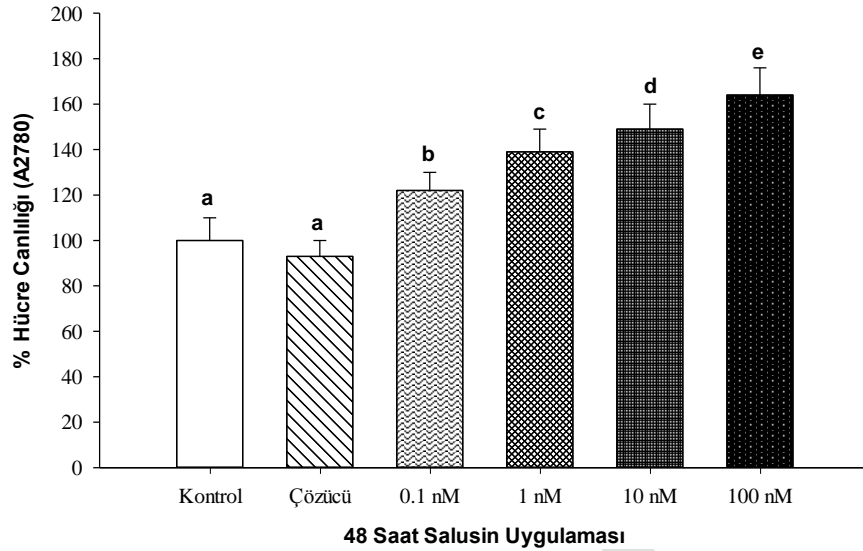
24 saat süreyle Sal- $\beta$  uygulamasının A2780 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 2’de gösterilmiştir. Uygulanan Sal- $\beta$ ’nın tüm konsantrasyonlarının kanser hücre canlılığını arttırdığı belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 2.** 24 saat süreyle salusin uygulamasının (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir; <sup>a,b</sup> $p<0.05$ ).



48 saat süreyle Sal- $\beta$  uygulamasının A2780 hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 3’de verilmiştir. Uygulanan Sal- $\beta$ ’nın tüm konsantrasyonlarının doz bağımlı olarak kanser hücre canlılığını arttırdığı belirlendi ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 3.** 48 saat süreyle salusin uygulamasının A2780 hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği değişiklikler (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir; <sup>a,b,c,d,e</sup> $p < 0.05$ )

## SONUÇ

Tüm bu sonuçlar Sal- $\beta$ ’nin over kanseri hücre poliferasyonunu arttırdığını ve over kanser için önemli ölçüde risk oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle Sal- $\beta$  reseptör antagonistlerinin keşfi kanser hastalığıyla mücadelede önemli bir farkındalık ortaya koyabilir. Daha kapsamlı çalışmalar ile fizyopatolojik sürecin açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi BAP (Proje no: TSG-2017-952 ve TDP-2019-1742 ) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Shichiri, M., Ishimaru, S., Ota, T., Nishikawa, T., Isogai, T. and Hirata, Y., 2003. Salusins newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities, *Nat. Med.*, 9, 1166– 1172.
2. Sato, K., Koyama, T., Taten, T., Hirata, Y. and Shichiri, M., 2006. Presence of immunoreactive salusin $\alpha$  in human serum and urine, *Peptides*, 27, 2561- 2566.
3. Kimoto, S., Sato, K., Watanabe, T., Suguro, T., Koyama T. and Shichiri, M., 2010. Serum levels and urinary excretion of salusin- $\alpha$  in renal insufficiency, *Regul. Pept.*, 162, 129-132.
4. Aydın, S., 2011. Kardiyopulmoner Bypassın Apelin ve Salusin Expresyonlarına Etkileri ve Salusin Aort, Safen, Ven ve Arteriyel Greftlerde Lokal Olarak Sentezlenip Sentezlenmediğinin Araştırılması, *Tıpta Uzmanlık Tezi, D.Ü. Diyarbakır*.
5. Izumiyama H, Tanaka H, Egi K, Sunamori M, Hirata Y, Shichiri M. Synthetics salusins as cardiac depressors in rat. *Hypertension* 2005; 45: 419-425.
6. Watanabe T, Suguro T, Sato K, Koyama T, Nagashima M, Kodate S, et al. Serum salusin-alpha levels are decreased and correlated negatively with carotid atherosclerosis in essential hypertensive patients. *Hypertens Res* 2008; 31: 463-468.

7. Aydın, S., Eren, M.N. and Aydın, S., 2012. Kardiyovaskuler sistemde salusin  $\alpha$  ve  $\beta$ 'nin fizyolojisi ve klinik rolü, J. Cardiovasc. Sci., in press.
8. Chen WW, Sun HJ, Zhang F et al: Salusin-b in paraventricular nucleus increases blood pressure and sympathetic outflow via vasopressin in hypertensive rats. Cardiovasc Res, 2013; 98: 344– 51.
9. Suzuki N, Shichiri M, Akashi T, Sato K, Sakurada M, Hirono Y, Yoshimoto T, Koyama T, Hirata Y. Systemic distribution of salusin expression in the rat. Hypertens Res. 2007;30(12):1255- 1262.
10. Sato K, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri M. Release of salusin-beta from human monocytes/macrophages. Regul Pept. 2010;8:162(1-3):68-72.
11. Nakayama C, Shichiri M, Sato K, Hirata Y. Expression of prosalusin in human neuroblastoma cells. Peptides. 2009;30(7):1362-1367.
12. Çitil C., 2012. Metabolik Sendrom Oluşturulmuş Ratların Karaciğer, Beyin Ve Serumlarında Salusin Ekspresyonlarının Araştırılması, Doktora Tezi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Elazığ.
13. Takenoya F, Hori T, Kageyama H, et al: Coexistence of salusin and vasopressin in the rat hypothalamo-hypophyseal system. Neurosci Lett 2005; 385: 110–113..
14. Saito T, Dayanithi G, Saito J, Onaka T, Urabe T, Watanabe TX, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Yokota A, Nishizawa S, Hirata Y, Ueta Y. Chronic osmotic stimuli increase salusinbeta-like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system: possible involvement of salusin-beta on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase and neurohypophyseal hormone release from the axonterminals. J Neuroendocrinol. 2008, 20 (2):207-19.

## The effects of gastric digestion and refrigerated storage on beef marinated with different food materials

Emin Burçin Özvural<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cankiri Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Cankiri, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: bozvural@karatekin.edu.tr

### Abstract

Marination is a process that enhances the tenderness and aroma characteristics of meat using different acidic materials, sauces, spices etc. In this study, the effects of different marinades on beef during 4°C storage were examined. Besides, textural and Nuclear Magnetic Resonance relaxation times of the marinated beef samples were measured before and after *in vitro* gastric digestion. Marinades were prepared using lemon, vinegar, milk, yoghurt and oil. Thyme oil was also added to the marinades at a level of 5%. The total phenolic content and antioxidant capacity of all the marinades were found to be similar ( $p > 0.05$ ). Colour values ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) of the beef samples were measured after marination and they were compared to each other. During storage, significant differences were found in the pH values of the meat samples ( $p < 0.05$ ). The pH values of the treatments including lemon, vinegar and yoghurt were lower than the other samples at the end of storage ( $p < 0.05$ ). TBARS values of all the treatments were found to be similar at the last day of storage time ( $p > 0.05$ ), although there were significant differences on day 0 ( $p < 0.05$ ). Whilst the hardness of all the marinated meat samples was similar to control before digestion ( $p > 0.05$ ), control had the highest mean value after digestion. Spin-spin relaxation times ( $T_2$ ) were measured by CPMG experiments. Relaxation curves showed a multiexponential behaviour and type of the marinade was found to effect the relaxation times which was also related with the changes observed on the physical properties.

**Keywords:** Marination, Beef, Oxidation, Antioxidant, NMR relaxometry

### INTRODUCTION

Marination is conducted using ingredients, such as organic acids (lactic acid, acetic acid, citric acid etc) essentials oils, seasoning, spices, herbs, water, salt or sugar, binders, antimicrobial agents and aroma enhancers (Karam et al., 2019; Karyotis et al., 2017). Considering the consumers demands, meat is usually marinated, because marination enhances the organoleptic characteristics of the treated food, prolongs the shelf life of meat due to the presence of antimicrobial substances in the formulation, improves tenderness and palatability of meat and increases the cooking efficiency. There are three types of marination techniques: immersion, injection, and vacuum tumbling. Immersion is the oldest method which the ingredients penetrates the meat through diffusion. It is the most economical way of marination, but it needs long processing times and limits the quantity and regularity in distribution of the ingredients. In injection method, multineedle injectors or probes are used to spread the marinade throughout the piece. In the industry, vacuum tumbling is often used to extract protein exudates (mainly the salt-soluble proteins actin and myosin) and to provide ready to cook, easy to cut, juicy and value added products (Alvarado and McKee 2007).

Meat tenderness is mainly related to connective tissue and myofibrillar protein components of muscle and their contribution to tenderness depends on factors such as the location of the muscle in the carcass, the degree of contraction of the myofibrils and the cooking method applied (Burke and Monahan, 2003).

Scientists and producers have been studying on methods that can improve the quality of meat and improve the tenderness and juices that develop during muscle maturation. Collagen and myofibrillar system, which is the main component of perimysium, are the main substances responsible for the hardness changes seen in the cooking of meat due to their unique characteristics. However, connective tissue proteins, particularly those in perimysium, are known to have an important role in meat structure (Goli et al., 2014).

A number of acidic solutions, such as lactic acid, acetic acid and citric acid, have been successfully tested by different researchers to increase sensitivity and maintain meat quality (Das 2002; Das and Jayaraman 2003;

Narayan et al., 2015). Low pH causes muscle tissue to weaken and swell, and marinades cause collagen to dissolve into gelatin during cooking (Burke and Monahan 2003; Narayan et al., 2015).

NMR Relaxometer is a technique based on measuring T1 and T2 times. T1 is the recovery of longitudinal magnetization of spins and T2 is known as the exponential decay of transverse magnetization as a result of short-term application of the radio frequency (RF) pulse required for NMR. Time T1 is characterized by an exponentially increasing signal, while time T2 is derived from an exponentially decreasing signal curve (Kirtil and Oztop, 2015). NMR relaxation spectra provide information about proton pools in the samples (Ersus et al., 2010; Oztop et al., 2014, 2012, 2010; Wichchukit et al., 2013). Cross-linking kinetics in gel systems and the integrity of cellular structure in fruit and vegetable samples can be obtained with this technique (Ersus et al., 2010; Kirtil et al., 2014). Assuming that meat samples are also some kind of protein gel systems, it is possible to use the NMR Relaxometer to identify different proton pools in these systems.

The aims of this study were to evaluate the effects of different marinades including materials with thyme oil on the quality characteristics of beef during refrigerated storage and to observe the changes in beef after in vitro gastric digestion.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Lemon, apple cider vinegar, milk, yoghurt, sunflower oil and cubed beef (~1.5cm x 1.5 cm x 1.5 cm) were purchased from a local supermarket. Thyme oil which was obtained from Ecem Naturel Kozmetik Kişisel Bakım ve Sağlık Ürünleri, İstanbul, Turkey).

### Preparation of marinades and marination of beef samples

In this study, 5 different marinades were prepared. First marinade 75% lemon (v / v) + 20% oil (v / v) + 5% thyme oil (v / v), second marinade 75% vinegar (v / v) + 20% oil (v / v) + 5% thyme oil (v / v), third marinade 75% milk (v / v) + 20% oil (v / v) + 5% thyme oil (v / v), fourth marinade 50% yogurt (w / v) + 25% milk (v / v) + 20% fat (v / v) + 5% thyme oil (v / v) and fifth marinade 95% fat (v / v) + 5% thyme oil (v / v). Experimental design for marinated beef samples is presented in Table 1.

**Table 1.** Experimental design of marinated beef samples

Treatment	Explanation
Co	Control (Unmarinated meat)
Le	Beef marinated with 75% lemon + 20% sunflower oil + 5% thyme oil
Vi	Beef marinated with 75% vinegar + 20% sunflower oil + 5% thyme oil
Mi	Beef marinated with 75% milk + 20 % sunflower oil + 5% thyme oil
YoMi	Beef marinated with 50% yoghurt + 25% milk + 20% sunflower oil + 5% thyme oil
O	Beef marinated with 95% sunflower oil + 5% thyme oil

### Antioxidant assays for marinades

#### *Total phenolic content*

The total phenolic content of the samples was spectroscopically measured using Folin–Ciocalteu reagent according to Anton et al. (2009). 0.5 g of the sample was mixed with 12.5 ml of acetone-water mixture (4: 1) (v/v) in a magnetic stirrer for 2 hours. Then, the samples were centrifuged at 3000xg for 12 minutes and 1/20 dilutions of the supernatants were used for analysis.

In the presence of phenolic compounds, color change occurs by reduction of Folin-Ciocalteu reagent with the aid of sodium carbonate. 0.2 ml of acetone-water extract sample was mixed with 1.5 ml of 10 times diluted Folin-

Ciocalteau reagent. After waiting 5 minutes, 1.5 ml of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 g/L) was added. The reaction was allowed to proceed at room temperature in the dark for 90 minutes. The absorbance values were read at 725 nm using a UV-Visible spectrophotometer. The standard curve was prepared with gallic acid (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid) and the results were given in mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry matter.

#### *DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) radical scavenging assay*

DPPH radical solution was prepared by dissolving 5 mg of DPPH in 200 mL of 80% methanol. 500 µl of sample (prepared by the same extraction procedure mentioned in total phenolic content analysis) was mixed with 3.5 ml of methanol DPPH solution by vortex. After standing for 1 hour in the dark at room temperature, absorbance values of the samples were measured at 517 nm and the results were calculated using the equation below (Brand-Williams et al., 1995; Rodriguez et al., 2002).

$$\% \text{ Inhibition} = (C - S/C) \times 100$$

C: Absorbance of the control at 517 nm

S: Absorbance of the sample at 517 nm

#### **pH**

The pH values of the samples were determined by adding 9 ml of deionized water into 1 g beef sample and then dipping the pre-calibrated pH electrode into the homogenized solution and reading the value (Vural and Öztan, 1996).

#### **Lipid oxidation analysis**

Lipid oxidation levels of the marinated beef samples during 12 days of storage was determined using the TBARS (2-thiobarbituric acid reagents) method described in Mohamed and Mansour (2012). Accordingly, 5 g of sample was homogenized with 15 ml of deionized water. 1 ml of homogenate was transferred to the test tube and 50 µl of butylated hydroxytoluene (7.2 g / 100 g) and 2 ml of 2-thiobarbituric acid (TBA) - trichloroacetic acid (TCA) (15 mM TBA-15 g / 100 g TCA) were added. The mixture was stirred with a vortex mixer and then incubated for 15 minutes in a boiling water bath for color formation. The samples were then cooled in cold water for 10 minutes, vortexed again, and centrifuged at 2500 g for 15 minutes. The absorbance of the resulting supernatant solution was determined at 531 nm. 1 ml of deionized water and 2 ml of TBA-TCA solution were used for the blind experiment and the TBARS values were given in milligrams malondialdehyde (MDA) per kilogram sample.

#### **Color analysis**

The color values of the samples were determined by measuring the CIE L\* (brightness), a\* (redness-greens), b\* (yellowness-blue) and ΔE values using a chroma meter (Konica Minolta, CR-400, Japan). The device was calibrated with a white base and readings were made from four randomly selected surfaces.

#### **In vitro digestion**

In vitro digestion was performed according to the method described in Mennah-Govela and Bornhorst (2016). The beef samples were weighed into aluminum containers before digestion and cooked in an oven at 180°C for 20 minutes.

#### *Simulated oral and gastric solutions formulations*

The simulated saliva (oral solution) was mixed with 1 g / L of mucin, 1.8 g / l α-amylase, 0.117 g / l NaCl, 0.149 g / l KCl and 2.10 g / l NaHCO<sub>3</sub> in deionized water. The pH of the solution was adjusted to 7.0 using 0.01 N NaOH. The stomach solution was similarly formed by mixing 1.5 g / l of mucin, 8.78 g / l of NaCl and 1.0 g / l of pepsin in deionized water.

#### *Mouth and stomach digestive conditions*

The cubed chopped sample (25g) was placed into a 250 ml beaker and the oral solution (0.2mL oral solution / g sample) was added and shaken gently for 30 seconds. Immediately after mixing, 125 ml of gastric solution (preheated to 37°C) was added to the beaker, the surface of the beaker was covered with aluminum foil and placed in a shaking water bath (37°C, 100 rpm) and held for 120 minutes.

### Texture analysis

Hardness values of marinated meat samples and control were determined by a texture analyzer (TA.HD Plus Texture Analyzer Texture Technologies Corp., Hamilton, MA, U.S.A.) before and after in vitro gastric digestion. Cube shaped samples were compressed by a 0.036 m diameter cylinder probe with a test speed of 0.001 m/s and 50% strain. The analysis was repeated 4 times for each sample and mean values were calculated.

### NMR relaxometry analysis

Protein structure is altered in digested samples, so it is possible to detect these changes from NMR relaxation times. Time Domain NMR Relaxometry (Spin Track, Russia) experiments were performed at Middle East Technical University Food Engineering Laboratory. 0.5 Tesla (20.34 MHz) system (Spin Track GmbH, Kirchheim/Teck, Germany) and CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) sequence was used to measure monoexponential transverse relaxation times T<sub>2</sub>.

### Statistical analysis

Statistical analysis of the differences between the samples and the changes during the storage period and also before and after digestion were carried out using ANOVA method in Minitab 16 package program and Tukey multiple comparison test was applied to the variables that are found significant at 95% confidence interval.

## RESULTS and DISCUSSION

Total phenolic content and antioxidant capacity values of marinades are given in Table 2. Total phenolic content of the marinades prepared with lemon (LE) and sunflower oil (O) were similar ( $p > 0.05$ ) and higher than the other treatments ( $p < 0.05$ ). The marinades including apple cider vinegar, milk and milk-yoghurt mix gave the similar total phenolic amount ( $p > 0.05$ ). Although significant differences were found among all the total phenolic content values, antioxidant capacity (DPPH radical scavenging) of the samples were found to be similar ( $p > 0.05$ ).

**Table 2.** Total phenolic content and antioxidant capacity values of marinades

Treatment	Total phenolic content (mg gallic acid/ml sample)	Antioxidant capacity (DPPH) (%)
Le	0.29 <sup>a</sup> ± 0.03	44.91 <sup>a</sup> ± 4.59
Vi	0.16 <sup>b</sup> ± 0.05	36.35 <sup>a</sup> ± 7.85
Mi	0.14 <sup>b</sup> ± 0.02	48.51 <sup>a</sup> ± 7.35
YoMi	0.09 <sup>b</sup> ± 0.00	41.43 <sup>a</sup> ± 3.97
O	0.28 <sup>a</sup> ± 0.02	46.74 <sup>a</sup> ± 1.00

<sup>ab</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p > 0.05$ ).  
± Standard deviation

Color values of beef samples are shown in Table 3. Significant differences were found among the treatments in terms of L\*, a\* and ΔE values ( $p < 0.05$ ), while b\* values of all the samples were similar ( $p > 0.05$ ). It was remarkable that the a\* values of the treatments Le and Vi were lower than the others ( $p < 0.05$ ). High acidity of lemon and vinegar may affect the red color of the meat samples.

**Table 3.** Color values of beef samples

Treatment	L*	a*	b*	ΔE
Co	36.22 <sup>c</sup> ± 2.26	18.88 <sup>a</sup> ± 6.10	12.88 <sup>a</sup> ± 3.62	29.00 <sup>b</sup> ± 5.35
Le	44.16 <sup>b</sup> ± 1.71	7.96 <sup>b</sup> ± 2.18	9.59 <sup>a</sup> ± 1.61	30.47 <sup>b</sup> ± 1.92
Vi	42.15 <sup>bc</sup> ± 4.05	9.15 <sup>b</sup> ± 1.83	10.45 <sup>a</sup> ± 3.54	28.87 <sup>b</sup> ± 5.24
Mi	46.07 <sup>ab</sup> ± 5.14	20.13 <sup>a</sup> ± 3.29	13.65 <sup>a</sup> ± 2.09	37.17 <sup>ab</sup> ± 6.55
YoMi	51.66 <sup>a</sup> ± 1.64	16.78 <sup>ab</sup> ± 7.01	14.34 <sup>a</sup> ± 4.20	41.28 <sup>a</sup> ± 2.74
O	42.99 <sup>bc</sup> ± 2.28	18.91 <sup>a</sup> ± 2.37	12.33 <sup>a</sup> ± 0.76	33.93 <sup>ab</sup> ± 1.70

<sup>a-c</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p > 0.05$ ).  
± Standard deviation

pH values of the treatments were measured during 12 days of storage at 4°C and presented in Table 4. The treatment including apple cider vinegar had the lowest pH at the beginning of storage ( $p < 0.05$ ). On the same day the treatment with lemon had the second lowest pH value ( $p < 0.05$ ). These two treatments also had lower pH than the others at each measurement time of the storage ( $p < 0.05$ ). This result was expected because of their high acidic nature. As the pH change trend of each sample was compared during 12 days, it was obvious that pH of Co, Vi, Mi and O increased on the last day of storage ( $p < 0.05$ ) owing to the microbial growth ( $p < 0.05$ ).

Burke and Monahan (2013) stated that mean pH values of shin beef strips decreased from 5.7 to 3.1 when they immersed in the citrus juice marinade (31% orange juice, 31% lemon juice, 38% distilled water). Thus, similar effect was observed by an acidic marinade as in this study.

**Table 4.** pH Values of Meat Samples During Storage at 4°C

Treatment	Storage time (day)			
	0	5	8	12
Co	5.69 <sup>aB</sup> ± 0.11	5.55 <sup>aB</sup> ± 0.01	5.74 <sup>aB</sup> ± 0.00	6.26 <sup>aA</sup> ± 0.19
Le	4.28 <sup>dA</sup> ± 0.02	4.06 <sup>eB</sup> ± 0.05	3.99 <sup>fC</sup> ± 0.02	4.06 <sup>cB</sup> ± 0.01
Vi	4.18 <sup>eB</sup> ± 0.02	4.19 <sup>dB</sup> ± 0.03	4.16 <sup>eB</sup> ± 0.00	4.29 <sup>cA</sup> ± 0.01
Mi	5.61 <sup>aB</sup> ± 0.02	5.54 <sup>abC</sup> ± 0.02	5.50 <sup>bC</sup> ± 0.01	6.16 <sup>aA</sup> ± 0.04
YoMi	5.29 <sup>cA</sup> ± 0.01	5.26 <sup>cA</sup> ± 0.01	5.27 <sup>dA</sup> ± 0.01	5.35 <sup>bA</sup> ± 0.20
O	5.46 <sup>bB</sup> ± 0.01	5.49 <sup>bB</sup> ± 0.02	5.41 <sup>cB</sup> ± 0.01	6.41 <sup>aA</sup> ± 0.09

<sup>a-f</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p > 0.05$ ).  
<sup>A-C</sup> Means within each line followed by the same superscript letters are not different ( $p > 0.05$ ).  
± Standard deviation

Lipid oxidation level of the treatments were determined by TBARS analysis during storage and given as in the unit of mg malondialdehyde/kg sample in Table 5. It was interesting that TBARS values of all the treatments were found to be similar on the last day of storage ( $p > 0.05$ ). The TBARS value of the control sample was stable throughout 8 days of storage ( $p > 0.05$ ), however it ascended on the last day ( $p < 0.05$ ). The same trend was observed in the treatments Le and Vi as well. Lipid oxidation level of Mi and YoMi did not alter during storage ( $p > 0.05$ ). Pietrasik et al. (2013) found that TBARS values of some emulsion injected steaks were higher than the non-injected samples ( $p < 0.05$ ), but did not find a significant difference among others ( $p > 0.05$ ). They indicated that oxidative stability of steaks during refrigerated aerobic storage was dependant on muscle type and the differences among the beef muscles could be due to variation in the biochemical characteristics of the muscles. Toomik et al. (2012)

stated that the highest degree of oxidation occurred in acetic acid and lactic acid marinades, whereas the oxidation was significantly suppressed by citric and ascorbic acids.

**Table 5.** TBARS Values of Meat Samples During Storage at 4°C (mg malondialdehyde/kg sample )

Treatment	Storage time (day)			
	0	5	8	12
Co	0.23 <sup>bB</sup> ± 0.01	0.31 <sup>aB</sup> ± 0.08	0.32 <sup>abB</sup> ± 0.07	0.80 <sup>aA</sup> ± 0.28
Le	0.15 <sup>bB</sup> ± 0.02	0.22 <sup>aB</sup> ± 0.07	0.30 <sup>abB</sup> ± 0.10	0.78 <sup>aA</sup> ± 0.37
Vi	0.46 <sup>aAB</sup> ± 0.10	0.31 <sup>aB</sup> ± 0.19	0.25 <sup>bB</sup> ± 0.06	0.88 <sup>aA</sup> ± 0.41
Mi	0.45 <sup>aA</sup> ± 0.03	0.32 <sup>aA</sup> ± 0.05	0.58 <sup>aA</sup> ± 0.30	0.93 <sup>aA</sup> ± 0.67
YoMi	0.52 <sup>aA</sup> ± 0.21	0.24 <sup>aA</sup> ± 0.05	0.29 <sup>abA</sup> ± 0.06	0.52 <sup>aA</sup> ± 0.19
O	0.13 <sup>bB</sup> ± 0.00	0.41 <sup>aAB</sup> ± 0.13	0.58 <sup>aA</sup> ± 0.11	0.67 <sup>aA</sup> ± 0.37

<sup>a-b</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).

<sup>A-B</sup> Means within each line followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).  
± Standard deviation

Hardness values of the beef samples before and after in vitro gastric digestion is given in Table 6. The hardness level of all the treatments had similarity to control sample before in vitro gastric digestion ( $p>0.05$ ). However, control became the hardest sample after digestion ( $p<0.05$ ). The texture values of Le Vi and O did not change after digestion ( $p>0.05$ ). It is clearly seen that marinade type and gastric digestion had an effect on some samples. In the study of Burke and Monahan (2013), they measured the texture using Warner–Bratzler shear force and found that the value of the samples decreased ( $p<0.05$ ) after marination with citrus juice marinade. Pietrasik et al. (2013) noted that canola oil emulsion injection significantly reduced shear force of muscles ( $p<0.05$ ).

**Table 6.** Hardness values of beef samples (N)

Treatment	Before digestion	After digestion
Co	63.07 <sup>abB</sup> ± 2.24	76.24 <sup>aA</sup> ± 5.03
Le	38.91 <sup>bA</sup> ± 7.43	39.12 <sup>cA</sup> ± 8.90
Vi	46.29 <sup>bA</sup> ± 15.18	34.97 <sup>cA</sup> ± 3.75
Mi	83.70 <sup>aA</sup> ± 8.09	45.84 <sup>bcB</sup> ± 11.06
YoMi	55.11 <sup>bB</sup> ± 2.20	59.66 <sup>abA</sup> ± 1.99
O	44.01 <sup>bA</sup> ± 21.73	57.60 <sup>bA</sup> ± 9.25

<sup>a-c</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).

<sup>A-B</sup> Means within each line followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).  
± Standard deviation

Two peaks related to T2 were obtained from the samples by NMR Relaxometry experiment and T2 times were given both for before and after in vitro gastric digestion in Table 7. There were significant differences in T2-1 and T2-2 of the samples before and after digestion ( $p<0.05$ ). These two T2 times probably caused by the protein-protein, protein-fat or protein-water interactions in the samples. Although it was not possible to interpret the reason of the results obtained, T2 times could be used to differentiate the samples, but further study is needed at this part.



**Table 7.** T2-1 and T2-2 times measured before and after gastric digestion of beef samples

Treatment	T2-1 (ms)		T2-2 (ms)	
	Before digestion	After digestion	Before digestion	After digestion
Co	15.5 <sup>bA</sup>	12.5 <sup>cA</sup>	35.0 <sup>cA</sup>	31.0 <sup>cA</sup>
Le	22.5 <sup>aA</sup>	17.5 <sup>abA</sup>	74.5 <sup>aA</sup>	41.0 <sup>bcB</sup>
Vi	23.5 <sup>aA</sup>	21.0 <sup>aA</sup>	57.5 <sup>abcA</sup>	52.0 <sup>bcA</sup>
Mi	16.5 <sup>bA</sup>	16.0 <sup>bcA</sup>	62.0 <sup>abA</sup>	74.5 <sup>aA</sup>
YoMi	13.5 <sup>bB</sup>	16.0 <sup>bcA</sup>	45.0 <sup>bcA</sup>	60.5 <sup>abA</sup>
O	16.5 <sup>bA</sup>	14.0 <sup>bcA</sup>	52.5 <sup>abcA</sup>	54.0 <sup>abA</sup>

<sup>a-c</sup> Means within each column followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).

<sup>A-B</sup> Means within each line followed by the same superscript letters are not different ( $p>0.05$ ).

± Standard deviation

## CONCLUSION

In this study, beef samples were marinated by using lemon, apple cider vinegar, milk, yogurt-milk mix and sunflower oil. Thyme oil was also used for enhancing the antioxidant activity of the marinades. Although significant differences were found among the total phenolic content of the marinades ( $p<0.05$ ), their DPPH radical scavenging capacity was similar ( $p>0.05$ ). There was no difference among the  $b^*$  values of the samples ( $p>0.05$ ), while differences were determined in  $L^*$  and  $a^*$  values ( $p<0.05$ ), particularly the lower  $a^*$  values of the treatments including lemon and apple cider vinegar were remarkable. The same treatments had lower pH values during 12 days of refrigerated storage and pH of the most samples on 8th day was ascended on day 12 probably due to high microbial growth. Lipid oxidation levels of control and high acidic samples were stable up to day 8, but then increased on the last day ( $p<0.05$ ). TBARS of all the samples were found to be similar at the end of storage ( $p>0.05$ ). Hardness value was affected by in vitro gastric digestion only in control and in the treatments including milk and yoghurt-milk mixture ( $p<0.05$ ). Results also showed that the behavior of the samples against to marination and in vitro gastric digestion could be differentiated by T2 values obtained from NMR relaxometry. Further studies including microbiological analyzes may better illuminate the effects of the marinades on meat.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Author thanks to Şeyda Poyraz, Melike Tuğçe Yeniköse, Ceylan Doğan and Deniz Mercan Karataş for their help while doing the experiments. Author also kindly thanks to Dr. H. Mecit Oztop from METU Food Engineering Department for opening his laboratory to conduct the NMR Relaxometry analysis.

## REFERENCES

- Alvarado C, McKee, S 2007. Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. *Journal of Applied Poultry Research*, 16: 113–120.
- Anton AA, Fulcher RG, Arntfield SD 2009. Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) flour: effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry*, 113: 989–996.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28: 25–30.
- Burke RM, Monahan FJ 2003. The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade. *Meat Science*, 63: 161–168.
- Das H 2002. Effect of marination, packaging and storage period on quality and stability of hurdle processed chevon at refrigeration. *Journal of Food Science and Technology*, 39: 507–514.

- Das H, Jayaraman S 2003. Preservation of chicken curry by hurdle technology and its storage evaluation. *Indian Food Packer*, 57: 50–58.
- Ersus S, Oztop MH, McCarthy MJ, Barrett DM 2010. Disintegration efficiency of pulsed electric field induced effects on onion (*Allium cepa* L.) tissues as a function of pulse protocol and determination of cell integrity by <sup>1</sup>H-NMR relaxometry. *Journal of Food Science*, 75 (7): E444-452.
- Goli T, Ricci J, Bohuon P, Marchesseau S, Collignan A 2014. Influence of sodium chloride and pH during acidic marination on water retention and mechanical properties of turkey breast meat, *Meat Science*, 96: 1133–1140.
- Karam L, Roustom R, Abiad MG, El-Obeid T, Savvaidis IN 2019. Combined effects of thymol, carvacrol and packaging on the shelf-life of marinated chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 291: 42–47.
- Karyotis D, Skandamis PN, Juneja VK 2017. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Research International*, 100: 894–898.
- Kirtil E, Oztop MH 2015. <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Relaxometry and Magnetic Resonance Imaging and Applications in Food Science and Processing. *Food Engineering Reviews*, 8:1-22.
- Kirtil E, Oztop MH, Sirijariyawat A, Ngamchuachit P, Barrett DM, McCarthy MJ 2014. Effect of pectin methyl esterase (PME) and CaCl<sub>2</sub> infusion on the cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes: An NMR relaxometry study. *Food Research International*, 66:409-416.
- Mennah-Govela YA, Bornhorst GM 2016. Acid and moisture uptake in steamed and boiled sweet potatoes and associated structural changes during in vitro gastric digestion. *Food Research International*, 88(Part B): 247–255.
- Mohamed HMH, Mansour HA 2012. Incorporating essential oils of marjoram and rosemary in the formulation of beef patties manufactured with mechanically deboned poultry meat to improve the lipid stability and sensory attributes. *LWT-Food Science and Technology*, 45: 79-87.
- Narayan R, Mendiratta SK, Mane BG 2015. Effects of citric acid, cucumis powder and pressure cooking on quality attributes of goat meat curry. *Journal of Food Science and Technology*, 52: 1772–1777.
- Oztop MH, McCarthy KL, McCarthy MJ, Rosenberg M 2012. Uptake of divalent ions (Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>) by heat-set whey protein gels. *Journal of Food Science*, 77(2), E68-73.
- Oztop MH, McCarthy KL, McCarthy MJ, Rosenberg M 2014. Monitoring the effects of divalent ions (Mn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>) in heat-set whey protein gels. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1): 93–100.
- Oztop MH, Rosenberg M, Rosenberg Y, McCarthy KL, McCarthy MJ 2010. Magnetic resonance imaging (MRI) and relaxation spectrum analysis as methods to investigate swelling in whey protein gels. *Journal of Food Science*, 75(8): E508-515.
- Pietrasik Z, Wang H, Janz JAM 2013. Effect of canola oil emulsion injection on processing characteristics and consumer acceptability of three muscles from mature beef. *Meat Science*, 93: 322–328.
- Rodriguez MV, Medina LM, Jordano R 2002. Prolongation of shelf life of sponge cakes using modified atmosphere packaging. *Acta Alimentaria*, 31: 191-196.
- Toomik P, Lepp K, Lepasalu L, Püssa T 2012. The effect of tenderizing acids on linoleic acid oxidation during marination of pork. *Meat Science*, 92:870–873.
- Vural H, Öztan A 1996. Et ve Ürünleri Kalite Kontrol Laboratuvarı Uygulama Kılavuzu. Ankara: Hacettepe University Faculty of Engineering Publications No: 36, 236 pp.
- Wichchukit S, Oztop MH, McCarthy MJ, McCarthy KL 2013. Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component. *Food Hydrocolloids*, 33: 66–73.

## Synthesis of TiO<sub>2</sub> based nanocomposites and their Supercapacitor Applications

Murat Ates<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tekirdag Namik Kemal University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Tekirdag, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [mates@nku.edu.tr](mailto:mates@nku.edu.tr)

### Abstract

In this study, TiO<sub>2</sub> based nanocomposites were synthesized by many researchers in literature. We reviewed many papers about supercapacitors. Titanium carbide, titanium nitride, titanium dioxide can be used in many nanocomposites as an electroactive materials. In addition, rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposites were synthesized and characterized by FTIR-ATR, SEM-EDX, CV, GCD and EIS analysis. The highest specific capacitances of rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposites were calculated as C<sub>sp</sub>= 431.23 F/g at [rGO]<sub>o</sub>/[Py]<sub>o</sub>= 1/1 at 10 mV/s.

**Keywords:** Supercapacitor, Titanium carbide, titanium nitride, titanium dioxide, pseudocapacitance.

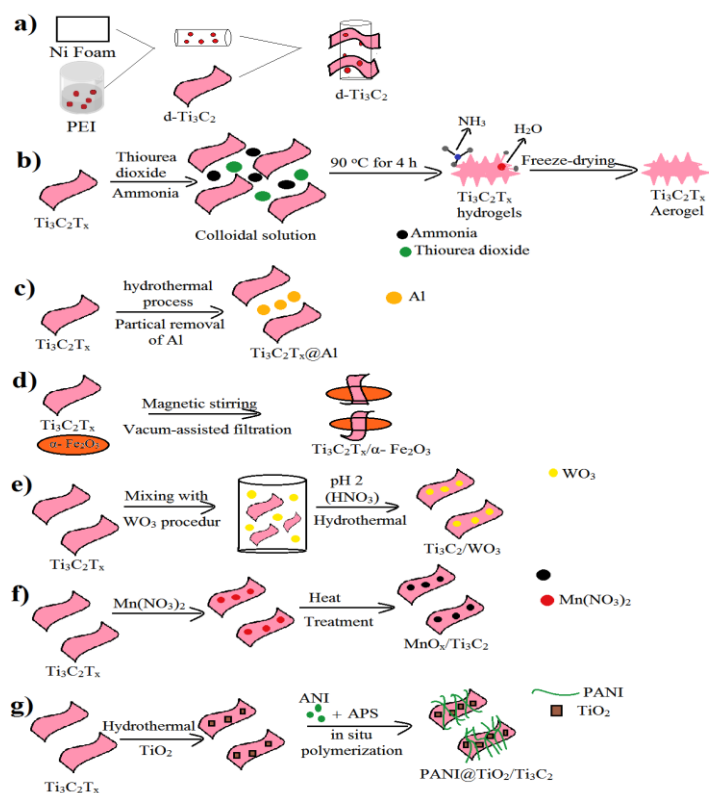
### INTRODUCTION

New design of TiO<sub>2</sub> based nanocomposites are used in supercapacitors to enhance the energy and power density stored in the electrodes (Raza et al., 2018; Muzaffar et al., 2019). Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is shown in TiO<sub>2</sub> based supercapacitor, carbon/TiO<sub>2</sub> based supercapacitor, metal/TiO<sub>2</sub> based supercapacitor, conducting polymer / TiO<sub>2</sub> based supercapacitor, and ternary nanocomposite of TiO<sub>2</sub> based supercapacitor. Pseudocapacitors are used in metal oxides and conducting polymers as electroactive materials with reversible Faradaic redox reactions (Movil et al., 2015). In literature, pore size of TiO<sub>2</sub> nanoparticles can be affected by many factors such as pH value etc. So, it can be controlled by many parameters to synthesize higher pore size materials (Mahsrid et al., 2007). TiO<sub>2</sub> nano materials have been presented in many papers such as sol-gel (Arnal et al., 1997), solvothermal (Kim et al., 2003), and hydrothermal (Kolen et al., 2004) etc. As a result, TiO<sub>2</sub> based nano-materials enhance the electro-activity of supercapacitor electrode, and may be used in real device applications.

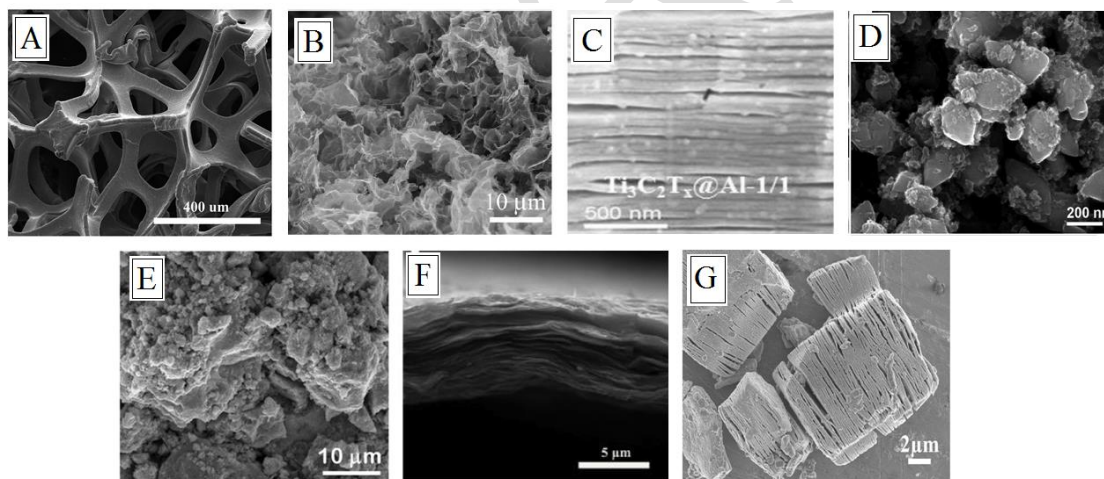
### MATERIALS AND METHODS

**Table 17.** Capacitance results of Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> obtained from literature.

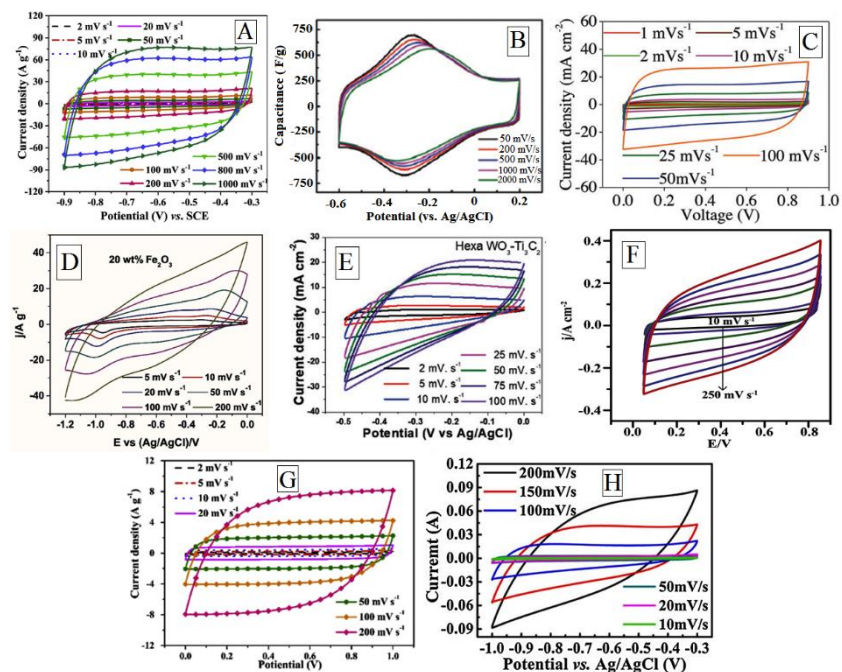
Materials	Electrolyte	Capacitance	Reference
Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> T <sub>x</sub> MWCNT sandwich	1 M MgSO <sub>4</sub>	120 Fg <sup>-1</sup> at 200 mVs <sup>-1</sup>	(Zhao et al.,2015)
400-KOH- Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 Fg <sup>-1</sup> at 100 mVs <sup>-1</sup>	(Li et al.,2017)
N- Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> T <sub>x</sub>	1 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	415.0 F g <sup>-1</sup> at 2 mV s <sup>-1</sup>	(Tian et al.,2019)
TiO <sub>2</sub> -Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	6 M KOH	120 Fg <sup>-1</sup> at 100 mVs <sup>-1</sup>	(Zhu et al.,2016)
Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> T <sub>x</sub> "clay"	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	245 Fg <sup>-1</sup> at 2 mVs <sup>-1</sup>	(Ghidu et al.,2014)
Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> T <sub>x</sub> /PPy	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	416 Fg <sup>-1</sup> at 5 mVs <sup>-1</sup>	(Boota et al.,2016)
Ti <sub>3</sub> C <sub>2</sub> T <sub>x</sub> /ZnO	1 M KOH	120 Fg <sup>-1</sup> at 2 mVs <sup>-1</sup>	(Whang et al.,2016)



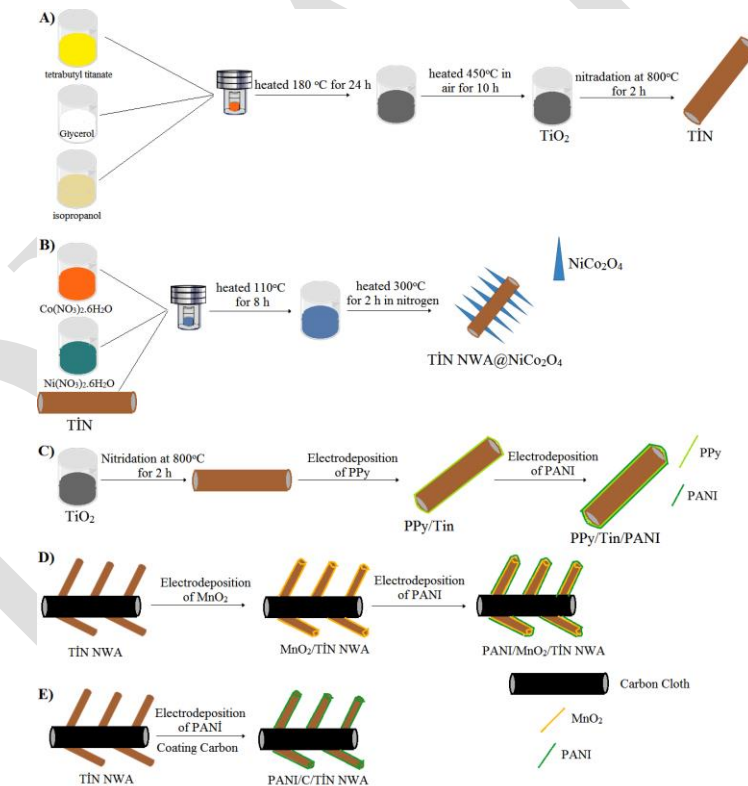
**Figure 36.** Synthesis procedure of a)  $Ti_3C_2$  b) 3D  $Ti_3C_2T_x$  aerogel c)  $Ti_3C_2T_x@Al$  d)  $Ti_3C_2T_x/\alpha-Fe_2O_3$  e) 2D  $Ti_3C_2/WO_3$  f)  $MnO_x/Ti_3C_2$  g)  $PANI@TiO_2/Ti_3C_2T_x$  supercapacitor.



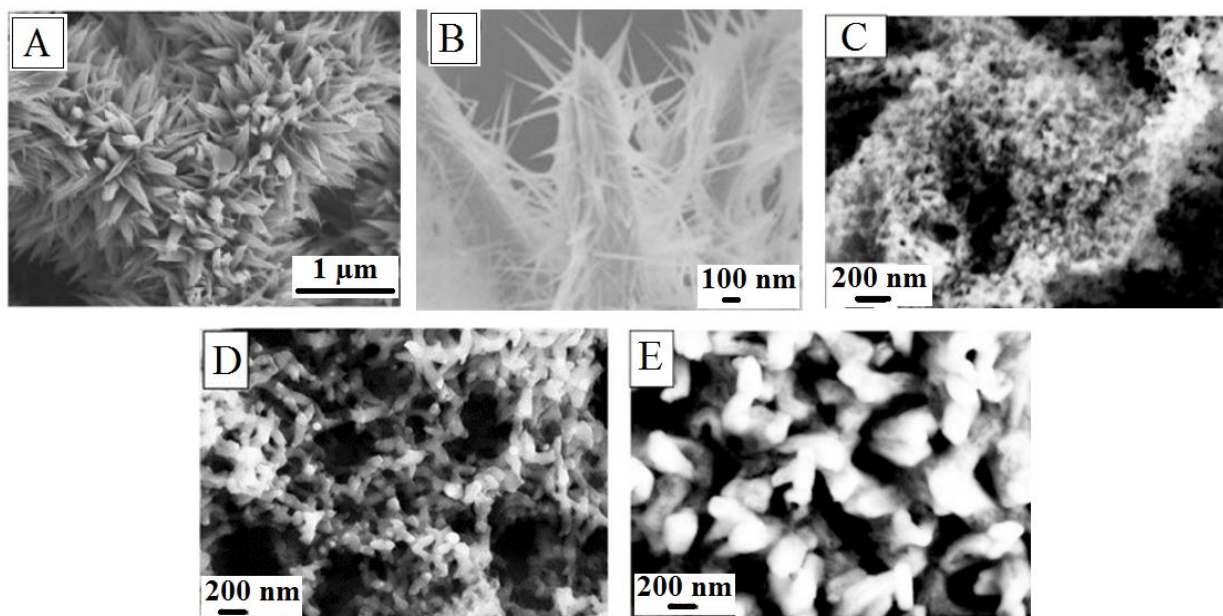
**Figure 2.** morphology of a)  $Ti_3C_2$  (Tian et al., 2017) b) 3D  $Ti_3C_2T_x$  aerogel (Wang et al., 2018) c)  $Ti_3C_2T_x@Al$  (Guo et al., 2018) d)  $Ti_3C_2T_x/\alpha-Fe_2O_3$  (Zou et al., 2018) e) 2D  $Ti_3C_2/WO_3$  (Ambade et al., 2018) f)  $MnO_x/Ti_3C_2$  (Tian et al., 2017) g)  $PANI@TiO_2/Ti_3C_2T_x$  (Lu et al., 2017) supercapacitor.



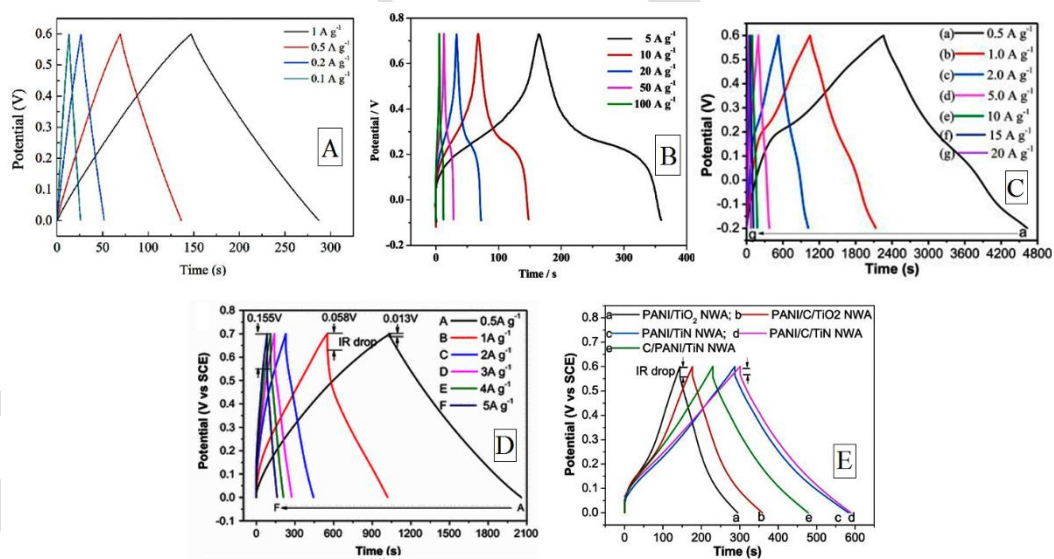
**Figure 3.** CV graphs of a)  $T_3C_2$  b) 3D  $Ti_3C_2T_x$  aerogel c)  $Ti_3C_2T_x@Al$  d)  $Ti_3C_2T_x/\alpha-Fe_2O_3$  e) 2D  $Ti_3C_2/WO_3$  f)  $MnO_2/Ti_3C_2T_x$  (Jiang et al.,2018) g)  $MnO_x/Ti_3C_2$  h) PANI@ $TiO_2/Ti_3C_2T_x$  supercapacitor.



**Figure 4.** Synthesis procedure of a) CL-TiN(Hou et al.,2018), b) TiN@NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(Liu et al.,2017), c) PPy/TiN/PANI(Xie et al.,2016), d) PANI/MnO<sub>2</sub>/TiN NWA(Xia et al.,2015), e) PANI/C/TiN NWA(Xie et al.,2015).



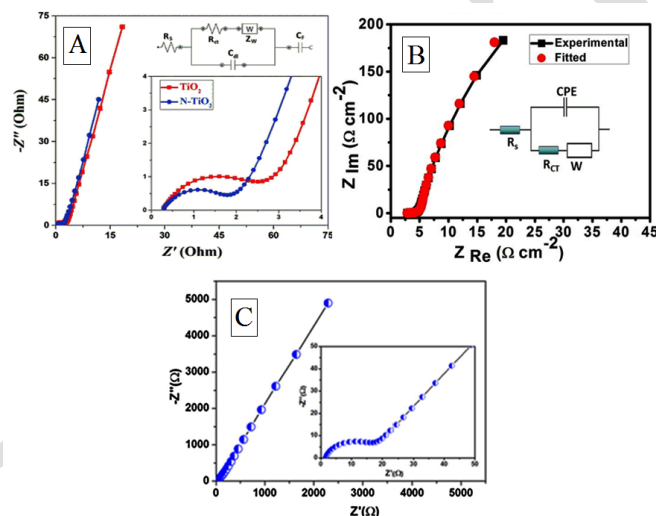
**Figure 5.** Morphology of a) CL-TiN b) TiN@NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> c) PPy/TiN/PANI d) PANI/MnO<sub>2</sub>/TiN NWA e) PANI/C/TiN NWA.



**Figure 6.** GCD graphs of a) CL-TiN b) TiN@NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> c) PPy/TiN/PANI d) PANI/MnO<sub>2</sub>/TiN NWA e) PANI/C/TiN NWA.

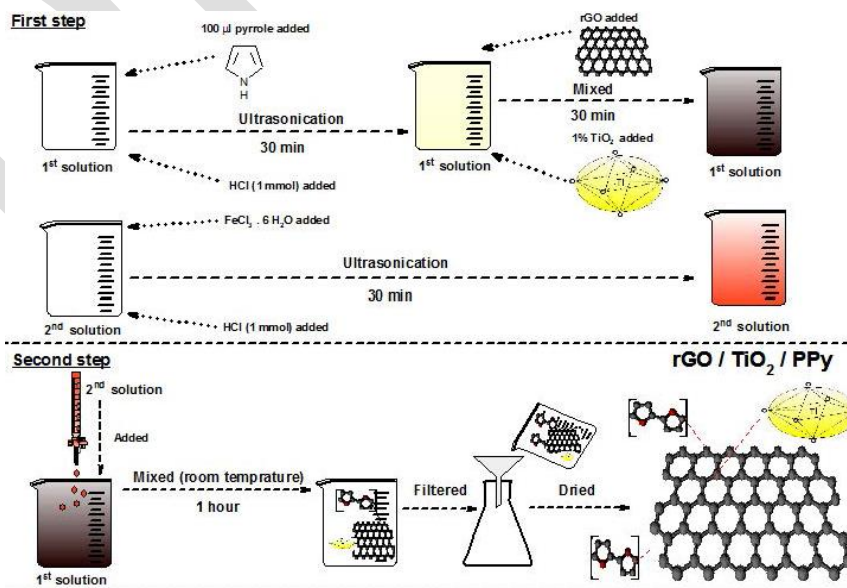
**Table 2.** Capacitance results of TiN obtained from literature.

Materials	Electrolyte	Capacitance	Reference
PPy-TiN	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1265 Fg <sup>-1</sup> at 0.6 Ag <sup>-1</sup>	(Du et al.,2014)
G/TiN	1 M KOH	333.7 Fg <sup>-1</sup> at 1 Ag <sup>-1</sup>	(Tian et al.,2014)
PANI/TiN core-shell	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1064.5 Fg <sup>-1</sup> at 1 Ag <sup>-1</sup>	(Xia et al.,2014)
TiN/C	6 M KOH	159 Fg <sup>-1</sup> at 0.5 Ag <sup>-1</sup>	(Wang et al.,2019)
TiN/VN	1 M KOH	170 Fg <sup>-1</sup> at 2 mVs <sup>-1</sup>	(Dong et al.,2011)
TiVN	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	69.6 Fg <sup>-1</sup> at 5 mVs <sup>-1</sup>	(Thampi et al.,2018)

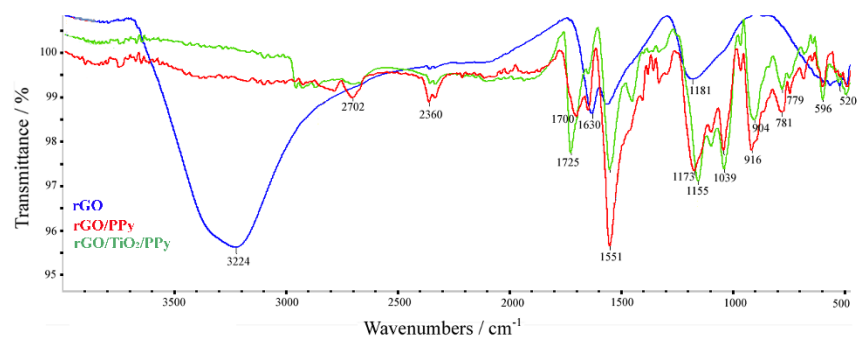


**Figure 7.** EIS measurement of a) TiO<sub>2</sub> and N-TiO<sub>2</sub> b) TiO<sub>2</sub> nanotube c) b- TiO<sub>2</sub>.

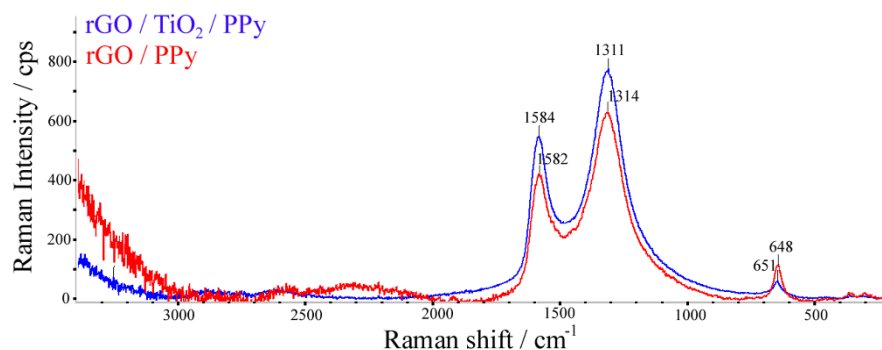
## RESULTS and DISCUSSION



**Figure 8.** The synthesis procedure of rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposite.



**Figure 9.** FTIR-ATR images of rGO, rGO/PPy and rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposites.



**Figure 10.** Raman spectroscopy of rGO, rGO/PPy and rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposites

## CONCLUSION

A ternary rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposites were done via chemical polymerization technique. rGO, rGO/PPy and rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy materials were examined by Raman spectroscopy, FTIR-ATR, SEM-EDX, CV, GCD, and EIS methods. The highest specific capacitance of rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy was obtained as  $C_{sp} = 431.23$  F/g for  $[rGO]_o/[Py]_o = 1/1$  at 10 mV/s. The specific capacitances of rGO and rGO/PPy nanocomposite show as  $C_{sp} = 93.18$  and 122.14 F/g, respectively. A good cycling stability was obtained for rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy nanocomposite as ~100% capacitance retention after 1000 cycles. rGO/TiO<sub>2</sub>/PPy can be used as a candidate for supercapacitor evaluations.

## REFERENCES

- Raza W, Ali F, Raza N, Luo Y, Kim KH., Yang J, Kumar S, Mehmood A, Kwon EE 2018. Recent advancements in supercapacitor technology. *Nano Energy*, 52: 441–473.
- Muzaffar A, Ahamed MB, Deshmukh K, Thirumalai J 2019. A review on recent advances in hybrid supercapacitors: Design, fabrication and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 101: 123-145.
- Movil O, Schadeck C, Staser JA 2015. Investigation of double layer and pseudocapacitance of surface modified ionic-liquid-functionalized graphene oxide. *J. Electroanal. Chem.*, 755: 127-135.
- Mahsrid S, Askari M, Chamsari MS 2007. Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by hydrolysis and peptization of titanium isopropoxide solution. *Journal of Materials Processing Technology*, 189: 296-300.
- Arnal P, Corriu RJP, Leclercq D, Mutin PH, Vioux A 1997. A solution chemistry study of nonhydrolytic sol-gel routes to titania. *Chem. Mater.*, 9: 694-698.
- Kim CS, Moon BK, Park JH, Choi BC, Seo HJ 2003. Solvothermal synthesis of nanocrystalline TiO<sub>2</sub> in toluene with surfactant. *J. Cryst. Growth*, 257: 309-315.
- Kolen'ko YV, Churagulov BR, Kunst M, Mazerolles L, Colbeau-Justin C 2004. Photocatalytic properties of titania powders prepared by hydrothermal method. *Appl. Catal. B: Environ.*, 54: 51-58.
- Zhao M, Ren CE, Ling Z, Lukatskaya MR, Zhang C, Van Aken KL, Barsoum MW, Gogotsi Y 2015. Flexible MXene/Carbon Nanotube Composite Paper with High Volumetric Capacitance, *Adv. Mater* 27: 339-345.



- Li J, Yuan X, Lin C, Yang Y, Xu L, Du X, Xie J, Lin J 2017. Achieving High Pseudocapacitance of 2D Titanium Carbide (MXene) by Cation Intercalation and Surface Modification, *J. Sun, Adv. Energy. Mater* 7: 1602725-1602733.
- Tian, Y, Que W, Luo Y, Yang C, Yin X, Kong L 2019. Surface Nitrogen-modified 2D Titanium Carbide (MXene) with High Energy Density for Aqueous Supercapacitor Applications, *J. Mate. Chem. A.* 7:5416-5425.
- Zhu J, Tang Y, Yang C, Wang F, Cao M 2016. Composites of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Deposited on Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> MXene Nanosheets with Enhanced Electrochemical Performance, *J. Electrochem. Soc.* 163:785-791.
- Ghidiu M, Lukatskaya MR, Zhao MQ, Gogotsi Y, Barsoum MW 2014. Conductive two-dimensional titanium carbide 'clay' with high volumetric capacitance, *Nature*, 516:78–81.
- Boota M, Anasori B, Voigt C, Zhao MQ, Barsoum MW, Gogotsi Y 2016. Pseudocapacitive Electrodes Produced by Oxidant-Free Polymerization of Pyrrole between the Layers of 2D Titanium Carbide (MXene), *Adv. Mater.*, 28:1517–1522.
- Wang F, Cao M, Qin Y, Zhu J, Wang L, and Tang Y 2016. ZnO nanoparticle-decorated two-dimensional titanium carbide with enhanced supercapacitive performance, *RSC Adv.*, 6:88934-88942.
- Tian Y, Yang C, Que W, He Y, Liu X, Luo Y, Yin X, Kong L. B 2017. Ni foam supported quasi-core-shell structure of ultrathin Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> nanosheets through electrostatic layer-by-layer self-assembly as high rate-performance electrodes of supercapacitors, *J. Power Sources* 369:78-86.
- Wang X, Fu Q, Wen J, Ma X, Zhu C, Zhang X, Qi D 2018. 3D Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> aerogels with enhanced surface area for high performance supercapacitors, *Nanoscale* 10:20828-20835.
- Guo M, Liu C, Zhang Z, Zhou J, Tang Y, Luo S 2018. Flexible Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub>@Al electrodes with Ultrahigh Areal Capacitance: In Situ Regulation of Interlayer Conductivity and Spacing, *Adv. Funct. Mater.* 28:1803196-1803205.
- Zou R, Quan H, Pan M, Zhou S, Chen D, Luo X 2018. Self-assembled MXene(Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub>)/ $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite as negative electrode material for supercapacitors, *Electrochim. Acta* 292:31-38.
- Ambade S. B, Ambade R. B, Eam W, Noh S. H, Kim S. H, Han T. H, 2018. 2D Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub> MXene/WO<sub>3</sub> Hybrid Architectures for High-Rate Supercapacitors, *Adv. Mater. Interfaces* 5:1801361-1801372.
- Tian Y, Yang C, Que W, Liu X, Kong L. B, 2017. Flexible and free-standing 2D titanium carbide film decorated with manganese oxide nanoparticles as a high volumetric capacity electrode for supercapacitor, *J. Power Sources* 359:332-339.
- Lu X, Zhu J, Wu W, Zhang B, 2017. Hierarchical architecture of PANI@TiO<sub>2</sub>/Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> ternary composite electrode for enhanced electrochemical performance, *Electrochim. Acta* 228:282-289.
- Jiang H, Wang Z, Yang Q, Hanif M, Wang Z, Dong L, Dong M, 2018. A novel MnO<sub>2</sub>/Ti<sub>3</sub>C<sub>2</sub>T<sub>x</sub> MXene nanocomposite as high performance electrode materials for flexible supercapacitors, *Electrochim. Acta* 290:695-703.
- Hou X, Li Q, Zhang L, Yang T, Chen S, Su L, 2018. Tunable preparation of chrysanthemum-like titanium nitride as flexible electrode materials for ultrafast charging/discharging and excellent stable supercapacitors, *J. Power Sources*, 396:319-326.
- Liu M, Yang T, Chen J, Su L, Chou K. C, Hou X, 2017. TiN @NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> coaxial nanowires as supercapacitor electrode materials with improved electrochemical and wide-temperature performance, *J. Alloys Compd.*, 692:605-613.
- Xie Y, Wang D, 2016. Supercapacitance performance of polypyrrole/titanium nitride/polyaniline coaxial nanotube hybrid, *J. Alloys Compd.*, 665:323-332.
- Xia C, Xie Y, Du H, Wang W, 2015. Ternary nanocomposite of polyaniline/manganese dioxide/ titanium nitride nanowire array for supercapacitor electrode, *J. Nanopart Res.* 17:30-42.
- Xie Y, Xia C, Du H, Wang W, 2015. Enhanced electrochemical performance of polyaniline/carbon/titanium nitride nanowire array for flexible supercapacitor, *J. Power Sources*, 286:561-570.
- Du H, Xie Y, Xia C, Wang W, Tian F, 2014. Electrochemical capacitance of polypyrrole– titanium nitride and polypyrrole–titania nanotube hybrids, *New J. Chem.*, 38:1284-1293.
- Tian F, Xie Y, Du H, Zhou Y, Xia C, Wang W, 2014. Preparation and electrochemical capacitance of graphene/titanium nitride nanotube array, *RSC Adv.*, 4:41856-41863.
- Xia C, Xie Y, Wang, W, Du H, 2014. Fabrication and electrochemical capacitance of polyaniline/titanium nitride core–shell nanowire arrays, *Synthetic metals*, 192:93-100.

- Wang T, Li K, An S, Song C, Guo X, 2019. Facile and green synthesis of TiN/C as electrode materials for supercapacitors, *Appl. Surf. Sci.*, 470:241-249.
- Dong S, Chen X, Gu L, Zhou X, Wang H, Liu Z, Han P, Yao J, Wang L, Cui G, Chen L, 2011. TiN/VN composites with core/shell structure for supercapacitors, 46, 6:835-839.
- Thampi VVA, Mithiyantham V, Kumar AKN, Martin P, Bendavid A, Subramanian B, 2018. Fabrication of sputtered titanium vanadium nitride (TiVN) thin films for micro-supercapacitors, *J. Mater. Sci- Mater. El.* 29:12457-12465.

DRAFT

## Investigation of edible starch film properties using malonic acid as crosslinking

Nedim Gürler<sup>1\*</sup>, Hamdi Temel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Munzur University, Tunceli Vocational School, Department of Organic Agriculture, Tunceli, Turkey

<sup>2</sup>Dicle University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Diyarbakir, Turkey

\* Corresponding author e-mail: [nedim2721@gmail.com](mailto:nedim2721@gmail.com)

### Abstract

In this study, the waste potato starch remaining in the washing water after peeling, slicing and washing was purified and cross-linked potato starch / malonic acid film was prepared by casting method. Mechanical, water uptake and moisture content properties of the obtained films were examined. Mechanical testing was performed according to ASTM D882-02 (American Society for Testing and Materials) by averaging at least 5 films. As a result of this mechanical test, the potato starch-malonic acid film mechanical test value was calculated as  $1.298 \pm 0.18$  MPa. The water uptake test of the films was performed according to ASTM D570 standard and the average of 3 films. Water uptake and moisture content results were  $90.82 \pm 5.01\%$  and  $21.25 \pm 0.84$ , respectively.

**Keywords:** Potato starch, crosslinking, mechanical properties.

### INTRODUCTION

In recent years, the accumulation of plastic waste has increased researchers' interest in biodegradable and compostable materials. Starch is popular because it is from edible sources, abundant and inexpensive among polymer groups to obtain biodegradable films (Seligra et al., 2016).

Starch consists of amylose and amylopectin. Amylose is a carbohydrate having a molecular weight of  $10^5$  to  $10^6$  anhydroglucose units and having  $\alpha$ -(1-4) bonds between glucose molecules. Amylopectin is  $10^7$  to  $10^9$  molecular weight and is  $\alpha$ -(1-6) branched carbohydrate (Basiak et al. 2017).

Starch has a hydrophilic character, poor moisture barrier property and high water sensitivity compared to conventional polymers, that limit their applications as alternative packaging (Averous and Boquillon 2004).

For improve this effect of starch, recently modified starch has been produced by crosslinking, etherification, esterification and acid hydrolysis (Mei and et al. 2015). It is cross-linked with cross-linking agents such as phosphorus oxychloride, sodium trimetaphosphate, sodium tripolyphosphate, epichlorohydrin and 1,2,3,4-diepoxybutane to improve the mechanical properties and water stability of starch and starch products (Reddy and Yang 2010).

Crosslinking was applied to improve starch performance in various applications. Here, the starch uses multifunctional group reagents (crosslinking agents) to react the hydroxyl groups, causing a new chemical bond between the molecular starch chains to form a different polymer network. As a result, the hydrophilic character decreases (Seligra and et al. 2016). Ramaraj (2006) reported that blended films improve their mechanical properties compared to non-crosslinked films.

In this study, mechanical and water barrier properties of starch were improved by using malonic acid as a crosslinking agent.

### MATERIALS and METHODS

#### Materials

Waste starch was supplied from the Environmental Engineering Department of Kahramanmaraş Sütçü İmam University. Malonic acid and glycerol were supplied from Alfa Easer and Acros respectively. Distilled distilled water was used in the studies. Hydrochloric acid, sodium hydroxide and hydrogen peroxide were obtained from Sigma-Aldrich. All chemicals are of analytical purity.

#### Production of pure potato starch (PPS) from waste starch

After the peeling, slicing and washing, the waste potato starch remaining in the washing water was removed and mixed with water at room temperature until it became homogeneous first. Then, NaOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are added to the

medium and mixed. Finally, the medium was neutralized by the addition of HCl (Dolaz and et al. 2017). The resulting solution was passed through sieves of different pore size to give pure potato starch (PPS).

### Preparation of cross-linked SPN-MA film

First, 16 mmol SPN was taken and left to the reaction flask and homogenized. Subsequently, 8 mmol of malonic acid was removed and left in the reaction flask and the reaction was carried out in the presence of sodium hypophosphite monohydrate catalyst at  $83 \pm 2$  °C. At the end of the reaction, glycerol (1:20 glycerol: water) was added to the medium as plasticizer and poured into petri dishes to produce films (PPS-MA)

### Mechanical test

Mechanical test of the films was performed according to ASTM D882-02 standard. For this purpose, 1x7 cm films were cut. Mechanical test was performed by applying 0.5 N preload. Films were treated with 53%  $Mg(NO_3)_2$  solution before mechanical testing.

### Water uptake and moisture content

For the moisture content of the films, the weight of the films cut to 2x2 cm<sup>2</sup> was taken first ( $W_i$ ). After drying at 105 °C, it was weighed again ( $W_k$ ). Moisture content was calculated in equation (1).

$$\text{Moisture content} = \frac{W_k - W_i}{W_i} \times 100 \quad (1).$$

In the water uptake test, the dry weight was taken after drying at 105 °C ( $W_k$ ). Films were placed in a beaker containing 30 ml of water and the amount of water absorbed was measured ( $W_s$ ). Equation (2), water intake capacity was calculated.

$$\text{Water uptake} = \frac{W_{\text{şişme}} - W_k}{W_k} \times 100 \quad (2).$$

## RESULTS and DISCUSSION

### Mechanical test

Mechanical testing, tensile tests are carried out to examine the mechanical strength of the materials. Mechanical properties are not only related to crosslinking but also to the plasticizer content. The crosslinker and plasticizer always have adverse effects on the tensile properties. In general, when the crosslinker content increases, the elongation at break decreases, while the tensile strength increases. When the plasticizer content increases, it has the opposite effect (Sreedhar and et al. 2006), (Shi and et al. 2008). Table 1 shows the mechanical test results of the films. It was found that the cross-linked films with malonic acid increased compared to the non-crosslinked films.

**Table 1.** Mechanical, water uptake and moisture content of films

Films	Mechanical test (MPa)	Water Uptake (%)	Moisture Content (%)
PPS	1.017±0.35	117.43±2.57	22.22±3.45
PPS-MA	1.298±0.18	90.82±5.01	21.25±0.84

### Water uptake and moisture content

Water uptake capacity is a important for biodegradable materials. In general, swelling properties were reduced when cross-linking (Zou et al. 2007). Due to the cross-linking and intramolecular and intermolecular interaction, the OH hydroxyl groups in the starch molecules were reduced and the water uptake and moisture content decreased. Table 1 shows % water intake and % moisture content values. Modified starch dehydration and moisture content values decreased by 23% and 5%, respectively.

## CONCLUSION

Pure potato starch (PPS) was obtained from the waste potato starch. It was observed that the tensile strength of the films prepared crosslinked with malonic acid increased by 27.6%. As a result of crosslinking, hydroxyl groups decreased, the water absorption capacity and moisture content of the films decreased.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Dicle University Scientific Research Projects Coordination Department. Project Number: ECZ.16.004.

## REFERENCES

- Averous, L., Boquillon, N 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56(2): 111-122.
- Basiak, E., Lenart, A., Debeaufort, F 2017. Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98: 348-356.
- Dolaz, M., Zıba, C. A., Celikci, N 2017. Atık Patates Nişastasından Yapıştırıcı Sentezi ve Karakterizasyonu: Karton Masura Üzerine Uygulamaları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(4): 30-36.
- Mei, J. Q., Zhou, D. N., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Chen, H. Q 2015. Effects of citric acid esterification on digestibility, structural and physicochemical properties of cassava starch. *Food chemistry*, 187: 378-384.
- Ramaraj, B 2007. Crosslinked poly (vinyl alcohol) and starch composite films. II. Physicomechanical, thermal properties and swelling studies. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(2): 909-916.
- Reddy, N., Yang, Y 2010. Citric acid cross-linking of starch films. *Food chemistry*, 118(3): 702-711.
- Selgra, P. G., Jaramillo, C. M., Famá, L., Goyanes, S 2016. Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch-glycerol with citric acid as crosslinking agent. *Carbohydrate Polymers*, 138: 66-74.
- Shi, R., Bi, J., Zhang, Z., Zhu, A., Chen, D., Zhou, X., Tian, W 2008. The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers*, 74(4): 763-770.
- Sreedhar, B., Chattopadhyay, D. K., Karunakar, M. S. H., & Sastry, A. R. K 2006. Thermal and surface characterization of plasticized starch polyvinyl alcohol blends crosslinked with epichlorohydrin. *Journal of Applied Polymer Science*, 101(1): 25-34.
- Zou, G. X., Qu, J. P., & Zou, X. L 2007. Optimization of water absorption of starch/PVA composites. *Polymer Composites*, 28(5): 674-679.

## Kronik hastalık riskinin belirlenmesinde antropometrik ölçümlerin değerlendirilmesi

Feride AYYILDIZ<sup>1</sup>, Hilal YILDIRAN<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: feridecelebi\_dyt@hotmail.com

### Özet

Obezite kronik hastalık riskini artıran faktörler arasında yer almaktadır. Kronik hastalık riskinin değerlendirilmesinde antropometrik ölçümler oldukça önemlidir. Bu araştırmada obezite ve abdominal obezite değerlendirilerek kızlarda kronik hastalık riskinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya 192 kız üniversite öğrencisi dahil edilmiştir. Bireylerin vücut ağırlığı, boy uzunluğu, bel çevresi ve kalça çevresi ölçülmüştür. Beden kütle indeksi (BKİ), bel/kalça oranı ve bel/boy oranı hesaplanıp hastalık risk sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır. Bel çevresine göre bireylerin %90,6'sı, bel-kalça oranına göre %87,0'inde kronik hastalık riski bulunmamaktadır. Bel-boy oranı risk sınıflamasına göre ise bireylerin %89,1'i risk olmayan sınıfta yer almaktadır. Çalışmaya katılan bireylerden normal vücut ağırlığında olanların oranının yüksek olduğu görülmüştür. Değerlendirilen tüm antropometrik ölçümlere göre kronik hastalık riskinin de düşük olduğu görülmektedir. Sonuç olarak antropometrik ölçümlerin değerlendirilmesi ve belirli aralıklarla tekrarı kronik hastalık riskinin belirlenmesinde önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik hastalık riski, antropometrik ölçümler, BKİ, bel çevresi

### Evaluation of anthropometric measurements in determination of chronic disease risk

#### Abstract

Obesity is one of the factors that increasing chronic diseases risk. Anthropometric measurements are very important in the assessment of chronic disease risk. The aim of this study was to evaluate the risk of chronic disease in females by evaluating obesity and abdominal obesity. Female university students (n:192) were included in the study. Body weight, height, waist circumference and hip circumference were measured. Body mass index (BMI), waist / hip ratio and waist / height ratio were calculated and classified according to disease risk classification. 90.6% of the individuals according to the waist circumference and 87.0% of them according to the waist-hip ratio had no chronic disease risk. In addition 89.1% of individuals were in the non-risk class according to waist-to-height ratio risk classification. It was observed that the ratio of individuals with normal body weight was high. According to all the anthropometric measurements evaluated, the risk of chronic disease is also low. In conclusion, evaluation and repetition of anthropometric measurements are important in determining chronic disease risk.

**Keywords:** Chronic diseases risk, anthropometric measurements, BMI, waist circumference

### GİRİŞ

Vücut kompozisyonundaki değişimler, obezite tanısının konulmasında etkin birer göstergedir. Modern yaşamla birlikte beslenme alışkanlıklarındaki değişimler, artan porsiyon miktarları, ayak üstü tarzı hızlı tüketilen besinlerle karbonhidrat, yağ ve rafine şekerden zengin, bitkisel liflerden fakir sağlıksız besin tercihi ile bunların yanında tüketilen meşrubatlar ve alkol tüketiminin artması ve gelişen teknoloji ile birlikte kolaylaşan yaşam biçimine bağlı fiziksel aktivitede azalma, vücut kompozisyonunun bozulmasına ve bunun sonucunda obezite gelişimine sebep olmaktadır (Vücut, 2010).

Günümüzde artan prevalansıyla dikkat çeken obezite; kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, sindirim sistemi hastalıkları gibi birçok kronik hastalıkla ilişkilendirilmektedir (TEMD, 2019). Antropometrik ölçümler (vücut ağırlığı, boy uzunluğu, bel çevresi, kalça çevresi, boyun çevresi gibi) beslenme durumunun saptanmasında protein ve yağ deposunun göstergesi olmaları nedeniyle önemlidir (TEMD, 2019).

Üniversite öğrencileri erişkin döneme geçme aşamasında olan çocukluk çağı sonrası ilk gruptur. Bu öğrencilerin üniversite eğitiminin başlaması ile birlikte o zamana kadar alıştıkları aile ortamından ayrılmaları ve kendi özgür seçimlerini daha belirgin şekilde yapmaya başlıyor olmaları nedeniyle beslenmelerinde yeni bir dönem başlamaktadır (Mazıcıoğlu ve Öztürk, 2003).

Beslenme alışkanlıklarında ortaya çıkabilecek yeni alışkanlıklar üniversite öğrenimi sonrasında yetişkinlik dönemine taşınacaktır. Öğrencilerin beslenme eğilimlerinin tespiti erişkin dönemde beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi ve yanlış beslenmenin yol açabileceği bozuklukların önlenmesi açısından önemlidir. Üniversite eğitimi ile birlikte öğrencilerin, vücut gereksinimlerine göre yeterli ve dengeli beslenmesi gerek sağlıklı yaşamın sürdürülmesi, gerekse ilerleyen dönemde kronik hastalıklara yakalanma riskinin azaltılması açısından oldukça önemlidir (Açık ve ark., 2003; Mazıcıoğlu ve Öztürk, 2003).

Vücut ağırlığının değerlendirilmesinde en sık kullanılan pratik yöntem beden kütle indeksi (BKİ) olmasına rağmen BKİ vücut yağı hakkında bilgi vermemektedir. Son yıllarda araştırmacılar vücuttaki toplam yağ miktarından çok yağın vücuttaki dağılımı üzerinde durmaktadırlar. Çünkü vücuttaki yağın bulunduğu bölge ve dağılımı hastalıkların morbidite ve mortalitesi ile direkt ilişkilendirilmektedir (WHO, 2008). Özellikle abdominal obezitedeki artış kronik hastalık riski ile ilişkilendirilmektedir. Tek başına bel çevresinin erkekler 102 cm, kadınlarda 88 cm'in üzerinde olması artan kronik hastalık riskiyle ilişkilendirilmektedir. Bel çevresinin yanında bel kalça oranı da vücut yağ dağılımının göstergelerindedir. Bu oranın erkeklerde 0.9 ve üzerinde, kadınlarda 0.85 ve üzerinde olması kronik hastalık için risk olarak değerlendirilir (WHO, 2008).

Bu çalışmada üniversite öğrencisi olan kızlarda obezite ve abdominal obezite durumu saptanarak kronik hastalık riskinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

Çalışma Ocak-Mayıs 2018 tarihleri arasında yürütülmüştür. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi'nde, 18-25 yıl yaş aralığına sahip 192 kız öğrenci çalışmaya dahil edilmiştir.

Bireylerin vücut ağırlığı, boy uzunluğu, bel ve kalça çevresi usulüne uygun olarak araştırmacılar tarafından alınmıştır. Vücut ağırlığı ölçümünde 0.5 kg'a duyarlı kalibre tartı kullanılmıştır. Sabah açken yapılan ölçüm sırasında ince kıyafetle ve ayakkabısız olarak ölçülmüştür. Boy uzunluğu ayaklar yanyana ve baş Frankfort düzleminde iken ölçüm yapılmıştır. Ölçümde stadiometre kullanılmıştır. Beden kütle indeksi vücut ağırlığının (kg) boy uzunluğuna (m<sup>2</sup>) bölünmesiyle hesaplanmıştır. Bel çevresi, bireylerin en alt kaburga kemiği ile kristailiyak arası bulunduktan sonra, orta noktadan geçen çevre mezür yardımıyla ölçülmüştür. Kalça çevresi ise bireyin yan tarafında durduktan sonra en yüksek noktadan geçen çevre ölçümüyle yapılmıştır (Gordon ve ark., 1998). Beden kütle indeksi, Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre sınıflandırılmıştır. Beden kütle indeksi 18.5 kg/m<sup>2</sup> ve altındaysa zayıf, 18.5-24.9 kg/m<sup>2</sup> arasındaysa normal, 25.0-29.9 kg/m<sup>2</sup> arasındaysa hafif şişman, 30 kg/m<sup>2</sup> ve üzerindeyse obez olarak değerlendirilmiştir (WHO, 2019).

Bel-kalça, bel-boy oranı ve beden kütle indeksi hesaplanmış ve sınıflandırılmıştır. Hastalık riski değerlendirilmesinde kadınlarda bel çevresinin 80 cm'in üzerinde olması artan risk, 88 cm'in üzerinde olması ise ciddi risk olarak değerlendirilmektedir. Bel-kalça oranının ise 0.85 ve üzerinde olması, bel-boy oranının 0,5 ve üzerinde olması risk olarak tanımlanmaktadır (Ashwell ve Lejeune, 1996; WHO, 2008).

Verilerin istatistiksel analizinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0 programı kullanılmıştır.

## **BULGULAR-TARTIŞMA**

Araştırmaya katılan bireylerin BKİ ortalaması 20,9±2,30 kg/m<sup>2</sup> iken bel çevresi ortalaması 72,5±6,34 cm'dir. Bel-kalça oranı ortalaması 0,7±0,06 ve bel-boy oranı ortalaması 0,4±0,04 olarak belirlenmiştir. Bireylerin %85,9'nun BKİ sınıflamasına göre normal vücut ağırlığına sahip olduğu görülmektedir. Bel çevresine göre %90,6'sı, bel-kalça oranına göre ise %87,0'si risk olmayan sınıfta yer almaktadır. Bel-boy oranı risk sınıflamasına göre ise

bireylerin %89,1'i risk olmayan sınıfta yer almaktadır. Beden kütle indeksine göre bireylerin yalnızca %3,1'inin vücut ağırlığının olması gerekenin üzerinde olduğu görülmektedir. Bel çevresine göre kronik hastalık risk değerlendirmesi yapıldığında ise bireylerin sadece %1,0'i yüksek risk grubunda iken %8,3'ü risk grubunda yer almaktadır. Bel-kalça oranına göre risk değerlendirmesine göre ise bireylerin %13,0'nun kronik hastalık riskinin bulunduğu görülmektedir. Bel-boy oranına göre değerlendirildiğinde bireylerin %10,9'nun kronik hastalık riskine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 1).

**Tablo 1. Bireylerin antropometrik ölçümlerine göre kronik hastalık risk değerlendirmesi**

<b>BKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>S</b>	<b>%</b>
≤18.5 (zayıf)	21	10,9
18.5-24.9 (normal)	165	85,9
25.0-29.9 (hafif şişman)	4	2,1
≥30 (obez)	2	1,0
<b>Bel çevresi (cm)</b>		
≤80 (risk yok)	174	90,6
80-88(risk)	16	8,3
>88 (yüksek risk)	2	1,0
<b>Bel-kalça oranı</b>		
<0.85 (risk yok)	167	87,0
≥0.85 (risk)	25	13,0
<b>Bel-boy oranı</b>		
<0.5 (risk yok)	171	89,1
≥0.5 (risk)	21	10,9

Obezite tüm nedenli ölümlerde artışa neden olmaktadır. Sıklığı her geçen gün artan, hayat kalitesini olumsuz yönde etkileyen ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan obezitenin erken dönemde tespit edilip tedavi edilmesi gerekmektedir. Obeziteyle artan kronik hastalık riskinin önüne geçmek için yaşam tarzıyla ilgili değişikliklerin yapılması ve bu değişikliklerin hayat boyu sürdürülmesi gerekmektedir (TEMD, 2019).

Çalışma sonuçlarına göre farklı antropometrik ölçümlere göre yapılan değerlendirmelerde risk oranları farklılık gösterse de benzer olduğu söylenebilir. Kronik hastalık riskinin değerlendirilmesinde antropometrik ölçümlerin yanı sıra fizikselmuayene, biyokimyasal parametreler gibi tıbbi değerlendirmeler de önemli yer tutmaktadır. Antropometrik ölçümlerle birlikte değerlendirilecek olan bu tetkiklerin özellikle obeziteye bağlı görülen hastalık riskinin önlenmesinde önemi oldukça büyüktür (Pekcan, 2008).

Çalışma kapsamında değerlendirilen antropometrik ölçümlerin riskin az olduğu sınırlara getirilmesinde bireyin ideal ağırlıkta olması önemlidir. İdeal vücut ağırlığına sahipolma ve bu ağırlığın korunması için sağlıklı beslenme, yeterli ve dengeli beslenme, stresten yönetimi, alkol ve sigaradan uzak durulması gibi yaşam tarzı değişiklikleri önemli yer tutmaktadır. Bu etmenlerin düzenlenmesi yaşam kalitesini artırmakla birlikte birçok kronik hastalık (obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser gibi) riskinin azaltılmasında etkilidir (Golubić ve ark., 2018). Yeterli ve dengeli beslenme konusunda bireye özgü değerlendirmelerle kişiye özel beslenme planlarının diyetisyen/beslenme uzmanı tarafından planlanması önerilmektedir.

Çocukluk ve gençlik döneminde kazanılan yeterli ve dengeli beslenme ve yeterli fiziksel aktivite aktivite gibi alışkanlıkların hayatın ilerleyen dönemlerinde kronik hastalık riskinin önlenmesinde önemli payı olduğu unutulmamalıdır. Obeziteyle mücadelede yapılacak olan ülke genelinde yönelik uygulamalar ve oluşturulacak olan farkındalık obeziteyle ilişkili hastalıkların azalmasına da olumlu katkı sağlayacaktır. Bu konuyla ilgili oluşturulan devlet politikaları oldukça önemlidir.



## SONUÇ

Kronik hastalık riskinin azalmasında obezitenin önemi oldukça yüksektir bu çalışma da bu durumu desteklemektedir. Çalışma sonunda alınan antropometrik ölçümlere göre kronik hastalık riski olan bireylerin oranının oldukça düşük olması umut vericidir. Bireylerin normal vücut ağırlığında olanların oranının yüksek olması ve sağlık alanında eğitim alıyor olmasının bu duruma etkisi olduğu söylenebilir. Her iki cinsiyeti de kapsayan daha geniş örneklem grubuna sahip farklı branşlardan öğrenci gruplarıyla yapılacak çalışmalar bunun belirlenmesinde ışık tutabilir.

## KAYNAKLAR

- Açık Y, Çelik G, Ozan A, Oğuzöncül, A, Deveci S, Gülbayrak C 2003. Üniversite öğrencilerinin beslenme alışkanlıkları. Sağlık ve Toplum, 13(4), 74-80.
- Ashwell M, Lejeune S 1996. Ratio of waist circumference to height may be better indicator of need for weight management. BMJ, 312(7027): 377.
- Golubić M, Schneeberger D, Kirkpatrick K, Bar J, Bernstein A, Weems F, Roizen M 2018. Comprehensive lifestyle modification intervention to improve chronic disease risk factors and quality of life in cancer survivors. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 24(11): 1085-1091.
- Gordon CC, Chumlea WC, Roche AF 1998. Measurement descriptions and techniques. In Lohman, T.G., Roche, A.F., and Martorell. R. (Eds.), *Anthropometric standardization reference manual*. Champaign, IL: Human Kinetics Books, pp. 3-12.
- Mazıcıoğlu MM, Öztürk A 2003. Üniversite 3. ve 4. sınıf öğrencilerinde beslenme alışkanlıkları ve bunu etkileyen faktörler. Erciyes Tıp Dergisi, 25(4): 172-178.
- Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) 2019. Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2019. 8. Baskı. Miki Matbaacılık, Ankara.
- Pekcan G 2008. Beslenme durumunun saptanması. Diyet El Kitabı, 67-141.
- Yılmaz S 2010. Yetişkinlerde Öğün Sıklığının Vücut Kompozisyonu Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- World Health Organization (WHO) 2008. Waist circumference and waist-hip ratio. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44583/9789241501491\\_eng.pdf;jsessionid=B4BC06652550360308DA301331540C83?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44583/9789241501491_eng.pdf;jsessionid=B4BC06652550360308DA301331540C83?sequence=1) [Erişim 07.07.19]
- World Health Organization (WHO) 2019. BMI classification <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi> [Erişim 07.07.19]

## Sürdürülebilir beslenmenin besin ögesi alımlarına göre değerlendirilmesi

Feride AYYILDIZ<sup>1\*</sup>, Hilal YILDIRAN<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: feridecelebi\_dyt@hotmail.com

### Özet

Sürdürülebilir beslenmenin temelinde bireysel ve toplumsal sağlığın korunması yer almaktadır. Sürdürülebilir beslenme bitkisel kaynaklı beslenmeyi temel almaktadır. Bitkisel kaynaklı beslenme kronik hastalık riskinin azaltılmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada üniversitede okuyan öğrencilerin cinsiyete göre besin tüketimlerinin ve bitkisel/hayvansal kaynaklı protein alımlarının kıyaslanması amaçlanmıştır. Erkek bireylerin ortalama enerji, karbohidrat ve posa alımlarının daha yüksek olduğu görülmektedir ( $p>0,05$ ). Protein alımlarının yanı sıra hem hayvansal ( $p<0,05$ ) hem de bitkisel ( $p>0,05$ ) kaynaklı protein alımı da erkeklerde yüksektir. Ayrıca hayvansal protein alımı erkeklerde bitkisel protein alımına göre daha yüksektir. Sürdürülebilir beslenmenin ilkelerinden olan bitkisel kaynaklı beslenme cinsiyete göre farklılık gösterebilmektedir. Bireylerin besin tüketimlerini cinsiyet dışında, yaş, sosyo- kültürel ve ekonomik etmenler gibi birçok faktör etkilemektedir. Bitkisel proteinden zengin beslenme sağlığın korunması ve geliştirilmesinde önemlidir. Ancak bitkisel kaynaklı beslenmeyle ilgili öneri verebilmek için daha fazla yapılacak çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** besin ögesi alımı, sürdürülebilir beslenme, yeterli ve dengeli beslenme

### Evaluation of sustainable nutrition according to nutrient intake

#### Abstract

The basis of sustainable nutrition is the protection of individual and society health. Sustainable nutrition is based on plant-based nutrition. Plant-based nutrition has been associated with reducing the chronic disease risk. In this study, it was aimed to compare nutrient consumption and protein / animal protein intake of university students. It was seen that the mean energy, carbohydrate and fiber intake of male individuals was higher than female ( $p> 0.05$ ). In addition to protein intake, both animal ( $p <0.05$ ) and plant ( $p> 0.05$ ) based protein intake were also higher in male. While animal protein intake is higher than plant based protein intake in male. Plant based nutrition, which is one of the principles of sustainable nutrition, may vary according to gender. Apart from gender, many factors such as age, socio-cultural and economic factors effect on food intake. Plant based nutrition is important for health protection and improvement. However, further studies are needed in order to give advice on plant-based nutrition.

**Keywords:** nutrient intake, sustainable nutrition, adequate and balanced nutrition

### GİRİŞ

Dünya genelinde insanların yaklaşık 8'de 1'i kronik açlıkla mücadele ederken, düzenli olarak yeterli besine ulaşamamaktadır (McGuire, 2015). Tersine aşırı yağ ve şeker tüketimine bağlı olarak dünyanın mücadele ettiği problemlerin arasında obezite ilk sıralarda yer almaktadır. Artan dünya nüfuyla birlikte herkese yetebilecek sağlıklı ve yeterli besinin sağlanması oldukça önemlidir (Alsaffar, 2016). Değişen iklim koşulları, çevresel koşullar, çevre kirliliği, biyoçeşitlilikte azalma bütün dünya ülkelerini sürdürülebilir beslenme sistemi oluşturmaya zorlamaktadır (Dixon ve Isaacs, 2013).

Bireylerin sağlığını etkileyen en temel etmenlerden biri beslenmedir. Yeterli ve dengeli beslenmenin temelinde; enerji, makro ve mikro besin öğelerinin yeterli düzeyde alınmasının yanı sıra posada alımında artış, toplam yağ, doymuş yağ, kolesterol alınmasının azaltılması gibi ilkeler bulunmaktadır. Sürdürülebilir beslenmenin temel ilkelerinden olan sağlıklı beslenmenin değerlendirilmesinde vitamin mineral alımı da önem kazanmaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2015).

Sürdürülebilir beslenmenin temelinde bireysel ve toplumsal sağlığın korunması yer almaktadır ve doğal kaynak israfını en aza indirmeyi, doğal ve mevsimlik tüketimler için besin üretimleri sağlamayı hedeflemektedir. Sürdürülebilir diyetler, şimdiki ve gelecek nesillerde sağlıklı bir yaşam için; besin ve beslenme güvencesine

katkıda bulunan düşük çevresel etkilere sahip, (Meybeck ve Gitz, 2017), biyolojik çeşitliliğe ve ekosisteme karşı koruyucu, kültürel olarak kabul edilebilir, ulaşılabilir, ekonomik açıdan uygun; beslenme açısından yeterli, güvenli ve sağlıklı; doğal ve insan kaynaklarını en iyi şekilde kullanan diyetlerdir (Gold ve McBurney, 2010).

Sürdürülebilir beslenme bitkisel kaynaklı beslenmeyi temel almaktadır. Ancak bu bileşenlerin orta düzeyde tüketilmesi gerektiği de vurgulanmaktadır (Macdiarmid ve ark., 2011; Pieniak ve ark., 2016). Bitkisel kaynaklı diyetler; daha az hayvansal kaynaklı besinleri ve vejeteryan beslenmeyi içeren diyet türüdür. Genel olarak, sebze, meyve, tahıllar, kurubaklagil, sert kabuklu yemişlerin tüketimini temel almaktadır. Bitkisel proteinden zengin beslenmenin kronik hastalık riskinin azaltılmasıyla ilişkili olduğu görülmüştür (Sağlık Bakanlığı, 2015; Macdiarmid ve ark., 2011). Bitkisel besin ağırlıklı beslenmede; antioksidanlar, posa, mikro besin öğeleri ve doymamış yağ asitlerinin miktarından kaynaklı kronik hastalıklara karşı koruyucu etki bulunmaktadır (Sağlık Bakanlığı, 2015; Macdiarmid ve ark., 2011).

Sürdürülebilir beslenme aynı zamanda işlenmiş besinler minimum düzeyde tercih edildiği beslenmedir. Besinlerin işlenmesi ile içinde bulunan sağlık için elzem ve önemli bileşenler yok olabilmekte veya azalabilmektedir. Hazır besinlerin genel olarak enerji yoğunluğu yüksek, besin ögesi içeriği ise düşüktür. Bu besinlerin aşırı tüketimi hem bireysel sağlığı hem de çevreyi olumsuz etkilemektedir (Macdiarmid ve ark., 2011; Meybeck ve Gitz, 2017).

Sürdürülebilir diyet en iyi örneklerden biri Akdeniz Diyeti'dir. Bu diyet beslenme, biyoçeşitlilik, yerli besin üretimi ve sürdürülebilirliği desteklemektedir (Bach-Faig ve ark., 2011). Klasik Akdeniz Diyeti'nde sebze, kurubaklagil, meyve, sert kabuklu yemişler ve tahılların tüketimi oldukça yüksektir (Alsaffar, 2016). Süt ve ürünleri orta düzeyde tüketilirken, kırmızı et tüketimi sınırlıdır. Akdeniz Diyeti sağlığın geliştirilmesi kronik hastalık riskinin önlenmesinde oldukça faydalı bir diyettir (Alsaffar, 2016).

Bu çalışmada üniversitede okuyan öğrencilerin cinsiyete göre besin tüketimlerinin ve bitkisel/hayvansal kaynaklı protein alımlarının kıyaslanması amaçlanmıştır

## **MATERYAL VE METOT**

Çalışmaya yaşları 18-24 yıl arası değişen üniversite öğrencileri dahil edilmiştir (n:300; 92 kız, 208 erkek). Katılımcılardan 24 saatlik hatırlatma yöntemiyle besin tüketim kaydı alınmıştır. Besin tüketim kayıtlar BEBİS programıyla değerlendirilmiştir. Her iki cinsiyete göre günlük enerji makro ve mikro besin öğeleri alımları hesaplanıp kıyaslanmıştır. Verilerin istatistiksel analizinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0 programı kullanılmıştır. Analizlerde %95 güven düzeyinde istatistiksel analiz yapılmıştır.

## **BULGULAR-TARTIŞMA**

Çalışmaya katılan bireylerin günlük enerji ve makro besin ögesi alımları değerlendirildiğinde erkek bireylerin ortalama enerji, karbonhidrat ve posa alımlarının daha yüksek olduğu görülmektedir ( $p>0,05$ ). Protein alımlarının yanı sıra hem hayvansal ( $p<0,05$ ) hem de bitkisel ( $p>0,05$ ) kaynaklı protein alımı da erkeklerde yüksektir. Ayrıca hayvansal protein alımı erkeklerde bitkisel protein alımına göre daha yüksek iken, kızlarda ise bu durum tam tersidir ( $p>0,05$ ). Toplam yağ, doymuş yağ, kolesterol alımı da erkeklerde daha yüksektir ancak sadece kolesterol alımında istatistiksel açıdan farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Karbonhidrat, protein ve yağdan gelen enerji yüzdeleri değerlendirildiğinde her iki cinsiyette de karbonhidrat yüzdesinin (%55-60) ve protein yüzdesinin (%15-20) olması gereken değerlerden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ancak her iki cinsiyette de yağdan gelen yüzdenin olması gerekenden (%25-30) yüksek olması dikkat çekicidir (Tablo 1).

Bireylerin mikro besin alımları değerlendirildiğinde B<sub>1</sub> vitamini alımının erkeklerde kadınlara kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. İncelenen diğer vitamini ve mineral alımlarında cinsiyetler arası istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı görülmektedir ( $p<0,05$ ) Özette de girişte de mikrolardan hiç bahsedilmemiş bu kısmı çıkartalım (Tablo 1).

**Tablo1.** Cinsiyete göre bireylerin enerji ve bazı besin ögesi alımlarının kıyaslanması

	Erkek (n=92) ( $\bar{x}\pm SS$ )	Kız (n=208) ( $\bar{x}\pm SS$ )	P
Enerji (kcal)	1900.3± 65.1	1768.8± 59.6	0.087
CHO (g)	228.7± 90.4	218.3± 88.2	0.351
CHO %	50.3±7.5	49.3±8.1	0.303
Protein (g)	62.1± 25.9	54.4± 23.7	0.012*
Protein %	13.5± 3.3	12.7± 2.9	0.036*
Hayvansal protein(g)	32.5±20.7	25.9±18.4	0.007*
Bitkisel protein(g)	30.9± 14.8	28.6± 12.8	0.455
Yağ (g)	78.0± 30.5	72.0± 25.6	0.078
Yağ %	37.0±7.7	36.8±7.0	0.839
Doymuş yağ(g)	23.9± 10.9	21.6±9.0	0.057
Kolesterol (mg)	249.3± 198.4	195.3± 185.6	0.024*
Omega-3(g)	1.2±0.8	1.1±0.6	0.167
Omega-6(g)	22.3± 12.2	20.8± 11.5	0.280
Posa (g)	19.7±9.6	18.1±7.8	0.134
A vit.(µg)	853.7± 1933.3	866.4± 3078.4	0.971
D vit. (µg)	0.9±2.7	0.6±2.1	0.386
E vit.(mg)	21.4± 11.8	20.2± 11.5	0.423
K vit. (µg)	225.2± 142.3	236.2± 157.0	0.565
C vit.(mg)	83.3± 61.1	73.3± 48.5	0.134
B <sub>1</sub> vit.(mg)	0.3±0.5	0.2±0.4	0.040*
B <sub>2</sub> vit.(mg)	0.5±0.6	0.5±0.9	0.676
B <sub>3</sub> vit.(mg)	11.0±5.9	9.7±6.9	0.132
B <sub>12</sub> vit. (µg)	3.9±7.3	3.0±12.5	0.517
Fosfor(mg)	1069.9± 455.6	978.9± 392.6	0.080
Sodyum(mg)	1795.9± 1086.0	1565.0± 876.5	0.052
Kalsiyum(mg)	499.9±258.5	508.8±223.3	0.761
Magnezyum (mg)	241.8± 105.7	232.2± 104.4	0.465
Demir(mg)	10.3± 4.5	9.4±4.9	0.136

Beslenmenin sürdürülebilirliği için bitkisel kaynaklı besinlerin daha fazla tüketimi oldukça önemlidir (Pieniak ve ark., 2016). Bitkisel kaynaklı beslenmeyle bireylerin yağ alım düzeyleri de kontrol edilebilir. Ancak kültürün beslenme üzerindeki etkisi yadsınmaz düzeydedir. Hayvansal kaynaklı proteinlerin sindirilebilirliğinin ve elzem amino asit içeriğinin fazla olmasının faydalarından dolayı bitkisel/hayvansal protein yüzdesi için net bir öneri bulunmamaktadır. Bitkisel kaynaklı beslenmenin sağlığa olumlu etkileri bilinse de kas proteini sentezi için önemli olan dallı zincirli amino asitler (lösin, izölösün ve valin) hayvansal kaynaklı besinlerde, bitkisel kaynaklı besinlere göre daha yüksek oranda bulunmaktadır (Macdiarmid ve ark., 2011).

Bireylerin beslenme alışkanlıkları sadece cinsiyetten etkilenmemektedir. Bunun yanı sıra yaş, genetik, sosyo-kültürel faktörler de bu durumdan etkilenmektedir. Bu faktörlerin de göz önüne alındığı geniş örneklemli çalışmaların sürdürülebilir beslenmeye katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bitkisel proteinden zengin beslenme sağlığın korunması ve geliştirilmesinde ve kronik hastalık riskinden korunmada önemlidir. Bu çalışmada bitkisel ve hayvansal kaynaklı protein alımı benzerdir. Yeterli ve dengeli olarak hayat boyu bu beslenmeyi devam ettirmek kronik hastalık riskinin azaltılması açısından önem kazanmaktadır. Bitkisel ağırlıklı beslenme için tek başına öneri vermek doğru değildir. Çünkü bitkisel kaynaklı beslenmeyle ilgili öneri verebilmek için daha fazla yapılacak çalışmaya ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

Sürdürülebilir beslenmenin ilkelerinden olan bitkisel kaynaklı beslenme cinsiyete göre farklılık gösterse de tüm bireylerin yağ alımlarını ve hayvansal kaynaklı protein alımlarını azaltması gerektiği düşünülmektedir. Bu durum hem sürdürülebilir beslenmenin hem de yeterli ve dengeli beslenme ilkeleri açısından önem taşımaktadır. Yeterli dengeli beslenme ilkelerine uygun olarak hayatın sürdürülmesi hem bireysel hem de toplumsal sağlık açısından önemli olduğu unutulmamalıdır

## KAYNAKLAR

- Alsaffar AA 2016. Sustainable diets: The interaction between food industry, nutrition, health and the environment. Food science and technology international, 22(2), 102-111.
- Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, Miranda G 2011. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. Public health nutrition, 14(12A), 2274-2284.
- Sağlık Bakanlığı 2015. Türkiye'ye özgü besin ve beslenme rehberi-2015: Ankara. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/10915,tuber-turkiye-beslenme-rehberipdf.pdf> [Erişim 08.07.19]
- Dixon J, Isaacs, B 2013. Why sustainable and 'nutritionally correct' food is not on the agenda: Western Sydney, the moral arts of everyday life and public policy. Food Policy, 43, 67-76.
- Gold K, McBurney R 2010. Sustainable diets and biodiversity: Directions and solutions for policy, research and action. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 108-114.
- Macdiarmid JI, Kyle J, Horgan GW, Loe JE, Fyfe C, Johnstone A, McNeill G 2011. Livewell: a balance of healthy and sustainable food choices.
- McGuire S 2015. FAO, IFAD, and WFP. The state of food insecurity in the world 2015: meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Rome: FAO, 2015: Oxford University Press.
- Meybeck A, Gitz V 2017. Sustainable diets within sustainable food systems. Proceedings of the Nutrition Society, 76(1), 1-11.
- Pieniak Z, Żakowska-Biemans S, Kostyra E, Raats M 2016. Sustainable healthy eating behaviour of young adults: towards a novel methodological approach. BMC public health, 16(1), 577.

## Kauçuk-metal yapıştırıcısı sentezinde melamin formaldehit reçinenin etkisi

Ümit Sevinç<sup>1,2</sup>, Ali Kara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizikokimya Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>2</sup>SKT Yedek Parça ve Mak. San. ve Tic. A.Ş., Bursa, Türkiye

E-mail: [umitsevinc@hotmail.com](mailto:umitsevinc@hotmail.com)

### Özet

Bu çalışmada, NBR (nitril) kauçuk ile demir metalinin vulkanizasyonu için gerekli olan kauçuk-metal yapıştırıcısının sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları araştırıldı. Kauçuk-metal yapıştırıcısı sentezinde melamin formaldehit reçinenin etkisi araştırıldı. Kauçuk-metal yapıştırıcısı, polimer, reçine, organik ve mineral dolgular ve çapraz bağlayıcıların solvent içerisinde karıştırılmasıyla sentezlendi. Demir metal plaka yüzey enerjisinin artırılması, yüzey alanının artırılması ve yüzey temizliği için çinko-fosfat kaplama yapıldı. Hazırlanan kauçuk-metal yapıştırıcısı sprey uygulama ile metale uygulandı. Daha sonrasında NBR (nitril) kauçuk ile vulkanizasyon edildi. Vulkanizasyon sonrası kauçuk ile metalin yapışması incelendi.

**Anahtar Kelimeler:** Nitril Kauçuk, kauçuk-metal yapıştırıcısı, melamin formaldehit reçine, vulkanizasyon,

### GİRİŞ

Otomotiv ve sanayi üreticileri artan bileşen sayısını azaltmak, titreşimi ortadan kaldırmak ve zorlu ortam uygulamalarında kullanılan malzemelerin performansını iyileştirmek için gittikçe daha fazla metalli kauçuk teknolojisine yönelmektedir.

Kauçuk-metal yapıştırma teknolojisi, gürültü ve titreşimi izole etmek için kullanılan çok çeşitli otomotiv ve endüstriyel ürünlerin üretiminde kullanılan birbirine bağlı birkaç işlemi kapsar. Yıllar önce, konu “black art” olarak görülüyordu, ancak günümüzde bu teknoloji, gelişmiş teknolojiye sahip üreticilerin metal parçalarla yüksek kaliteli, hatasız ve homojen kauçuk üretmelerini sağlıyor.

### Yapıştırıcı Özellikleri

Kauçuğu metale yapıştırmak için kullanılan genel amaçlı yapıştırıcılar özel olarak formüle edilmiş ürünlerdir. Genellikle; polimerler, reçineler, sertleştiriciler, pigmentler ve diğer bileşenler (örneğin korozyon önleyiciler veya viskozite stabilizatörleri) karışımı içerirler. Bu malzemeler sıvı bir ortamda çözülür veya askıya alınır.

Kauçuk-Metal yapıştırıcısı, vulkanizasyon işlemi sırasında metale kimyasal bir bağ oluşturmak üzere çoğu metal (çelik, alüminyum, paslanmaz çelik, bakır, pirinç) yüzeyleriyle reaksiyona giren organik reçineler içerir. Ayrıca, daha iyi film oluşumuna izin veren ve tutunma görevi gören polimerler içerirler.

Kauçuk-metal yapıştırıcılar, kauçuk bileşiğindeki polimerik bileşenlerle uyumlu polimerik malzemeler ve kauçuk bileşiği içerir. Birçoğu halojenli polimerlere içermektedir. Halojenlenmiş polimerlerin veya reçinelerin metalleri verimli bir şekilde ıslattığı bilinmektedir. Ayrıca Yapıştırıcı bağa zarar verebilecek kimyasallara etkili bariyer görevi görürler. Yapıştırıcı aynı zamanda kauçuktaki polimerlerle reaksiyona giren çok güçlü sertleştiriciler içerir. Farklı ve çok işlevli kimyasallar, film oluşturucu polimeri bir termoset yapmanın yanı sıra, filmin kauçuğuna bağlanmak üzere filmin ara yüzü boyunca reaksiyona girme kabiliyetine sahiptir.

Kauçuk-metal yapıştırma mekanizması çok karmaşıktır, çünkü eşzamanlı olarak meydana gelen birkaç reaksiyon vardır. Tüm bu reaksiyonlar, kuvvetli bir bağın oluşması için çok kısa bir süre içerisinde (yani kauçuğun baskıyla sertleşme süresi boyunca) gerçekleşmelidir.

### Kauçuk-Metal Yapıştırıcıları

#### Kimyasal Yapışma

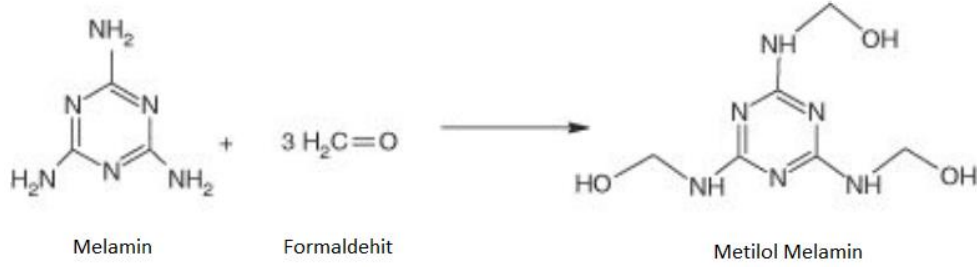
Bu mekanizma, yapışma bağının oluşumunu yüzey kimyasal kuvvetlerine bağlar. Yapışkan ile yapışanlar arasında oluşan hidrojen, kovalent ve iyonik bağlar çekici kuvvetlerden daha güçlüdür. Genel olarak, kimyasal bağlama sırasında gerçekleşen dört etkileşim türü vardır: kovalent bağlar, hidrojen bağları, Lifshitz-van der Waals

kuvvetleri ve asit-baz etkileşimleri. Belirli bir yapışkan bağ için etkileşimlerin tam doğası, arabirimin kimyasal bileşimine bağlıdır.

### Melamin Formaldehit Reçineler

#### Melamin Formaldehit Reçine Üretimi:

MF reçinesi oluşumundaki ilk reaksiyon melaminin formaldehit ile yoğunlaşmasıdır. Formaldehit ilk önce melaminin amino gruplarına saldırır ve metilol bileşikleri oluşturur. Melamin Formaldehit reçine sisteminin üretiminin özellikleri, reçinenin amaçlandığı uygulamaya bağlıdır.



Şekil 17 Melamin Formaldehit Sentezi

#### Melamin Formaldehit Bazlı Reçinelerin Sertleşmesi

Melamin Formaldehit reçinelerinin sertleşmesi, yalnızca sıcak presleme koşullarında meydana gelebilir. Sertleşme, katı reçineyi oluşturmak için metilen köprülerinin oluşturulmasıyla çapraz bağlanmayı tamamlar. Ayrıca metilen köprülerinin ve reaksiyona girmemiş metilol gruplarının yanında eter köprülerinin oluştuğunu da gözlenir.

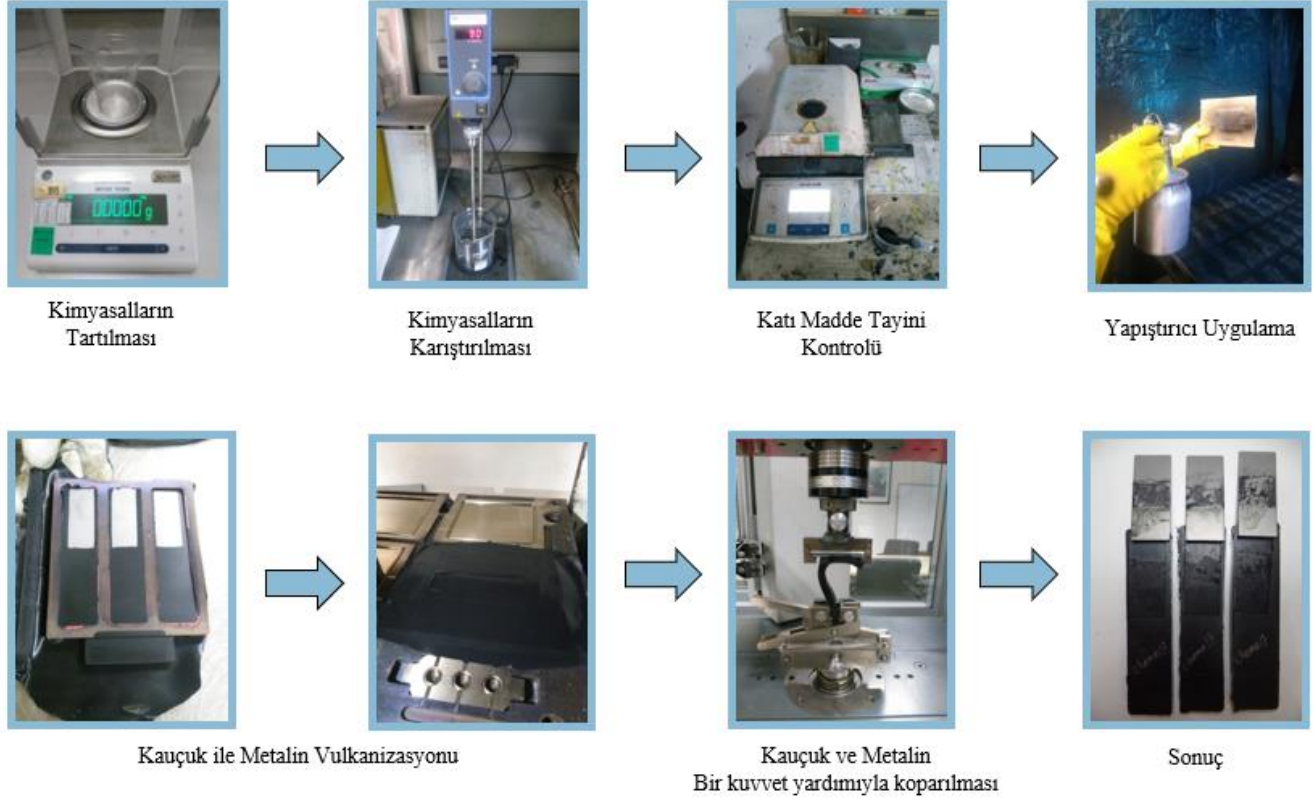
### MATERYAL VE METOT

#### Kauçuk-Metal Yapıştırıcısı Formülü Oluşturma

Yapıştırıcı Formülasyon-1	
Malzemeler	Miktar (%)
Polimer	13,75
Aktivatör	0,54
Hızlandırıcı	0,41
Dolgu	2,75
Antioksidan	0,13
Sülfür	0,22
Solvent	82,2

Yapıştırıcı Formülasyon-2	
Malzemeler	Miktar (%)
Polimer	13,38
Aktivatör	0,53
Hızlandırıcı	0,4
Dolgu	2,68
Melamin Formaldehit Reçine	2,68
Antioksidan	0,13
Sülfür	0,2
Solvent	80,0

Şekil 18 Kauçuk-Metal Yapıştırıcısı Formülasyonları

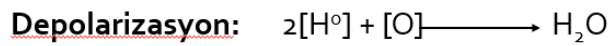
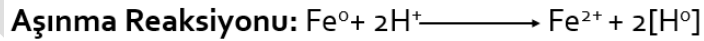


Şekil 19 Kauçuk-Metal Yapıştırıcısı Sentezi

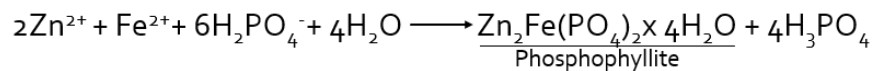
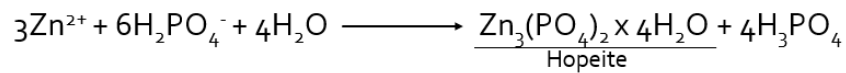
### Metal Yüzey Hazırlanması

#### Çinko-Fosfat Kaplama Prosesi

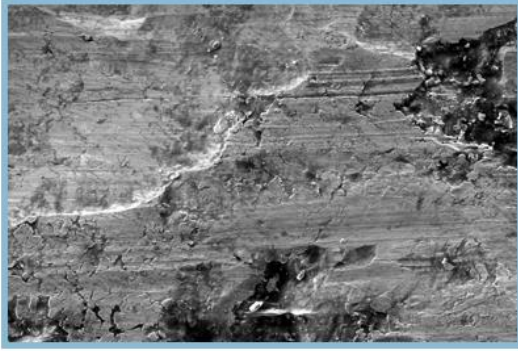
1. Yağ Alma
2. Durulama
3. Aktivasyon
4. Çinko-Fosfat Kaplama
5. Durulama
6. Pasivasyon
7. Durulama (Saf Su)



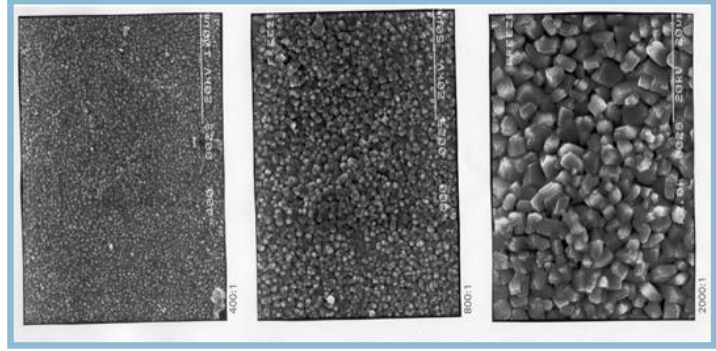
#### Kaplama Oluşumu:







Çinko-Fosfat Kaplanmamış Metal Yüzeyin SEM görüntüsü

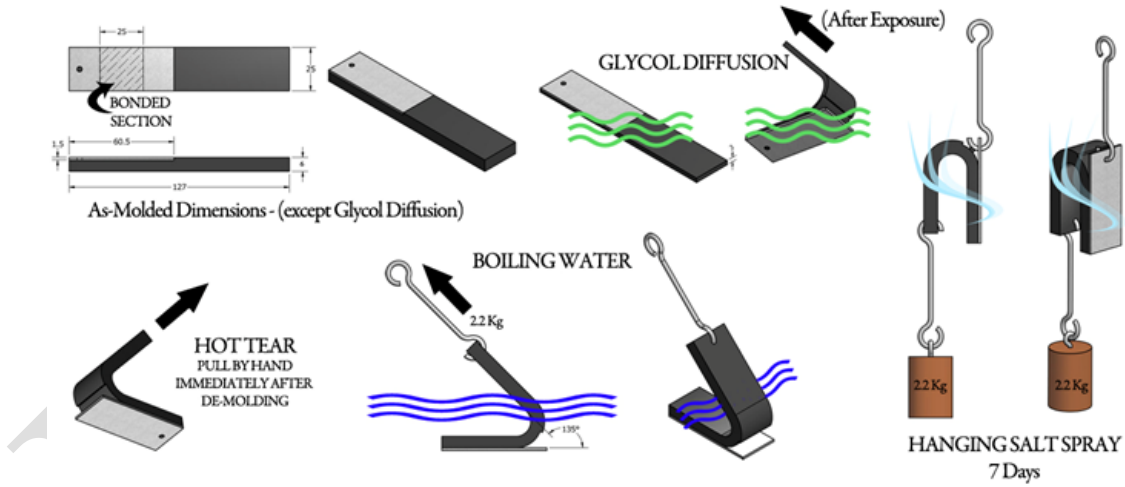


Çinko-Fosfat Kaplanmış Metal Yüzeyin SEM görüntüsü

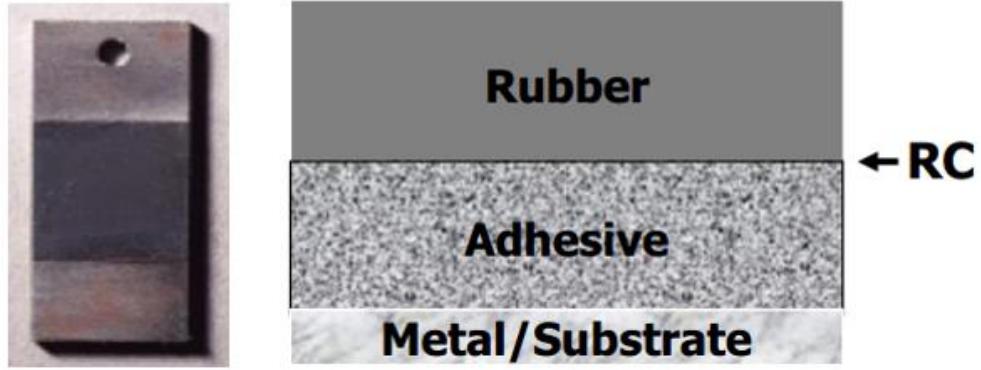
## BULGULAR

Yapışma Kontrolü için Test Metotları

ASTMD-429  
METHOD B TESTING



- Metal ile kauçuk birbirinden ayrıldıktan sonra metal üzerinde kalan kauçuk yüzeyi RC olarak adlandırılır.
- Endüstride genel olarak %50 ve üzeri bir yapışma uygundur. (RC50)



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Melamin Formaldehit Reçine katkılı yapıştırıcının sonuçları, reçine katkısız hazırlanan yapıştırıcıya göre daha iyi çıkmıştır. Kauçuk-Metal yapıştırıcısı sentezinde melamin formaldehit reçine önemli etki etmektedir.



Reçinesiz Hazırlanan Yapıştırıcı



Melamin Formaldehit Reçine Katkılı Yapıştırıcı

## KAYNAKLAR

Adhesive formulations for rubber to metal bonding systems

Henkel Design Guide for Bonding Rubbers and TPEs, vol. 2, dt 2/05.

J.F.E. Ruffel, Durham Raw Materials Ltd; Paper, Elastomer to Metal Bonding read at West England Section Conference at Trowbridge 5th March 1968, Journal of the IRI vol. 3 (4) (August 1969).

E.M. Petrie, Handbook of Adhesives and Sealants, second ed., McGraw-Hill Professional, 2006. ISBN: 0071479163, 9780071479165.

F. Gage, Dayton Chemical Products Laboratory, Rubber to metal bonding, Journal of the IRI 2 (1) (February 1968).

Bryan Crowther, Revised and Reprinted 2003, The Handbook of Rubber Bonding

Kevin Violette, The Delta Rubber Company, Rubber-to-Metal Bonding

Murat Ovalı, Türk HENKEL A.Ş., Boya Öncesi Yüzey İşlem Eğitimi

LORD Corporation, Preparation Of Chemosil primers And Adhesives

Sina Ebnesajjad - Adhesives Tecnology Handbook (2. edition)

ASTM D429-14 Standard Test Methods for Rubber Property - Adhesion to Rigid Substrates

Dr. Hans-Joachim Graf, Europe Rubber Processing Education 2016

***Cymbopogon spp.* ve *Helianthemum spp.* bitki ekstraktlarının in-vitro antibakteriyal aktivitelerinin araştırılması**  
Mustafa Tokar\*

\*Çankırı Karatekin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Çankırı, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: m.tokar@karatekin.edu.tr

**Özet**

Patojen mikroorganizmalara karşı kullanılan antibakteriyal maddelere direncin artması ve gıda katkı maddelerinin istenmeyen yan etkileri nedeniyle, son yıllarda yeni bitki kaynaklı antibakteriyal madde arayışını arttırmıştır. Bu çalışmada, Türkiye’de yetişen *Cymbopogon jwarancusa*, Hindistan’da yetişen *Cymbopogon citratus*, Güney Afrika’da yetişen *Cymbopogon nardus* türleri ile; Mısır’da yetişen *Helianthemum kahircum* ve Suriye’de yetişen *Helianthemum lippi* türü bitki ekstraktlarının hastane enfeksiyonlarının etiolojisinde yer alan *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aureginosa* patojen türleri ile enteropatojenlerden; *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, türlerinin antibakteriyal aktivitelerinin disk difüzyon yöntemiyle araştırılması amaçlandı. Disk difüzyon sonuçlarına göre, yalnızca *E.coli* ve *S.aureus*’a karşı tüm bitki ekstraktlarının (20µg/disk) farklı düzeylerde zon çapı oluşturduğu (16-38 mm) belirlendi. bitki türleri içerisinde en yüksek antibakteriyal aktivite *C.citratus* ekstraktında tespit edildi.

Sonuç olarak, başta *C.citratus* türü ekstraktı olmak üzere, araştırılan bitki ekstraktlarının sağlık, farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda mikroorganizmalara karşı etkili olduğu ve bu konuda daha ileri düzeyde invitro ve in vivo çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Antibakteriyal aktivite, Disk difüzyon, Hastane enfeksiyonu

**Investigation of antibacterial activities of plant extracts prapered from *Cymbopogon ssp.* and *Helianthemum ssp.***

**Abstract**

New plant-derived antibacterial agent researches have increased in recent years, because of increased resistance to antimicrobial agents that used against to pathogen microorganisms, and unwanted side effects of food additives. The aim of this research was to investigate the, in-vitro antibacterial activities and *Cymbopogon jwarancusa* which grown from Turkey and *Cymbopogon citratus*, which grown from India and *Helianthemum kahircum* which grown from Egypt and *Helianthemum lippi* which grown from Syria plant extracts on as with pathogens species; *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aureginosa* and as from enteropathogens *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, of which also in the etiology of nosocomial infections, by disk diffusion method.

The diameter of the inhibition zone in the disc-diffusion method shows that all the plant extracts (20µg/disc) have antibacterial activity only on *E.coli* and *S.aureus* different levels (16-38 mm). *C.citratus* extract showed the highest antibacterial activity with disc diffusion method.

In conclusion, particularly *C.citratus* plant extract, besides other plant extracts are thought to be effective against to microorganisms in many areas like medical, cosmetic and food industries. But there is need new in vitro and in vivo studies in future.

**Key Words:** Antibacterial activity, Disc diffusion, and Nosocomial

## GİRİŞ

Antimikrobiyal olarak bitki ekstraktları ve fitokimyasalların kullanımı terapötik tedavilerde en bilinen materyallerdendir. Pek çok araştırma, bu gibi etkinlikleri belirlemek amacıyla yapılmıştır ve son yıllarda bitkilerin sekonder metabolizması süresince sentezlenen bileşiklerine nitelik kazandırma çalışmaları, antimikrobiyal etkilerine yönelik olarak gerçekleştirilmektedir (Almagboul ve ark.,1985; Saxena ve ark.,1994).

Yaygın ismi limon otu olan *Cymbopogon spp* orjininin Endonezya olduğu kabul edilmektedir. *Cymbopogon spp*. Asya (Hindistan) ve tropik okyanusya ülkelerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bazı türleri baharat bitkisi olarak üretilmekte ve ticareti yapılmaktadır. Bu baharat bitkisi böcek öldürücü ve yiyeceklerin bozulmasını önlemede koruyucu olarak kullanılmaktadır. Pestisit özelliğine rağmen arı üretiminde arı cezbedici olarak kullanılmaktadır (Shadab ve ark., 1992).

*C.citratus* ve diğer türler *Poaceae* veya *Graminaceae* familyasına ait tek çenekli otsu bir bitki olup; dünyada limon otu olarak bilinir. Brezilya’da yapraklarından çay yapılarak sedatif, diüretik, anti-piretik, anti-inflamatuvar, analjezik ve anti-spazmodik etkileri için yaygın olarak kullanılmaktadır (Carlini ve ark.,1968).

*Citronella* veya *C. nardus* türünün temel yağı besin, su, parfümeri, sabun, vücut bakım ve eczacılık ürünlerinde yaygın olarak kullanılmakta olup; antimikrobiyal ve antifungal özelliği birçok çalışmada rapor edilmiştir (Billerbeck ve ark.,2001).

*Helianthemum* (yaban gülü, kaya gülü, güneş gülleri) bir *Cistaceae* familyası üyesidir. Kuzey yarım kürede özellikle Akdeniz Bölgesinde yayılmış olup; 200 türden oluşmaktadır. *H.lippii*(L.) (syn.*H.sessiliflorum*) türünün metanol ve kloroform ekstraktlarının önemli analjezik ve anti-inflamatuvar aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Ermeli ve ark.,2012).

*Helianthemum spp*. Mikorizal mantarlar ile simbiyotik yapı oluşturur. Mikorizal yapı oluşturan türleri arasında *H. salicifolium*, *H. guttatum* ve *T. pinoyi* önde gelir. Etnobotanik çalışmalar bu bitkinin maya kültüründe ishal tedavisinde kullanıldığını göstermektedir.

*H.oleandicum* (L) ve *H.glomeratum* türleri Meksika geleneksel halk sağlığında diare ve dizanteri gibi mide-bağırsak bozukluklarına karşı bir ilaç olarak kullanılırlar (Barbosa ve ark.,2006).

Yapılan bir çalışmada *H.glomeratum* ve *Rubus coriifolius*’dan elde edilen ham metanolik ekstraktların, deneysel olarak infekte edilmiş farelerdeki *Giardia lamblia* trofozoidlerine karşı aktiviteleri değerlendirilmiştir (Barbosa ve ark.,2006).

Yine yapılan diğer bir çalışmada solucan infeksiyonu ve diare’nin basit tedavisinde ilaç olarak *H.glomeratum* ekstraktı kullanıldığı rapor edilmiştir (Berlin ve Berlin,1995).

## MATERYAL VE METOD

### Bitkiler ve bitki ekstraktları

Bu çalışmada, Türkiye bitki florasından elde edilen *C. jwarandusa* , Hindistan’da yetişen *C. citratus*, Güney Afrika’da yetişen *C. nardus* türleri ile; Mısır’da yetişen *H. kahiricum* ve Suriye’de yetişen *H. lippi* türü bitkilerin asetat, bütanol ve etanol ile elde edilmiş bitki ekstraktları kullanıldı. Etken madde içeriği 1 mg/ml (w/v) olacak şekilde hazırlanmış bitki ekstraktları 0.45 µm filtreler kullanılarak steril edildi ve antibakteriyal aktivite testleri yapılmaya kadar steril örnekler etiketlenerek 1,5 ml ‘lik eppendorf tüplere alınarak buzdolabında +4 C de saklandı.

## Bakteri suşları

Hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden olan *S.aureus* (ATCC 25923), *K.pneumoniae* (ATCC 700603), *P.aureginosa* (ATCC 20298) patojen türleri ve enteropatojenlerden *E.coli* (ATCC 25922), *S.typhi* (ATCC 19430 ) standart türleri kullanıldı.

## Disk Difüzyon Testi (Antibakteriyal Aktivite Testi)

Patojen bakteri suşları Blood Agar ve EMB( Eosin Methylen Blue)'ya aşılanarak 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edilir. Sterilize edilmiş ve 45-50°C'ye kadar soğutulmuş olan Blood Agar ve EMB( Eosin Methylen Blue)besiyerleri belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri (105 adet/ml) (Bağcı ve Dığrak, 1996) ve bakteri (107 adet/ml) (Nostro ve ark., 2000) suşlarının buyyonlarda ki kültürleri ile %1 (0.01 ml) oranında aşılanarak tüp çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra 9.0 cm çapındaki steril petri kutularına steril pipetler ile 15 µl dağıtıldı.

Besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlandı (Bradshaw ve ark., 1992). Katılaşılan agar üzerine bitki yağları emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak aralarında 2 cm kalacak şekilde yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C'de 2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılama plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi (Bağcı ve Dığrak, 1996; Nostro ve ark., 2000; Bradshaw ve ark., 1992). Süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi. Çalışmalar 3 paralel olarak yürütüldü. Standart antibiyotik diskleri karşılaştırma yapmak amacıyla kontrol diskleri olarak kullanıldı.

## SONUÇLAR

### Disk diffüzyon test sonuçları

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak, boş antibiyogram disklerine 20µl emdirilen steril bitki ekstraktlarının, yedi farklı bakteri türüne karşı antibakteriyal aktivite yönünden incelenmesi sonucunda elde edilen üreme inhibisyon zon değerleri Tablo 1 verildi. İnhibisyon zon çapı büyüklüğüne göre en yüksek antibakteriyal aktivite *C.citratus* ekstraktından elde edilirken, en düşük antibakteriyal aktivite *H.lippi* ekstraktından elde edildi. Tüm bitki ekstraktlarına karşı en duyarlı bakterinin *S.aureus* olduğu belirlenirken, *P.aureginosa* tüm bitki ekstraktlarına (20µg/disk) karşı direnç gösterdi. Ayrıca LGO ekstraktı ve *Helianthum spp.* ekstraktının referans antibiyotik olarak kullanılan Gentamisin'den daha büyük bir inhibisyon zon çapı oluşturduğu belirlendi.

Tablo 1. Disk difüzyon yöntemine göre *Cymbopogon spp.* ve *Helianthum spp.* bitki ekstraktlarının bakterilerde oluşturduğu üreme inhibisyon zon çapları (mm)

Bitki Ekstraktı	Antibakteriyal aktivite zon çapları (mm)				
	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>P.aureginosa</i>	<i>S.typhi</i>	<i>E.coli</i>
<i>C. citratus</i>	38	15	R	25	16
<i>C.jwarandusa</i>	27	14	R	17	25
<i>C.nardus</i>	32	13	R	18	24
<i>H.kahiricum</i>	25	12	R	16	R
<i>H.lippi</i>	21	11	R	19	R
<i>Gentamicin</i>	20	16	18	17	21

\*R=Dirençli

## TARTIŞMA

Disk difüzyon çalışmaları sonuçlarına göre; bitki ekstraktları tüm patojen bakterilere antibakteriyal aktivite gösterirken, sadece *P.aureginosa*'ya karşı bu etkiyi göstermediği belirlendi. Ayrıca LGO ile *Helianthum spp.* ekstraktının *S.aureus*'a karşı referans antibiyotik Gentamisin'den daha büyük zon çapı oluşturdukları tespit edildi. Uygulanan dozda (20µg/disk) tüm bitki ekstraktlarına karşı *P.aureginosa* direnç gösterirken, en duyarlı bakterinin *S.aureus* olduğu gözlemlendi. Bitki ekstraktlarının 1:1 karışımlarının antibakteriyal aktivite etkisine bakıldığında ise *Cymbopogon spp.* ve *Helianthemum spp.* ekstrakt karışımlarının, tüm patojenlere özellikle *S.aureus* üzerine antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Bu araştırmada *C. citratus* ekstraktının disk difüzyon testinde *S.aureus*'a maksimum antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlendi. En düşük aktivite *H.lippi* ekstraktında tespit edildi. Singh ve ark.,2011 yaptıkları bir çalışmada LGO'yu patojen bakteri türleri için %100 duyarlı bulmuşlardır. Bizim bulgularımız, Abu-Seif ve ark.,2014; Abd-El Fattah ve ark.,2010 tarafından daha önce yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. LGO'nun antibakteriyal aktivitesi onun içeriğindeki flavonoidler ile fenolik bileşiklere bağlı olduğu Pratt ve ark., 1991 tarafından ispatlanmıştır.

Helal ve ark., yaptıkları çalışmada disk difüzyon yöntemi ile LGO değerlerini *S.aureus* (42mm), *E.coli* (58 mm) ve *P.aeruginosa*'da (48mm)olarak bulmuşlardır (Helal ve ark.,2006) .Çalışmamızda ise *S.aureus* (38 mm), *E.coli* (16 mm) ve *P.aeruginosa*'da ( R) bulunmuştur.

Ewansia ve ark., *C.citratus*'un metanol ekstraktı ile yaptığı bir çalışmada ise *S.aureus* (16 mm), *E.coli* (18 mm) ve *S.typhi*'de(7mm) zon çapı tespit etmişlerdir (Ewansia ve ark.,2012). Bizim çalışmamız *E.coli* (16 mm) ile benzerdir.

Soares ve ark.,*C.citratus* yağı gram pozitif bakterilerde daha yüksek antibakteriyal etkinlik gösterirken; gram negatiflerde ise inhibisyon etki göstermiştir (Soares ve ark.,2013). Dolayısı ile bizim çalışmamızla uyumludur.

Christopher ve ark., Endüstriyel koruyucu bir besin olarak *C.citratus* yağının antioksidan, antifungal, antimikrotoksin, antibakteriyal ve antibiofilm aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Christopher ve ark.,2017).

Ratahman ve ark., yaptıkları bir çalışmada *C.jwarancusa* temel yağlarının well difüzyon yönteminde *K.pneumonia*, *S.typhi* gibi bir çok patojen bakteri türünün üremesini bariz olarak baskıladığını göstermişlerdir (Ratahman ve ark.,2013).

Chandan Prasad ve ark., *C.jwarancusa*'nın sulu ve etanol ekstraktları ile yaptıkları bir çalışmada *S.aureus*'a karşı etanol ekstraktı( 94,37mm) çok etkili bulunmuştur (Chandan Prasad ve ark.,2011). Bizim çalışmamızda ise *C.citratus*' a göre düşük bulunmuştur.

*Helianthemum spp* ekstraktı disk difüzyon testinde sadece *S.aureus* ile *S.typhi*'ye karşı maksimum aktivite gösterirken; *K.pneumonia*'ye ise minimum antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlendi. *P.aureginosa*, *E.coli* disk difüzyon testinde *Helianthemum spp.* ekstraktına dirençli bulundu.

Moraga ve ark., *Helianthemum spp*'deki fenolik içerik ile antimikrobiyal aktivite arasında güçlü bir ilişki bulmuşlardır (Moraga ve ark.,2013).

*H.glomeratum*'un yüzeysel parçalarının(yaprak, çiçek ,dal..) metanol ekstraktlarının antibakteriyal, antifungal ve antiprotozoal özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (Javidnia ve ark., 2007; Meckes ve ark.,1995).

*Helianthemum spp.* ait kimyasal çalışmaların çok az olduğu literatürde belirtilmiştir. Sadece *H.kahircum* (Del.) türünün temel yağları tanımlanabilmiştir (Javidnia ve ark., 2007).

## SONUÇ

Bu bitki ekstraktlarının antibakteriyal aktiviteleri ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda çoğunlukla benzer antibakteriyal etkinlikler belirlense de, farklı duyarlılık sonuçlarının olduğu, tespit edildi. Bu farklılıkların, ekstraksiyon yöntemi, kullanılan antimikrobiyal aktivite testi, uygulanan doz, bitkinin yetiştiği coğrafi özellikler, gelişim dönemi ve ekstraksiyon işlemine bağlı olarak içeriğindeki kimyasal maddelerin değişmesiyle ilişkili olabileceği düşünüldü (Bunkova ve ark.,2005 ; Singh ve ark., 2011).

Bu araştırma neticesinde; başta *Cymbopogon* ekstraktı olmak üzere, antibakteriyal aktivitesi tespit edilen bitki ekstraktları ve karışımlarının tıp, eczacılık, kozmetik ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda mikroorganizmalara karşı etkili olacağı bu nedenle daha ileri düzeyde invitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

Abd-El Fattah SM, Hassan ASY, Bayoum HM, Eissa HA 2010. The use of lemongrass extracts as antimicrobial and food additive potential in yoghurt. J. Am. Sci, 6: 582-594.

Al-Yousef S 2014. Essential oils: their antimicrobial activity and potential application against pathogens by gaseous contact a review. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences G. Microbiology, 6: 37-45.

Almagboul AZ, Bashir AK, Farouk A, Salih AKM 1985. Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. Fitoterapia, 56: 331-337.

Bağcı E, Dığrak M 1996. Bazı orman ağaçlarının uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri.Tr.J.of Biology, 20: 191-198.

Barbosa E, Calzada F, Campos R 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. Journal of Ethnopharmacology, 108:395–397.

Berlin B, Berlin E 1995. Medical Ethnobiology of the Highland of Chiapas, Mexico. The Gastrointestinal Diseases, Princeton University Press, New Jersey.

Billerbeck VG, Roques CG, Bessiere JM, Fonvieille JL, Dargent R 2001. Effect of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. Canadian J Microb, 47: 9-17.

Bradshaw JS, Krzysztof E, Krakowiak R, Izatt, M 1992. The Chemistry of Heterocyclic Compounds. Aza-Crown Macrocycles,Wiley Publication.

Bunkova R, Marova I., Nemeč M 2005. Antimutagenic properties of green tea. Plant Foods Hum Nut, 60: 25-29.

Carlini E.A, Contar J.D.P, Silva-Filho A.R 1968. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, 17:37-64.

Chandan Prasad et al., 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cymbopogon jwarancusa* (Jones.) leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (09) : 68-72.

Christopher E. Ekpenyong and Ernest E. Akpan., 2017. Use of *Cymbopogon citratus* essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 57(12): 2541–2559.

Ermeli NB et al., 2012. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities for two Libyan medicinal plants: *Helianthemum lippii* and *Launaea residifolia*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(9):4201-4205.

Ewansiha JU, Garba SA, Mawak JD, Oyewole OA 2012. Antimicrobial Activity of *Cymbopogon Citratus* (Lemon Grass) and its Phytochemical Properties. *Frontiers in Science*, 2(6): 214-220.

Helal GA, Sarhan MM, Abu Shahla ANK, El-Khai EKA 2006. Antimicrobial activity of some essential oils against microorganisms deteriorating fruit juices. *Mycobiol*, 34: 219-229.

Javidnia K, Nasiri A, Miri R, Jamalian A 2007. Composition of Essential oil *Teucrium persicum* Boiss. from Iran. *J. Essential Oil Res*, 19: 430-432.

Meckes M, Villareal ML, Tortoriello J, Berlin B, Berlin E 1995. A microbiological evaluation of medicinal plants used by Maya people of Southern Mexico. *Phytother. Res*, 9:244-250.

Moraga AB et al., 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 148:287–296.

Nostro AM, Germano VD, Angelo and Cannatelli M 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett. Appl. Microbiol*, 30: 379-384

Pratt DE, Hudson BJB 1991. Antioxidant activity of phenolic compounds in meat model systems. In phenol compounds in food and their effects on health. *AC Symposium Series* 506; American Chemical Society, 1990. Washington, 214-222.

Ratahman et al., 2013. Javidnia K, Nasiri A, Miri R, Jamalian A 2007. Composition of Essential oil *Teucrium persicum* Boiss. from Iran. *J. Essential Oil Res*, 19: 430-432.

Saxena G, McCutcheon AR, Farmer S, Towers GHN, Hancock REW 1994. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *J. Ethnopharmacol*, 42: 95-99.

Shadab Q, Hanif M, Chaudhary FM 1992. Antifungal activity by lemongrass essential oils. *Pak. J. Sci. Ind. Res*, 35: 246-249.

Singh BR, Singh V, Singh RK, Ebibeni N 2011. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *International Research of Pharmacy and Pharmacology*, 1(9) :228-236.

Soares, M O et al., 2013. *Cymbopogon citratus* EO antimicrobial activity against multi-drug resistant Gram-positive strains and non-albicans-*Candida* species. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX .

Bu araştırma, 2nd Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences kongresinde sözel bildiri olarak sunulmuştur.



## The Development of Copper Based Nanocatalysts for the Catalytic Hydrolysis of Hydrazine-Borane

Atilla Alçı<sup>1</sup>, Yaşar Karataş<sup>2</sup>, Hatice Gamze Soğukömeroğulları<sup>3</sup>, Mehmet Gülcan<sup>2</sup>, Mehmet Sönmez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science and Arts, Gaziantep University, Gaziantep, 27310, Turkey

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Van Yüzüncü Yıl University, Van, 65080, Turkey

<sup>3</sup>Medical Services and Techniques Department, Health Services Vocational School, Gaziantep University, 27310 Gaziantep, Turkey

E-mail: atillaalci@hotmail.com

### Abstract

In this study, graphene oxide supported copper nanoclusters were prepared by wet impregnation method. Graphene oxide supported copper nanoclusters were characterized by various methods such as TEM, XRD and XPS. The characterized copper nanoclusters were used as catalysts in the dehydrogenation reaction of the hydrazine-borane. The reaction was experimented with different temperature, catalyst amount and hydrazine borane amounts. In addition, kinetic studies of the reaction were made.

**Keywords:** Nanoparticles, hydrazine-borane, hydrogen, hydrolytic dehydrogenation

### INTRODUCTION

Hydrazine borane compounds have recently been used as B-N based hydrogen storage material. Hydrazine-borane has a high hydrogen concentration (15.4 wt%) which is the most important criterion for the storage of hydrogen (Zhong et al., 2012). When HB is hydrolyzed together with a suitable catalyst, 3.0 equivalents of hydrogen are released at room temperature. This shows that it is quite suitable as hydrogen storage material (Yao et al., 2015). The most important reasons for using hydrazine-borane as hydrogen storage / provider are; The fact that it is solid in room conditions is not toxic to the environment, it is soluble in water and it is stable against self-hydrolysis (Hannauer et al., 2011). Copper based nanocatalysts within nano-sized solid support (graphene oxide) were prepared via a simple wet impregnation method and characterized by TEM, EDX, XRD and XPS methods. The prepared and characterized samples were tested for the room temperature catalytic hydrolysis of hydrazine-borane.



**Scheme 1.** Reaction of catalytic hydrolysis of hydrazine borane

### MATERIALS AND METHODS

#### Preparation of Graphene Oxide (GO)

The graphene oxide (GO); was prepared by the Hummer method with graphite, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KMnO<sub>4</sub> and NaNO<sub>3</sub> reactants at different temperatures and at dilution rates with water (Marcano et al., 2010).

#### Preparation of Cu@rGO nanocatalyst

The preparation of Cu@rGO nanocatalyst has been performed by using a facile impregnation method. To prepare Cu@rGO nanocatalyst, briefly, 34,95 mg of copper (II) chloride and 150 mg of GO were added to 5.0 mL H<sub>2</sub>O, and the resulting solution was stirred at 750 rpm for 2 h. Then, 117,5 mg NaBH<sub>4</sub> have been used to reduce Cu<sup>+2</sup>@GO and to obtain the Cu@rGO nanocatalyst. The obtained NPs were washed with 3x10 mL H<sub>2</sub>O and dried in 120 °C for 45 min.

## RESULT AND DISCUSSION

### Characterization of Cu@rGO nanocatalyst

Cu@rGO nanocatalyst, prepared by the liquid phase impregnation method, was defined by XPS, XRD and TEM techniques.

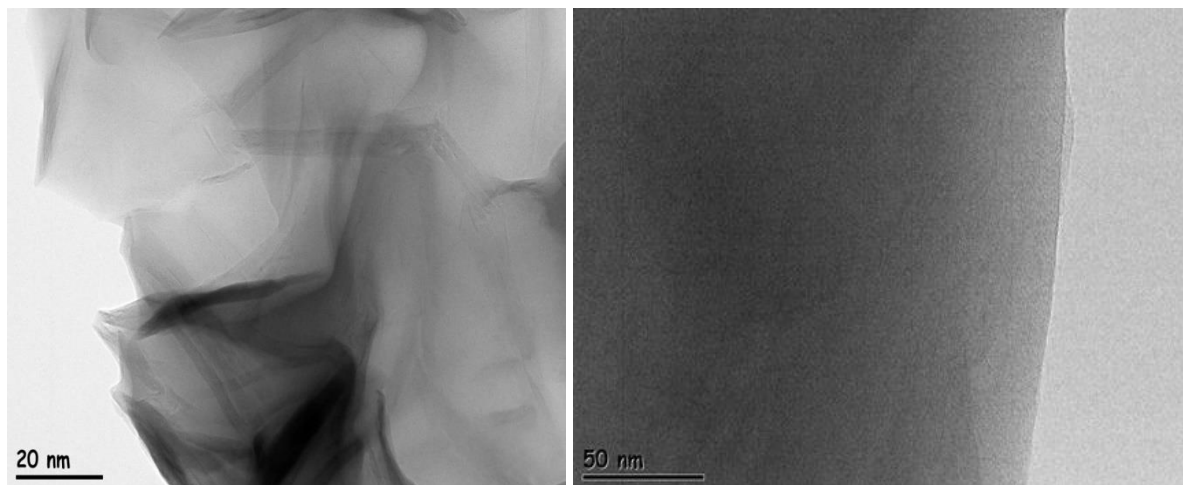


Figure 1. TEM images taken in 20 nm and 50 nm scale for Cu/rGO nanocatalysts

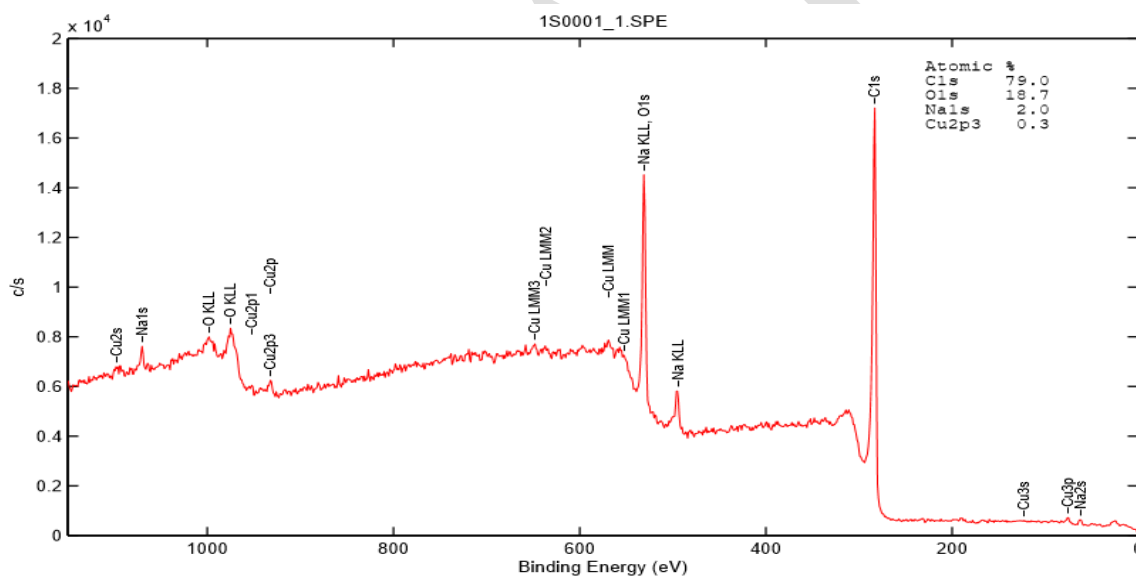


Figure 2. XPS spectrum of Cu@rGO

Wide-scan XPS spectrum of Cu@rGO, which revealed that the existence of C, O and Cu elements. Cu2p HR-XPS spectrum, the main peak was observed for 932.7 eV and 952.3 eV for copper which can readily be assigned to metallic Cu<sub>2p<sub>3/2</sub></sub> and Cu<sub>2p<sub>1/2</sub></sub>, respectively (Patil et al., 2018).

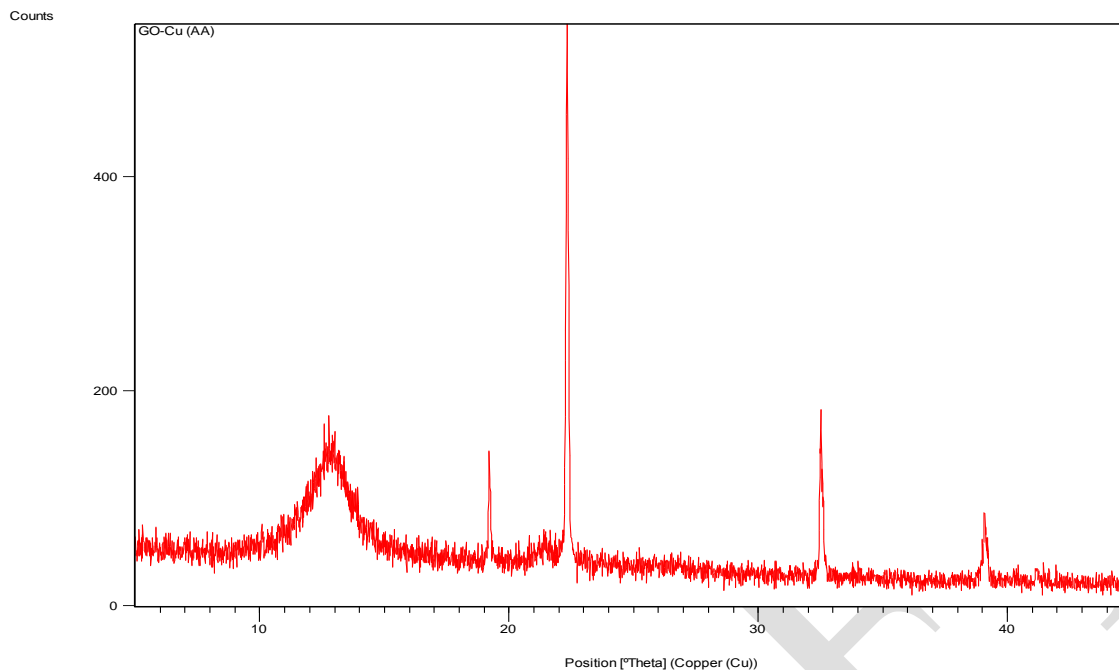


Figure 3. XRD spectrum of Cu@rGO

### Kinetic studies of Cu@rGO nanocatalyst in the hydrolysis of HB

The reaction was experimented with different temperature, catalyst amount and hydrazine borane amounts. In addition, kinetic studies of the reaction were made.

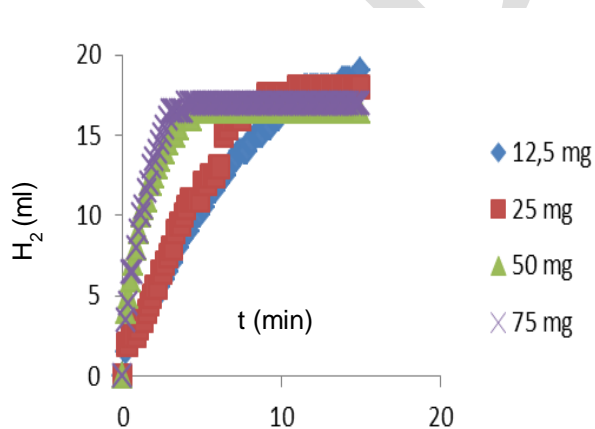


Figure 4. Different catalyst amount

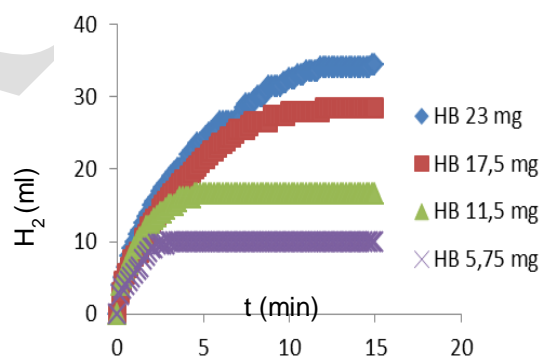


Figure 5. Different hydrazine borane amount

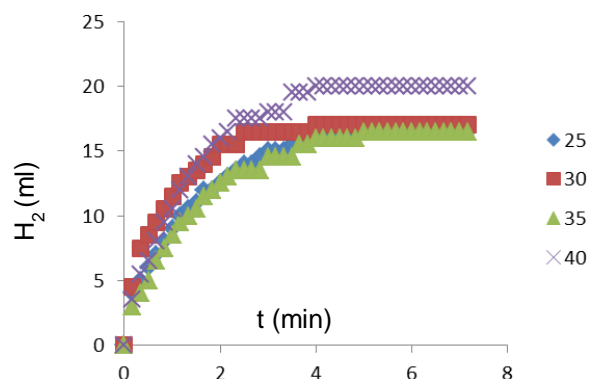


Figure 6. Different temperature

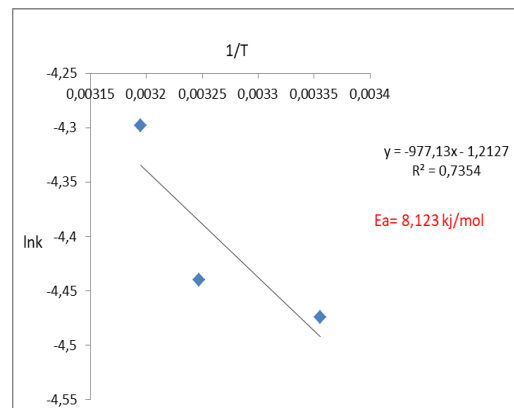


Figure 7. lnk-1/T graph

The catalytic activity of Cu@rGO nanocatalyst in the hydrolysis of HB at various temperatures was investigated by keeping the catalyst and substrate concentrations constant. As can be seen from the time graph against the volume of hydrogen gas, the Cu@rGO nanocatalyst is an effective catalyst even at low temperatures in the hydrolysis of HB. The rate constants of hydrogen production from the hydrolysis of HB were calculated from the linear portions of the plots at various temperatures and used for the calculation of the activation energy ( $E_a = 8,123 \text{ kJ/mol}$ ) from the Arrhenius plot for the hydrolysis of HB.

## CONCLUSION

The following results were obtained at the end of this study aiming to generate hydrogen by hydrolysis of HB in the presence of Cu@rGO nanocatalyst:

- (i) GO supported Cu metallic nanocatalyst, Cu@rGO, were reproducibly prepared by conventional impregnation method;
- (ii) The characterization of the nanocatalyst by using, TEM, XRD and XPS techniques reveal that the formation of well-dispersed and spherical metal(0) nanoparticles;
- (iii) Cu@rGO nanocatalyst provide notable catalytic activity activation energy ( $E_a = 8.123 \text{ kJ/mol}$ ) in the hydrolysis of HB at RT;
- (iv) The quantitative kinetic studies depending on the catalyst/substrate concentrations and temperature indicates that Cu@rGO catalyzed hydrolysis of HB is first-order in catalyst concentration and about half-order in HB concentration.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Research Found of Gaziantep University (Project ID: FEF.YLT.19.05).

## REFERENCES

Hannauer J, Akdim O, Demirci UB, Christophe G, Hermann JM, Miele P, Xu Q 2011. High-extent dehydrogenation of hydrazine borane  $\text{N}_2\text{H}_4\text{BH}_3$  by hydrolysis of  $\text{BH}_3$  and decomposition of  $\text{N}_2\text{H}_4$ . Energy Environ. Sci. 4: 3355-3358.

- Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, Alemany LB, Lu W, Tour JM 2010. Improved synthesis of graphene oxide, ACS Nano, 4 (8): 4806-4814.
- Patil SA, Ryu C-H, Kim H-S 2018. Synthesis and Characterization of Copper Nanoparticles (Cu-Nps) using Rongalite as Reducing Agent and Photonic Sintering of Cu-Nps Ink for Printed Electronics, International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology, 5 (2): 239-245.
- Yao Q, Lu Z-H, Yang K, Chen X, Zhu M 2015. Ruthenium nanoparticles confined in SBA-15 as highly efficient catalyst for hydrolytic dehydrogenation of ammonia borane and hydrazine borane, Scientific Reports 5: 15186, <https://doi.org/10.1038/srep15186>.
- Zhong DC, Aranishi K, Singh AK, Demirci UB, Xu Q 2012. The synergistic effect of Rh–Ni catalysts on the highly-efficient dehydrogenation of aqueous hydrazine borane for chemical hydrogen storage. Chem. Commun. 48: 11945-11947.

DRAFT

## Acid Blue 25 Adsorption on the effect of pH and poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub>

Cansu BAL, Şahin ÖZEL, Ali KARA

Department of Chemistry, University of Bursa Uludag, Bursa Turkey

Corresponding author: e-mail: cansubal96@gmail.com

### Abstract

Both cheap and easy to synthesize, wireless lighting, detergent and microbial attacks use of synthetic dyes due to their high protection. The dye is growing in the industry. Dyes acidic, basic, dispersing, azo, diazo, anthraquinone base and metal complex. Dyes, chromophoric group. It is a water soluble synthetic and containing a wide variety of structures. 60-70% market has a share. Treatment of washing water from industrial production processes, complexity of complexes it is now very difficult with conventional waste water treatment methods. Directly to their environment can cause very serious problems. Direct discharge of wastewater under anaerobic conditions of toxic aromatic amines may result. Adsorption, coagulation-flocculation, oxidation, filtration and Physical and chemical methods such as electrochemical methods for the removal of dye from waste waters Available. These methods are very expensive and compare in practice. Adsorption is the most common used as a dye removal technique. Dyeing the destruction of paints chemical or biological It is made by oxidation. In this study, pH effects of removal a acid dye, acid blue 25, from aqueous solutions were studied by adsorption on poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub>. The absorbance of acid blue 25 (at 580nm) is measured. In this study, linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in details [between pH:2 and pH:12]. In addition, the interactions between the polymer and the pH range were investigated.

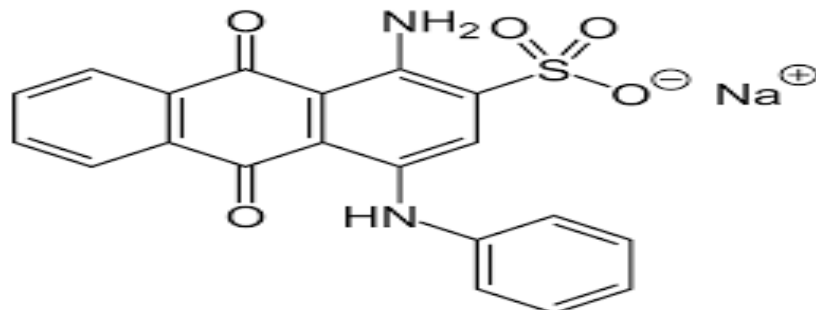
**Key Words:** Acid Blue 25, adsorption, composite polymer dyes.

**1. Introduction:** Today, dyes are used in the production of colored matter and materials. In the coloring of all materials and materials offered for consumption, dyes are widely used as. Colorants, areas of use and desired coloration. In accordance with the chemical structure of the material is produced in organic and inorganic structure and widely is used as. Widely used dyestuffs They are produced. Dyestuffs can also be added to the environment during their production and consumption. It is given. Dyes given to the environment, depending on their chemical structure, ecological balance and the presence of dyes directly or indirectly as natural phenomena can be prevented. Dyestuffs are produced in different chemical structures and in different amounts and potentials are known to be used in all areas. Dyestuffs used in textile industry, textile factory after dyeing units outlet water. Colored effluent from dyeing, printing and washing color of the substance used and the degree of color and the structure of the substance used It is stated in the studies that are connected. Disperse and vat dyes in water the concentration of such dyes in the effluent is low and flocculation can be removed from the waste water by physical processes such as. Water-insoluble dyes When biochemical treatment systems are used in the treatment of effluent containing water, most materials can be removed by adsorption to the biomass. But in the water effective removal of soluble dyes in aerobic biological treatment processes not provided as. 60-70% of textile dyestuffs are azo dyestuffs. Azo paints reactive dyestuffs are produced and used. Researchers that natural dyes are expensive, low and often have low quality they will replace them with high quality, cheap and potentially quantifiable synthetic dyes and directed the investigation of substances. In the 18th century, natural dyes were extracted rapid development of separation techniques and dyeing methods, synthetic dyes materials have been produced on an industrial scale.

### 2. Effect of pH on Dye

The effect of pH on adsorption in this study and the best results were shown for pH:3 of Acid Blue 25 obtained. After this These pH s were used in the studies. Acidic paints adsorbs ions acidic pH, basic dyes adsorption was better seen in basic pH. no significant effect on adsorption. 10 mg Since the adsorbent provides adequate dye removal, The use of more adsorbents will be unnecessary. From 10 mg adsorption if less adsorbent is used capacity was observed.

**3. Materials and Methods:** The treatment of dye-containing wastewater with coagulants is a well-known method. Rapid treatment of textile wastewater by chemical precipitation mixing, flocculation and precipitation steps are applied. Process; aluminum, calcium or and the addition of substances such as ferric ions to wastewaters containing dyes. Dyes by adhering to the surface of the flocks during the precipitation process or by bonding to metal hydroxides they are removed by precipitation. Precipitation is largely due to precipitation application of polyelectrolyte as flocculating aid is common. This process is suitable for the removal of dispersants and sulfur dyes. it is economically cheap, but it can sometimes be expensive due to the cost of chemicals. However, the disadvantage of this process is that large amounts of concentrated sludge as the end product and pH dependence of the process. However, reactive dyes are acidic. sufficient for 20% treatment efficiency color removal cannot be achieved. Most dyes are chemically either anionic or since they are cationic, they can theoretically be removed by ion exchange resins. Wastewater until the present regions reach saturation. With this way both dye cations and dye anions can be removed. Advantage of this method No adsorbent loss during regeneration and removal of soluble dyes solvents can be recovered after use. However, the ion exchanger because resins are restricted to use over a wide range of paints such as diperse paints, and Because regeneration with expensive organic organic solvents is mandatory when saturation is reached It is not widely used in the treatment of wastewater containing paint. This process regeneration If organic solvents such as methanol, which can be recovered later, are used is. Adsorption process is quite important in terms of color removal from wastewater. is an effective method. Organic dyes that are difficult or impossible to biodegrade they can be removed from the wastewater by keeping them on the surface of suitable adsorbents. Color removal The basic principle of the adsorption method is based on the affinity of various dyes to the adsorbent. Paint interactions between adsorbents; adsorbent surface area, particle size, temperature, pH value and contact time are affected by a number of physical and chemical factors. One of the most effective adsorbent materials used in the process is activated carbon. Active carbon adsorption is one of the most efficient processes for color removal from wastewater. It is one. However, some acid and reactive dyes have high solubility. Adsorption method is difficult to remove from wastewater.



The chemical structure of Acid Blue 25

(Acid Blue 25 (AB25) chemical formulè:C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>S Molecular Weight:416.38g/mole maximumwavelength:580 nm)

### 3.a.Prepare of the solution

200 ppm stock solution for Acid Blue 25 dyestuff used in the experiment it was prepared. To determine the optimum pH, solutions were prepared at different pH and optimum pH = 3.7 and 11 were determined. UV-vis spectrophotometer in the range of 200-800 nm absorbance maximum by wavelength scanning,  $\lambda_{max} = 580$  nm it was measured. All spectroscopic studies were performed at this wavelength. The solutions were prepared and the calibration graph was prepared and the regression value was calculated. Dilutions were made with the solvent at the pH of each solution.

### 3.b. Calibration of Acid Blue 25 dyestuff

The pH of the dyestuff can be studied by measuring for each pH at pH 2-12 and the concentration range was determined. At pH = 3.7 and 11, R<sup>2</sup> values were close to 1 and studies were performed in this range.

## 4.Result and Discussion

### 4.a.pH Effect on Adsorption of Acid Blue 25 dyestuff

pH is one of the most important parameters in dye removal. Different pH value The dyeing liquids adjustment leads to different planning results than the color depth adjustment and even the color change. In one place Weak acidic (pH 4.5 to 5.5), disperse dye is the most stable. Changes of solution pH can change the chemical behaviour of surface functional group, surface charge of sorbent, and the degree of ionization of adsorbate.

### 4.b. Adsorbent dose effective on adsorption Acid Blue 25

Variation in adsorbent dose is an important factor because it explains the removal capabilities of adsorbent for a meticulous dye concentration. In this study, 250 ppm stock solutions were prepared for each pH. The amount of polymer was determined as 10mg. Solutions were prepared using 20 ml sample and 10 mg polymer and adsorbance measurements were taken.

## 5. Conclusion

pH is very important factor affecting the adsorption process. In this study, the linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in detail in pH (2-12). To determine the optimum pH and pH was changed in the range of (2-12). The maximum adsorption pH was calculated. . The maximum adsorption amount was found to be at pH 3,7 and 11. For Acid Blue 25 (AB25), the amount of adsorbent on which the dyestuff and polymer poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub> interact with other was calculated to be 10 mg.

## References

- 1.Lin, SH- Adsorption of Disperse Dye by Powdered Activated Carbon' ', J. Chem. Tech. Biotechnol., 1993.
- 2.F. Şengül , Çevre-83 Semp ,İzmir (1983)
- 3.Felder, R.M., Rousseau, R. W., "Elementary Principles of Chemical Processes", 3rd ed., p. 275-278, Wiley, Newyork, 2000.
4. Calabro, V., Drioli, E., Matera, F. "Membrane Distillation in the Textile Wastewater Treatment", Desalination, 83, 209-224, 1991.



## Assessment of neuroprotective and antioxidant potentials of *Tribulus terrestris* L. aqueous and methanol extracts using *in vitro* assays

Sevgi Gezici<sup>1,\*</sup>, Didem Koçum<sup>1</sup>, Nazim Sekeroglu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Literature; Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University, 79000 Kilis, Turkey,

E-mail: drsevgigezici@gmail.com, sevgigezici@kilis.edu.tr

<sup>2</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture; Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University, 79000 Kilis, Turkey,

E-mail: nsekeroglu@gmail.com, sekeroglu@kilis.edu.tr

### Abstract

Cholinesterase enzyme inhibitors from plant sources have become the most effective therapy strategy in the treatment of neurodegenerative diseases. The present study was aimed to evaluate anticholinesterase enzyme inhibition of the aerial parts of *Tribulus terrestris* L. (fam. Zygophyllaceae) extracts against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. Since oxidative damage is one of the major factors contributing to neurodegeneration, *in vitro* antioxidant activities of the extracts were analyzed by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and cupric ion reducing capacity (CUPRAC) assays. The total phenolic and flavonoid contents of *T. terrestris* L. extracts were also analyzed by the Folin-Ciocalteu method and aluminum chloride colorimetric assay, respectively. The water and methanol extracts of the plant were found to have lower activity on AChE with the values 47.13±1.02% and 52.78±0.48%, respectively, whilst exhibited much higher activity on BChE (71.94±0.62% and 80.12±0.93%, respectively). In terms of total polyphenolic compositions of *T. terrestris* L. extracts, the water extract possessed of lower TPC and higher TFC (98.78±0.06 mg g<sup>-1</sup> extract as GAE and 258.06±1.10 mg g<sup>-1</sup> extract as QE), compared to the methanol extract. As regards to antioxidant activity, the extracts screened herein showed powerful ion reducing antioxidant capacity on FRAP and CUPRAC, the best antioxidant capacity was also observed against DPPH in a dose-dependent manner. In terms of the used extraction solvent, the methanol extract demonstrated higher bioactivity comparing with the water extract almost for all the antioxidant assays. To summarize, we evaluated probable *in vitro* neuroprotective effects, antioxidant capacities alongside phytochemical compositions of the extracts obtained from *T. terrestris* L. in the current study. The results of this study could be valuable scientific evidence in the prevention and treatment of oxidative stress related-diseases; however, detailed *in vivo* studies are necessary to discover plant-based pharmaceuticals.

**Keywords:** *Tribulus terrestris* L.; anticholinesterase activity; Alzheimer's disease; neuroprotection; antioxidant; polyphenolic content.

### INTRODUCTION

*Tribulus terrestris* L. (TT), belonging to Zygophyllaceae family, is native to south-eastern and Mediterranean Europe, and grows in Mediterranean regions and subtropical areas such as Southern USA, Egypt, Mexico, Spain, Bulgaria, India, Pakistan, China and Turkey (Pourali et al., 2017; Ammar et al., 2018). The fruits and seeds of this plant have a wide range of usage in folk medicine against various diseases and disorders including aphrodisiac, diuretic, anthelmintic, cough, hypertension, hypercholesterolemia, rheumatoid arthritis, kidney and cardiovascular diseases, due to its rich steroidal saponins, flavonoids, tannins, terpenoids, carbohydrates and alkaloids contents. Besides its therapeutic usage, it has been used as a dietary supplement against sexual impotency, edema, abdominal distention, and cardiac problems (Qi et al., 2018; Qari and El-Assouli, 2019).

Hydroxyl radical (OH), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and superoxide ion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) are of the important formation of Reactive Oxygen Species (ROS), whose overproduction have been reported to induce DNA damage, protein carboxylation, and lipid peroxidation, causing a variety of chronic health disturbances and diseases, such as cancer, ageing, cardiovascular diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Recent researches have indicated that various medicinal and aromatic plants (MAPs) can offer alternative sources of dietary ingredients to promote human health and might open promising opportunities for the treatment of troublesome diseases and infections (Sun et al., 2016; Sahoo et al., 2018). Although, there are so many methods for combatting neurodegenerative

diseases and disorders, they cannot always provide effective treatments and mediations. Therefore, an extensive research on developing new treatment strategies against these disorders are still needed nowadays. In this context, MAPs and natural products (NPs), widely originated from MAPs and their bioactive compounds, have been used for cure and treatment of many ailments and diseases in Anatolian folk medicine since ancient times (Awasthi et al., 2016; Godyń, et al, 2016; Gezici and Sekeroglu, 2019a).

So far, various medicinal plants and their secondary metabolites were analyzed by our research group regarding of their anticancer, antiproliferative, anticholinesterase, antityrosinase, antioxidant, and other biological activities (Sekeroglu et al., 2012; Orhan et al., 2013; Akgunlu et al., 2016; Sekeroglu et al., 2017; Gezici et al., 2017; Belkhodja et al., 2017; Karik et al., 2018; Gundogdu et al., 2018; Senol et al., 2018; Gezici, 2018; Sekeroglu et al., 2018; Shida et al., 2019; Gezici and Sekeroglu, 2019a; Gezici and Sekeroglu, 2019b; Gezici, 2019). Take into consideration our ongoing projects, screening anticholinesterase enzyme inhibition of the aerial parts of TT extracts against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes, evaluation free radical scavenging and ion reducing power capacity of the extracts, and determination total polyphenolic quantities of the extracts were aimed to evaluate in the current research.

## 5. MATERIAL AND METHODS

### 5.1. Plant Material

The aerial parts of *T. terrestris* L. (TT) were collected from Gaziantep province, and dried at laboratory condition. Taxonomic identification of plant material was performed by Department of Biology, University of Gaziantep (Gaziantep, Turkey) according to Flora of Turkey (Davis, 1972). A voucher specimen was deposited in the Biology Department of Kilis 7 Aralik University, Turkey. Plant material and taxonomic classification of the plant were given in the Figure 1.

Kingdom: *Plantae*

Subkingdom: *Viridiplantae*

Infrakingdom: *Streptophyta*

Superdivision: *Embryophyta*

Division: *Tracheophyta*

Subdivision: *Spermatophytina*

Class: *Magnoliopsida*

Superorder: *Rosanae*

Order: *Zygophyllales*

Family: *Zygophyllaceae*

Genus: *Tribulus* L.

Species: *Tribulus terrestris* L.



**Fig. 1.** Plant material and taxonomic classification of *T. terrestris* L.

### 5.2. Extract Preparation

Air dried samples (50 g) of the aerial parts from *T. terrestris* L. were extracted with methanol-MeOH, and distilled water-dH<sub>2</sub>O for 16-24 hours at the room temperature according to the maceration method as described in our previous work (Gezici and Sekeroglu, 2019b). The solvent was removed by using a rotary evaporator and drying under a lyophilizator. The powdered extracts were stored at -20 °C until used for the analyzes. Extraction yields (w/w%) of the MeOH, and dH<sub>2</sub>O extracts of the aerial parts of TT were determined as 3.356% and 8.485 % (w/w), respectively (Fig. 2).

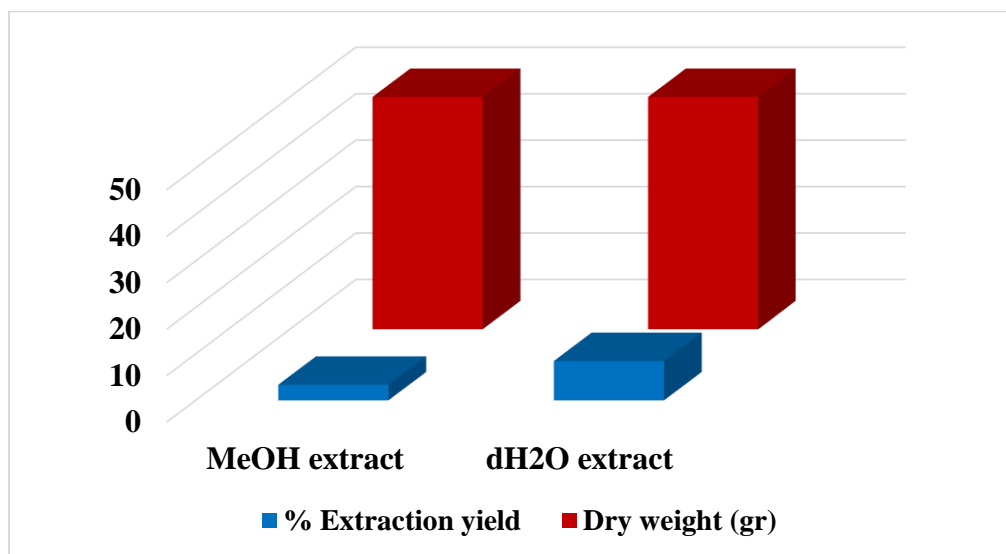


Fig. 2. Extraction yield (w/w) of the aerial parts of the plant

### 5.3. Determination of Total Polyphenolic Contents

Total phenolic compound (TPC) of TT extracts was determined in accordance with slightly modified Folin-Ciocalteu's method (Singleton and Rossi, 1965; Gezici and Sekeroglu, 2019b). Absorption was measured at 760 nm at a using a 96-well microplate reader (VersaMax Molecular Devices, USA). Total flavonoid content (TFC) of the extracts was calculated by aluminum chloride colorimetric method (Woisky and Salatino, 1998; Gezici and Sekeroglu, 2019b). A number of dilutions of quercetin were obtained to prepare a calibration curve. Absorbance of the reaction mixtures was measured at wavelength of 415 nm with a using a 96-well microplate reader (VersaMax Molecular Devices, USA). The total phenol and flavonoid contents of the extracts were expressed as gallic acid (GAE) and quercetin (QE) equivalents (mg g<sup>-1</sup> extract), respectively.

### 5.4. Antioxidant Activity Assays

Antioxidant activities of TT extracts were carried out using *in vitro* methods including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and cupric ion reducing capacity (CUPRAC) (Gezici et al., 2017; Sekeroglu et al., 2017; Gundogdu et al., 2018; Gezici and Sekeroglu, 2019b). The extracts and commercial antioxidant standards were dissolved in DMSO at different concentrations, ranging from 100 µg mL<sup>-1</sup> to 1000 µg mL<sup>-1</sup> for the antioxidant assays.

### 5.5. Enzyme Inhibition Assays

Neuroprotective potentials of the extracts against AChE (acetylcholinesterase) and BChE (butyrylcholinesterase) were evaluated in that study. For the enzyme inhibition assays, the extracts were dissolved in DMSO at different concentrations, ranging from 100 µg mL<sup>-1</sup> to 400 µg mL<sup>-1</sup>. AChE and BChE inhibitory activity of the samples was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (1961). Electric eel AChE (EC 3.1.1. Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1. Sigma, St. Louis, 7 MO, USA) were used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as substrates of the reaction. 5,5'-Dithio- bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All conditions and calculations were same as described in our previous publications (Senol et al., 2018; Gezici and Sekeroglu, 2019a). The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software. The experiments were done in quadruplicate. Galanthamine hydrobromide (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as the reference drug.

### 5.6. Statistical analysis

The assays were performed at least triplicate, and the results were expressed as mean and standard deviation values (mean ± SD). Statistical differences between the references and the sample groups were evaluated by ANOVA

(one way). Correlations were performed using the correlation and regression in the EXCEL program. P value of <0.05 was considered to be statistically significant, p <0.01 and p <0.001 were considered to be very significant.

## 6. RESULTS

### 6.1. Results of Total Polyphenolic Contents

Total polyphenolic compositions of TT extracts were identified spectrophotometrically in this research. Gallic acid (GA) and quercetin (Q) equivalent as commercial standards for total phenolic and flavonoid contents. Calibration equation for total phenol quantities of the extracts were calculated accordingly the equation ( $y=0.9364x-0.707$ ,  $r^2=0.9967$ ) as GAE (mg g<sup>-1</sup> of extract), whilst their total flavonoid quantities were determined accordingly the equation ( $y=0.9344x-0.703$ ,  $r^2=0.9967$ ) as QE (mg g<sup>-1</sup> of extract). In terms of total polyphenolic compositions of TT extracts, the dH<sub>2</sub>O-extract possessed of lower TPC and higher TFC (98.78±0.06 mg g<sup>-1</sup> extract as GAE and 258.06±1.10 mg g<sup>-1</sup> extract as QE), compared to the MeOH-extract (Table 1).

**Table 1.** Total polyphenolic contents of the TT extracts at 1000 µg mL<sup>-1</sup>

Extract type	Total phenolic content (TPC) (mean ± SD)	Total flavonoid content (TFC) (mean ± SD)
MeOH	126.10±1.04*	206.35±0.19**
dH <sub>2</sub> O	98.78±0.06 **	258.06±1.10**

SD: Standard deviation (n=3).

\*p value of < 0.05; \*\*p value of < 0.01.

### 3.2. Results of Antioxidant Capacity

Antioxidant activity of the aerial parts extracts obtained from TT were evaluated by using free radical scavenging activity against DPPH and ABTS radicals, and ion reducing antioxidant power capacity on FRAP and CUPRAC. As regards to antioxidant activity, the extracts screened herein showed powerful ion reducing antioxidant capacity on FRAP and CUPRAC, the best antioxidant capacity was observed against DPPH in a dose-dependent manner. In terms of the used extraction solvent, the MeOH extract demonstrated higher antioxidant capacity comparing with the dH<sub>2</sub>O extract almost for all the antioxidant assays (Fig. 3, and Table 2).

Free radical scavenging activity of the MeOH extract on DPPH were determined as 82.10±0.16% inhibition, while it was found as 76.62±1.01% inhibition for the dH<sub>2</sub>O extract. ABTS radical scavenging activity of TT extracts were detected as lower than DPPH free radical scavenging, as figured out in Figure 2. As for ion reducing antioxidant power capacities of the TT extracts, the tested extracts were exerted the strong antioxidant activity on FRAP and CUPRAC. The results were determined as absorbance values (mean ± SD) of the tested extracts, as given in the Table 2.

**Table 2.** Reducing power capacity of the TT extracts for FRAP and CUPRAC

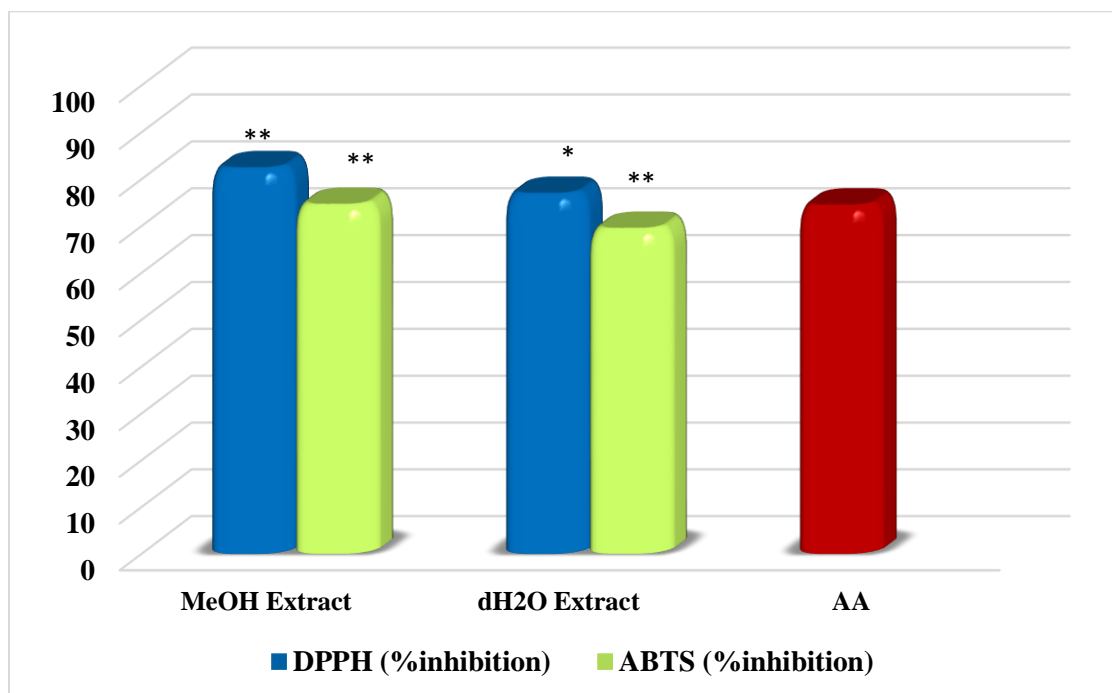
Extract type	FRAP	CUPRAC
MeOH	2.556 ± 0.004*	3.608 ± 0.015***
dH <sub>2</sub> O	2.190 ± 0.086***	3.024 ± 0.062**
Chlorogenic acid <sup>a</sup>	3.602 ± 0.012	---
Trolox <sup>b</sup>	---	2.210± 0.004

The values were given as absorbance values, and higher absorbance indicates greater antioxidant activity.

<sup>a</sup>Chlorogenic acid was used as a standard antioxidant for FRAP assay.

<sup>b</sup>Trolox was used as a standard antioxidant for CUPRAC assay.

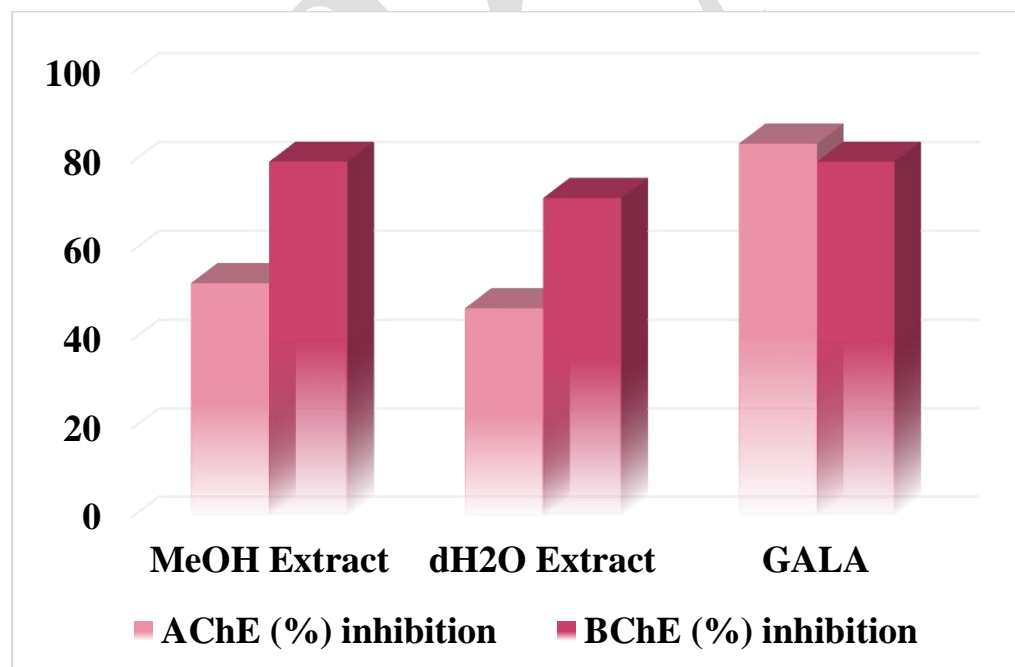
\*p value of < 0.05; \*\*p value of < 0.01; \*\*\*p value of < 0.001.



**Fig. 3.** Free radical scavenging activity of the TT extracts against DPPH and ABTS radicals  
The values were presented as percentage of inhibition obtained from three independent experiments (n=3).  
AA; Ascorbic acid was used as a standard antioxidant for DPPH and ABTS assays.  
\*p value of < 0.05; \*\*p value of < 0.01.

### 3.3. Results of Neuroprotective Activity

Neuroprotective activity of the extracts was assessed through enzyme inhibition assays on cholinesterase enzymes. The pod-extracts of the plant subjected to enzyme inhibitory assays on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), which are closely related to pathogenesis of neurodegenerative disease.



**Fig. 4.** Neuroprotective effects of TT extracts against AChE and BChE at 400 µg mL<sup>-1</sup>  
The values were presented as mean ± SD from three independent assays.  
GALA; Galanthamine; commercial standard for AChE and BChE inhibition.

As given in the Figure 4, the water and methanol extracts of the plant were found to have lower activity on AChE with the values  $47.13 \pm 1.02\%$  and  $52.78 \pm 0.48\%$   $p < 0.01$ , respectively, whilst exhibited much higher activity on BChE ( $71.94 \pm 0.62\%$  and  $80.12 \pm 0.93\%$ ,  $p < 0.01$  respectively) (Fig. 4). In general, a significant correlation was found between the total antioxidant capacities and neuroprotective potentials of the tested extracts. Correlation analysis indicated that the methanol extract, which possessed higher total phenolic components than the water extract, was also found the more efficient in terms of antioxidant capacities and neuroprotective potentials.

#### 4. CONCLUSION

To the best of our knowledge, there has been no study so far conducting to examine comprehensively biological activities of aerial parts of *T. terrestris* L. Thus, the results obtained from this research could be the first data for the literature. Consequently, a strong correlation was observed between antioxidant capacities of the TT extracts and their neuroprotective potentials. The results revealed that TT has a significant potential to be used for treatment of neurodegenerative diseases as an anti-cholinesterase agent. Furthermore, it appears to be a natural antioxidant source for managing oxidative stress related diseases as well as its rich polyphenolic contents.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Genetics Laboratory, Advanced Technology Application and Research Center, Kilis 7 Aralik University for technical support.

**Conflict of interests:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- [26] Akgunlu, S., Sekeroglu, N., Koca-Caliskan, U., Ozkutlu, F., Ozcelik, B., Kulak, M., Gezici, S., 2016. Research on selected wild edible vegetables: Mineral content and antimicrobial potentials. *Ann. Phytomed.* 5(2), 50-57. <https://doi.org/10.21276/ap.2016.5.2.6>.
- [27] Ammar, N. M., El-Hawary, S. S. E., Mohamed, D. A., Afifi, M. S., Ghanem, D. M., Awad, G. 2018. Phytochemical and biological studies of *Tribulus terrestris* L. growing in Egypt. *Inter J. Pharmacology*, 14(2), 248-259.
- [28] Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P., & Dwivedi, U. N. 2016. Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products. *Journal of the neurological sciences*, 361, 256-271. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.01.008>.
- [29] Belkhdja, H., Meddah, B., Gezici, S. 2017. Anti-Inflammatory Effects of Essential Oils From *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* on Experimental Models of Acute and Chronic Inflammation in Rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), 180-184. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.8>.
- [30] Davis, P.H. 1972. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 4, Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [31] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- [32] Gezici, S. 2018. Promising anticancer activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) essential oil through induction of both apoptosis and necrosis. *Annals of Phytomedicine*, 7(2), 38-45. <https://doi.org/10.21276/ap.2018.7.2.5>.
- [33] Gezici, S., 2019. Anticancer, Antiproliferative, Lysosomal and Lactate Dehydrogenase Inhibitory Effects of Fruit Extracts from Sumac (*Rhus coriaria* L.) on Human Lung Cancer Cells. *Acta Oncol Tur.* 2019; 52(1): 160-168. <https://doi.org/10.5505/aot.2019.09326>.
- [34] Gezici, S., Sekeroglu, N., 2019a. Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.* <https://doi.org/10.2174/1871520619666181224121004>.
- [35] Gezici, S., Sekeroglu, N., 2019b. Neuroprotective potential and phytochemical composition of acorn fruits. *Ind. Crop. Prod.* 128, 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.082>.
- [36] Gezici, S., Sekeroglu, N., Kijjoa, A., 2017. In vitro Anticancer Activity and Antioxidant Properties of Essential Oils from *Populus alba* L. and *Rosmarinus officinalis* L. from South Eastern Anatolia of Turkey. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51(3), 498-503. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.3s.74>.
- [37] Godyń, J., Jończyk, J., Panek, D., & Malawska, B. 2016. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*, 68(1), 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.07.006>.
- [38] Gundogdu, M., Tunçtürk, M., Berk, S., Şekeroglu, N., Gezici, S., 2018. Antioxidant Capacity and Bioactive Contents of Mulberry Species from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 52(4), 96-101. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.82>.
- [39] Karik, U., Çinar, O., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N., Gezici, S. 2018. Essential Oil Composition of Some Sage (*Salvia* spp.) Species Cultivated in İzmir (Turkey) Ecological Conditions. *Ind. J. Pharm. Educ. Res.* 52(4), 102-107. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.83>.
- [40] Orhan, I.E., Atasu, E., Senol, F.S., Ozturk, N., Demirci, B., Das, K., Sekeroglu, N., 2013. Comparative studies on Turkish and Indian *Centella asiatica* (L.) Urban (gotu kola) samples for their enzyme inhibitory and antioxidant effects and phytochemical characterization. *Ind. Crop. Prod.* 47, 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.022>.
- [41] Pourali, M., Yaghoobi, M. M., Sormaghi, M. H. S. 2017. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of *Tribulus terrestris* L. Fruit Extract on Human Prostate Cancer Lncap and Colon Cancer HT-29 Cell Lines. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(2). <http://dx.doi.org/10.5812/jjnpp.33561>.
- [42] Qari, S. H., El-Assouli, S. M. 2019. Evaluation of cytological and genetic effects of *Tribulus terrestris* fruit aqueous extract on cultured human lymphocytes. *Saudi journal of biological sciences*. 26, 91-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.012>.
- [43] Qi, P., Zheng, Y., Shen, Y., Wang, J., Bi, Q., Feng, R., ... & Sun, S. 2018. Characterization and discrimination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* L. and its three different aerial parts by chemical profiling with chemometrics analysis. *Journal of separation science*, 41(22), 4212-4221.
- [44] Sahoo, A.K., Dandapat, J., Dash, U.C., Kanhar, S. 2018. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J. Ethnopharmacol.* 215, 42-73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.015>.

- [45] Sekeroglu, N., Karaoglan, M., Gezici, S., Kulak, M., Ozkutlu, F., Kacar, O., Gul, F., 2018. Variation in the composition of the essential oils, hypericin and mineral elements in aerial parts, stem and flower of *Hypericum capitatum* (CHOISY) growing in Turkey with oxidative DNA damage protective activity. *J. Pharm. Res.* 17, 67-77. <https://doi.org/10.18579/jperkc/2018/17/2/123613>.
- [46] Sekeroglu, N., Senol, F.S., Orhan, I.E., Gulpinar, A.R., Kartal, M., Sener, B., 2012. In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food Res. Int.* 45, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.0088>.
- [47] Sekeroglu, N., Uurlu, E., Kulak, M., Gezici, S., Dang, R., 2017. Variation in Total Polyphenolic Contents, DNA Protective Potential and Antioxidant Capacity from Aqueous and Ethanol Extracts in Different Plant Parts of *Hypericum perforatum* L. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 51, 1-7. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.2s.43>.
- [48] Senol, F. S., Sekeroglu, N., Gezici, S., Kilic, E., Orhan, İ. E. 2018. Neuroprotective potential of the fruit (acorn) from *Quercus coccifera* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 42(2), 82-87. <https://doi.org/10.3906/tar-1711-18>.
- [49] Shida, W., Tateishi, H., Fujita, M., Koga R., Radwan, M.O., Ciftci, H.I., Otsuka, M., Husham AL-Saadi, D., Watanabe, M., Gezici, S., Wada, M., Sekeroglu, N., Watanabe, T. 2019. Anticancer activity of extract from twigs of Caucasian beech in Turkey. The Fifth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences (ISPBS-5), Cappadocia-Turkey, Oral presentation p: 29. [www.ispbs.org](http://www.ispbs.org).
- [50] Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- [51] Sun, J., Ren, X., Qi, W., Yuan, D., Simpkins, J.W. 2016. Geissoschizine methyl ether protects oxidative stress-mediated cytotoxicity in neurons through the 'Neuronal Warburg Effect'. *J. Ethnopharmacol.* 187, 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.034>.
- [52] Woisky, R.G., Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>.

## Valorization of clover stalk and polyvinyl chloride wastes via in co-pyrolysis using thermogravimetric analysis

Eylem PEHLİVAN<sup>1</sup>, Ümran İrem TEMİZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bilecik Şeyh Edebali University, Faculty of Engineering, Department of Chemical Engineering, Bilecik, Turkey

Email: iremtemizfb@gmail.com

### Abstract

In this study, the pyrolytic degradation mechanism of clover stalk (CS) and its blend with waste polyvinyl chloride (PVC) were investigated. Clover stalk and polyvinyl chloride wastes were determined by experiments done in 0:1, 1:1 and 1:0 blending ratio intervals. Pyrolysis process was conducted with a heating rate of 10°C/min from room temperature to 1000°C in nitrogen atmosphere with 100 cm<sup>3</sup>/min flow rate by thermogravimetric analyzer. After pyrolysis experiments, with the obtained TG data kinetic equations among pyrolysis process were derived, decomposition temperatures and thermal behaviors of mixtures were determined. To elaborate kinetic analysis and to determine kinetic parameters, Arrhenius and Coats Redfern methods was used. After co-pyrolysis experiments in TGA, raw materials were also pyrolyzed in fixed bed reactor in order to obtain solid, liquid and gas products in nitrogen atmosphere with 100 cm<sup>3</sup>/min flow rate from room temperature to 550°C. Pyrolysis products were characterized by using FT-IR, GC-MS, elemental characterization techniques.

**Keywords:** Co-pyrolysis, biomass, clover stalk, polyvinylchloride, kinetic, thermogravimetric analysis.

### 1.INTRODUCTION

The energy requirement is accelerating drastically when the population growth and the increase in the technological developments come across with the changing consumption habits of modern society. (M.Luo,1999). When considering the most popular plastic material both in daily and industrial usage, plastic stand out among other polymers: polyvinyl chloride (PVC). Due to its good chemical and physical resistance, it can be used in different applications like construction, packing, wires and cables, transport, furniture, etc. As a result, the PVC waste amount is increasing significantly, and the elimination of these waste materials has become a major environmental problem (Saeed L, 2004). Although, Turkey has limited fossil sources, due to its geographical location, the agricultural sector has been Turkey's largest employer and a major contributor. In fact, this situation results in large agricultural potential which can be evaluated as biomass sources. That is why biomass energy should come forward among other alternative energy sources (Kaya D, 2008). The cultivation area of clover in the world is 35 million hectare and production is 255 million ton. Forage crops has 5% (961 000 hectare) rate of cultivation areas in Turkey. 9% of the world forage production belongs to Turkey. Cultivation area of clover is 444 030 hectare in Turkey. Cultivation area of clover is 36.6 percent of all forage crops' cultivation area which is 19.3% of our haymaking. World Turkey producers: USA, Argentina, Canada, Russia, Italy, China (Anonymous 2012c). Thermogravimetric analysis (TGA) comes in the first rank for the pyrolysis of solid raw materials such as coal, plastics and biomass. After the thermogravimetric analysis experiments, thermal and kinetic behaviors of the pyrolysis and experimental parameters can be determined with the obtained TG data (Zabaniotou AA, Kantarelis EK, 2008).

In this study, PVC was selected as feedstock besides clover stalk (CS) in order to evaluate the feedstock in a thermochemical conversion process. Pyrolytic behaviors of CS and PVC and co-pyrolytic behaviours of CS-PVC mixture, was investigated under inert atmosphere using a thermogravimetric analyzer. Thermogravimetric analysis were carried out at 10 °C/min heating rate and the related kinetic parameter, activation energy (E<sub>a</sub>), preexponential factor (A) were calculated by Arrhenius and Coats Redfern methods in order to evaluate clover and Polyvinyl chlorid as a potential feedstock for thermochemical conversion. Pyrolysis of clover and Polyvinyl chlorid and their blend in definite ratio (1:1, weight) was carried out in a fixed-bed reactor at heating rate of 100°C per minute at temperature of 550°C and a nitrogen flow rate of 100 cm<sup>3</sup> per minute. Experimental results showed that mixing biomass-plastic material created a positive synergy in terms of liquid and gas yields and brought about a variety in types of chemicals that can be evaluated in different applications.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Materials

The biomass sample, clover stalk (CS), was obtained from a infield in the of Turkey. The sample was dried at room temperature and then ground mechanically. A mean particle size range (1.094 mm) was selected. On the other hand, polyvinyl chloride (PVC) sample was obtained from a post-consumer plastic collection and recycling plant.

### 2.2. Experimental Procedure

Kinetic parameters such as activation energy of the pyrolysis mechanism were derived with the obtained TGA data. Thermogravimetric Analysis (TGA) was performed for the biomass sample and char, for a detailed analysis of the weight loss characteristics during pyrolysis. For about 10 mg of fine powders, a TGA analyzer (Setaram, Labsys evo) was used to measure the sample weight, while being heated from room temperature to 1000 °C with a heating rate of 10 °C/min, under a nitrogen atmosphere (100 ml/min). The recorded weight loss history was normalized for the initial weight, and its rate was calculated. Experimental studies were conducted in a fixed-bed tubuler reactor with a heating rate of 100°C.min<sup>-1</sup> final pyrolysis temperature of 550°C and a mean particle size of 1.094mm. Schematic diagram of the unit is described in elsewhere (Uzun and Sarioğlu, 2009). The liquid phase was collected in cold traps maintained at about 0°C using salty-ice. The traps and reactor were washed with dichloromethane (DCM). Water and oil dissolved in DCM are immiscible and they can be separated easily by a separation funnel. The oil and the solvent mixture were passed over anhydrous sodium sulfate in order to separate the water from the solution. Then, DCM in the solution was removed by rotary evaporator and the pyrolytic oil was obtained. The residual solid material was weighted as char. Char yields were determined from the overall weight losses of the reactor. The gas yield of the system was calculated by using overall material balance. Each run was repeated four times and the average value was obtained as product yield. All yields were calculated on dry-ash-free basis.

## 3. RESULT AND DISCUSSION

### 3.1. Characterization of raw materials

Before thermochemical conversion of raw materials, some characterization studies were carried out for biomass samples. characteristics of the raw materials were determined and the results are summarized in Tab. 1-2. When the proximate analysis results of the biomass samples were evaluated, it was found that the content of moisture in CS are slightly higher. In the pyrolysis systems, the content of the moisture constitutes some problems such as lowering the heating value. When the ash composition was investigated, lower ash content than volatiles shows that the biomass materials are suitable to use in pyrolysis since higher ash content of biomass may cause slagging, corrosion and fouling.

**Table 1.** Properties of raw materials

Proximate analysis	Method	CS (%)	PVC (%)
Moisture	ASTMD 2016-74	6.5	0.29
Ash	ASTMD-1102-84	12.87	12.91
Volatile	ASTME 897-82	67,46	46,91
Fixed carbon	Difference*	13.17	39.89
Bulk density(kg/m <sup>3</sup> )	ASTM,1983a	223.4	85.2
Compenent analysis			
Hemicellulose	TS 4431	22.09	-
Lignin	(Li, S.and friends,1990)	25.09	-
Extractive material	ASTMD-1106	11.99	-

\*Calculated by difference.

All of the analysis results are reported after triple measurements and the average elemental composition, together with H/C ratio and calorific value, are given in Table 2. The amount of elemental carbon, hydrogen, and nitrogen present in the products was determined by an elemental analyzer while the oxygen content was calculated by the difference. It can be seen that PVC had the C content with 56.58% while CS had the C content with 42.36%.

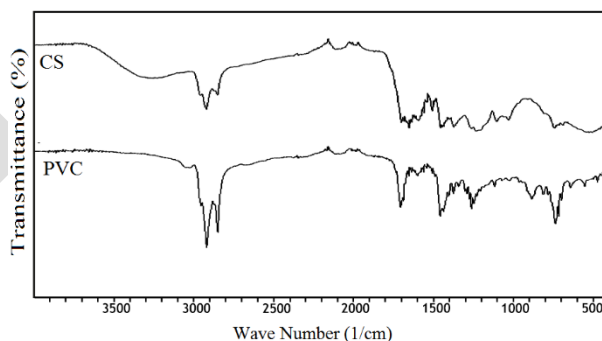
Additionally, lower quantities of hydrogen (4.82%) and nitrogen (0.25%) were detected in PVC. The calorific values of the biomass and polymer samples that were calculated by Dulong's formula as high heating values are also shown in Table 2. The calorific value represents the total energy content released when the material is burnt in air, including the latent heat of water vapor. Hence, the calorific value may be considered as the maximum energy quantity that may potentially be recovered from the material. It was found that the calorific value of the biomass (13.16 MJ/kg) was lower than those for the waste polymers due to the nominal value of elemental carbon. The elemental composition of the liquid product obtained by the pyrolysis of PVC was 56.58 wt % carbon, while CS:PVC liquid product included 70.12wt% carbon. The higher heating value of CS bio-oil was estimated by Dulong's equation and found to be approximately 32.29 Mj/kg. The pyrolytic oils were characterized by a lower oxygen content compared to their precursors. When the analysis results of co-pyrolytic tars were evaluated, it was clearly seen that CS and PVC blending decreased the oxygen content and H/C ratio, and increased calorific values of the liquid products. Since lower oxygen content makes the liquid product more stable, and higher carbon content is required to enhance the calorific value, the most promising co-pyrolysis oil may be stated as CS-PVC which has H/C and O/C ratios of 1.13 and 0.24, respectively. Further comparison of the heating value ratios with conventional fuels indicates that the heating values of the bio-oils are similar to those of light petroleum.

**Table 2.**Ultimate analysis of raw materials (wt.%).

	CS	PVC	CS	PVC	CS:PVC
C	42.36	56.58	68.25	82.47	70.12
H	5.45	4.82	8.68	7.45	6.59
N	1.96	0.25	4.48	0.06	0.76
S	0.14	1.03	18.43	9.56	22.25
O*	50.09	37.32	0.16	0.45	0.28
H/C	1.53	1.57	1.53	1.08	1.13
O/C	0.89	1.18	0.20	0.09	0.24
Calorific value(Mj/kg)	13.16	19.46	32.29	36.96	29.24

\*By difference

Fig. 2 includes the FT-IR spectra of raw materials. Biomass material and PVC had common peaks between 3600 and 3200  $\text{cm}^{-1}$  in the IR spectra. For biomass material these vibrations could be caused by the inherent water in the structure or it is also possible to say that lignin as the main constituents of biomass could cause these vibrations. For PVC, it is known that this peak comes from O-H stretching of diethylene glycol end-group. The C-H vibrations are due to the O-H stretching were the result of the aliphatic compounds. The vibrations in the range of 1775 and 1650  $\text{cm}^{-1}$  represents the ketones, aldehydes and carboxylic acids and these peaks are nature to the hemicellulose in the structure. On the other hand, the peaks of 1680–1575  $\text{cm}^{-1}$  are together the stretching vibrations of C-C that is compatible with the presence of ketone and aldehyde groups. In addition the peaks between 670 and 900  $\text{cm}^{-1}$  and around 1500  $\text{cm}^{-1}$  are the indicators of the polycyclic aromatic compounds in the structure.



**Figure 2.**FT-IR of raw materials.

### 3.2. Pyrolytic and co-pyrolytic characteristics of samples in TGA

TG curve reveal weight loss as a function of temperature arising from phase transitions during pyrolysis reactions. Hence TG and dTG curves of the samples and their blends are given in Figure 3. Thermal decomposition of the

biomass material generally constitutes from three steps; (i)Decomposition of unbound water. (ii)Decomposition of volatile substances. (iii)Decomposition of cellulose, hemicellulose and lignin. Thermal decomposition of CS mainly consisted of three weight loss stages: loss of moisture bound (from ambient temperature up to approximately 131 °C). active pyrolysis region is between approximately between 200°C and 391°C. Because the most weight loss occur at this region. At this last region passive pyrolysis due to secondary decomposition at high temperatures over 392 °C. In this region weight remain stable due to char and ash. Initially it can be seen that the thermal breakdown of plastic materials needed higher temperatures. The main breakdown in the skeleton of this plastic was observed in two steps. These two stages can be clearly seen from the shoulders in the TG curve of PVC as shown in Fig.3. A structure lost; (i) a 52% of the initial weight between 225 and 380°C which is known as the main breakdown of the polymer. (ii) a 23% of the initial weight between 383 and 560°C can be explained due to the volatilization of adherent HCl in the main structure of PVC. The first step is mainly a dechlorination process accompanied by depolymerization caused the first step. The amount of the energy for this reaction was reported as 179.29 kJ/mol. The second step involved further cracking process of the residue that resulted in low molecular hydrocarbons including alkene and aromatic compounds (S. Ma. J. Lu. J. Gao,2002). In general thermal decomposition range for biomass materials is between 36–634°C and 225–560°C for plastics. From this perspective it is clear that thermal degradation temperature range of biomass materials is wider than plastics. Above this temperature only a small amount of weight loses due to continuous lignin degradation occurred. In the light of the mentioned results. Final temperature for the fixed-bed experiment 550°C was determined. Fixed-bed pyrolysis experiments were carried out at the same conditions with the TGA experiments except for the final temperature. For individual samples and their blend (1:1) calculated activation energies by using Arrhenius method and Coats Redfern method were given at Table 3. Activation energy value was calculated. This thermal behavior of energy need is higher for the decomposition of plastic material than the biomass. Since PVC is a complex compound with an aromatic ring in the structure. Energy barrier needed to be brought through requires more energy. Varying activation energies shows that biomass–plastic mixture have different pyrolysis reactivities at different temperatures ranges.

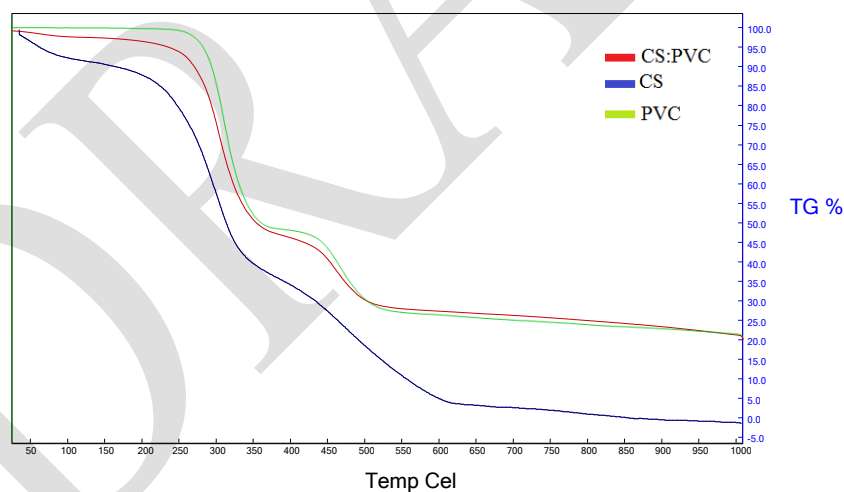


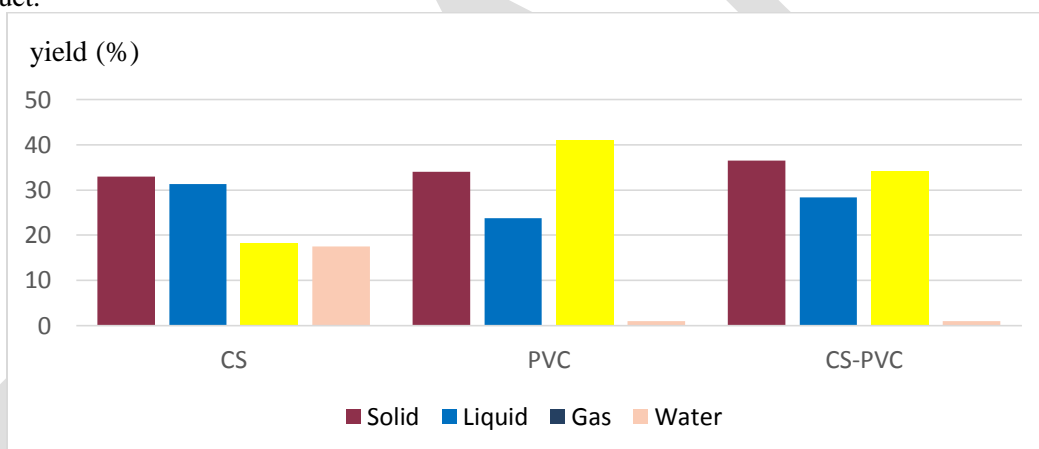
Figure 3. TG curves of samples and the blends.

**Table 3.** Kinetic parameters for the pyrolysis of individual materials.

Sample name	Temperature(°C)	Conversion	Arrhenius method		Coats and Redfern method	
		(%)	Ea (kJ/mol)	R <sup>2</sup>	Ea (kJ/mol)	R <sup>2</sup>
CS	36-131	8.2	45.02	0.9108	70.55	0.9688
	200-391	54.2	71.39	0.9778	76.85	0.9976
	392-634	33.1	111.36	0.9353	27.79	0.9772
PVC	225-380	52	154.69	0.9817	179.29	0.9868
	383-560	23	210.95	0.9905	214.84	0.9807
CS:PVC	24-100	4	29.34	0.9035	52.59	0.9914
	103-395	48	56.13	0.9405	66.04	0.9883
	396-540	18	168.03	0.9498	194.94	0.9768

### 3.3. Pyrolysis and co-pyrolysis product yields

Fig. 4. shows the product yields obtained during the pyrolysis. The liquid product yields were determined as 31.29, 23.8 and 28.36% for CS, PVC and CS-PVC, respectively. Maximum liquid yield was achieved with the CS. The synergy during the thermal degradation process of biomass-plastic mixture is still phenomena. In this study it is clear that mixing biomass- plastic together did increase the liquid product yields in the light of experimental results. Since the final temperature was high for the decomposition of plastic material and they decomposed mainly as liquid and gas products. It is not surprising that the gas yield of PVC is higher than the biomass material since the plastic decomposed easily at high temperature regions. High temperature region caused PVC to decompose mostly as gas product.



**Figure 4.** Pyrolysis product yields

### 3.4. Characterization of liquid products

Fig. 5. shows the FT-IR spectra of the obtained oils of individual raw materials and their mixtures. The large intense band between 3600 and 3200 cm<sup>-1</sup> indicates the presence O-H coming from the moisture content of the biomass. The small peaks followed the O-H vibrations between 3100 and 3000 cm<sup>-1</sup> as a result of aromatic rings. The peaks between the 2980 and 2850 cm<sup>-1</sup> belonged to C-H asymmetric stretchings. In the range of 1275–1200 cm<sup>-1</sup> ether bands were observed. The peaks at 1600, 1500, 1580 and 1450 cm<sup>-1</sup> are belong to C-C bonding. The vibrations occurred at 1650–1750 cm<sup>-1</sup> showed the C-O bondings and they are the indicative of ketones and aldehydes. The oxygenated functional groups of O-H, C-O, C=O and aromatic compounds showed that liquid products are oxygenated and acidic. It was reported that high amounts of oxygenated groups decrease the calorific value because C-O bonds do not release energy during thermal process (İslam MR, and friends, 1990). The vibrations between 700 and 900 cm<sup>-1</sup> were related to aromatic compounds in the liquid product. On the other hand the signals between 1300 and 1400 cm<sup>-1</sup> can be attributed with the alkyl groups. Besides biomass materials, PVC also had a large intense band between 3600 and 3200 cm<sup>-1</sup> which is the indicator of O-H bonding. However plastic

material do not have inherent water in their structure unlike biomass materials. This peak could be caused by the decomposition of ethylene glycol end group from the main PVC structure due to the effect of high temperatures.

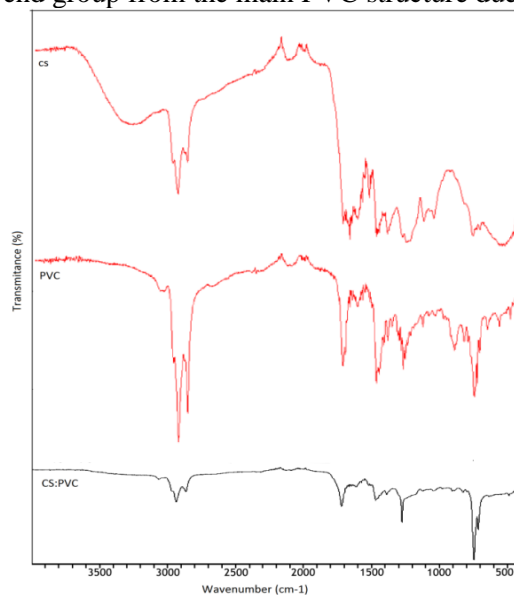
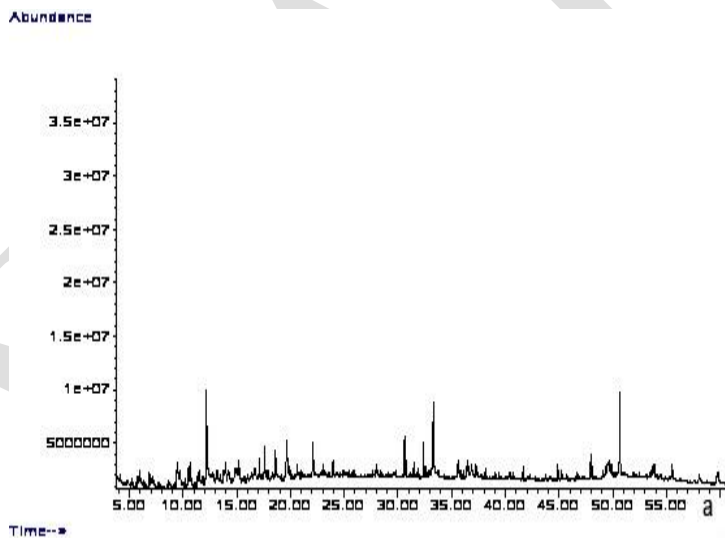
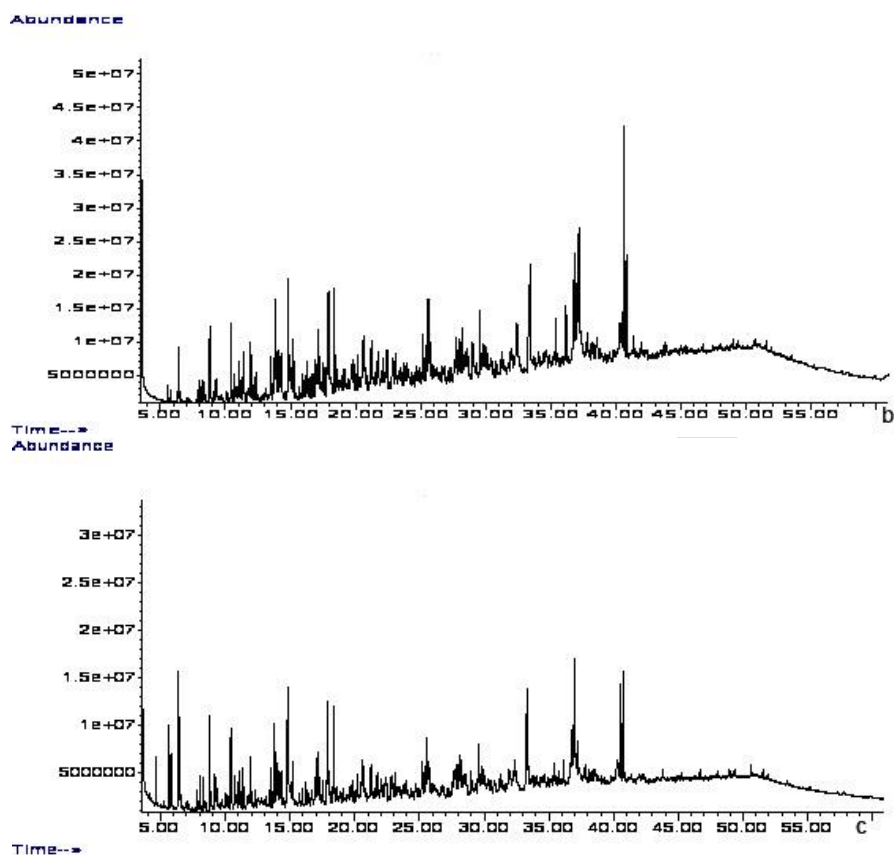


Figure 5. FT-IR result of pyrolytic oils





**Figure 4.** GC–MS chromatogram of bio-oils CS(a), PVC(b) and CS-PVC(c)

**Table 4.** Tentative identification of bio-oil compounds by GC–MS

Compound	CS	PVC	CS-PVC
Aldehydes and Ketones	7.67	5.46	-
Phenol and derivatives	45.42	-	-
Alcols	3.66	0.68	0.47
Acids	16.74	9.03	6.55
Esters	4.24	11.66	6.59
Alkans and alkenes	15.36	12.35	5.34
Furans	2.08	-	-
Benzene and derivatives	4.81	24.12	18.38
PAHs and derivatives	-	39.97	35.39

GC–MS is an important, quick and practical tool for the determination of various complexes of organic compounds found in the pyrolytic oil. Biomass has three main compounds: cellulose, hemicellulose and lignin. With the effect of high temperatures, these elements were decomposed as hydrocarbons such as alkanes and alkenes, phenols and alkylated derivatives, aromatics with single ring (benzene, toluene, indene), carboxylic acids, carbonyls, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with more than a single ring, alcohols and furans (Pütün, E. and friends, 2008) Table 4 shows the list of the identified compounds of all bio-oils obtained from GC–MS (Figure 4). When the GC–MS results of biomass-plastic mixtures were investigated, it was observed that mixtures generally had the compounds which found mainly in the plastic material. The PVC had the maximum content of PAHs and derivatives while the CS bio-oil had the maximum amounts of phenol and derivatives shown in Tab. 4.

#### 4. CONCLUSIONS

Experimental results demonstrated some main differences between the thermal behaviours of biomass and plastic. Thermal degradation of biomass material took longer than the plastic material and higher temperatures were needed in order to provide structural breakdown. The oil yields were determined to be higher for biomass-PVC mixture than the biomass. In addition, the FT-IR and GC-MS results of the liquid products showed the rich compositions of the pyrolytic oils produced by biomass and plastic material. This indicates that coats redfern and Arrhenius methods might be applicable to two step processes such as that of PVC decomposition. Finally pyrolysis can be an alternative solution for the evaluation of agricultural-plastic wastes for the production of liquid products and chemical.

#### REFERENCES

- Anonymous 2012c. Plant Production Statistics-2012. T.C. Prime Minister of Turkey Statistical Institute.
- Kaya D, Canka-Kılıç F, Baban A, Dikeç S 2008. Administrative, institutional and legislative issues on agricultural waste exploitation in Turkey. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 12 : 417–436.
- Islam MR, M. Parveen, H. Haniu 2010. Properties of sugarcane waste-derived bio-oil obtained by fixed-bed-tube heating pyrolysis. *Bioresource Technology*, 101 : 4162–4168
- Li S, Xu S, Liu S, Yang C ve Lu Q 2004. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology*, 85 : 1201-1211.
- Luo M, Curtis CW 1999. Two stage co-processing of coal with model and commingled waste plastics mixtures. *Fuel Processing Technology*, 59 : 163–187.
- Saeed L, Tohka A, Haapala M, Zevenhoven R 2004. Pyrolysis and combustion of PVC. PVC-wood and PVC-coal mixtures in a two-stage fluidized bed process. *Fuel Processing Technology*, 85 : 1565–83.
- Ma S, Lu J, Gao J 2002. Study of the low temperature pyrolysis of PVC. *Energy Fuels*, 16 : 338–342.
- Pütün E, Ates F, Pütün AE 2008. Catalytic pyrolysis of biomass in inert and steam atmospheres. *Fuel*, 87 : 815–824.
- Uzun BB, Sarioğlu N 2009. Rapid and catalytic pyrolysis of corn stalks. *Fuel Processing Technology*, 90 : 705-716.
- Zabaniotou AA, Kantarelis EK, Theodoropoulos DC 2008. Sunflower shells utilization for energetic purposes in an integrated approach of energy crops: laboratory study pyrolysis and kinetics. *Bioresource Technology*, 99 : 3174–81
- Zhou L, Luo T, Huang Q 2009. Co-pyrolysis characteristics and kinetics of coal and plastic blends. *Energy Conversion Management*, 50 : 705–10.

## The effect of pH in the removal of synthetic reactive acid violet 7 dyes from magnetic photocatalytic polymer microspheres

GENÇDOĞMUŞ, İrem<sup>1</sup>, ÖZEL, Şahin<sup>2</sup>, KARA, Ali<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomaterials, University of Bursa Uludag, Bursa Turkey

<sup>2</sup>Department of Chemistry, University of Bursa Uludag, Bursa Turkey

[501836004@ogr.uludag.edu.tr](mailto:501836004@ogr.uludag.edu.tr)

### Abstract

The aim of this study is to synthesize polymorphic spheres with high adsorption capacity in magnetic form. Azo dyes are an important part of the pollution in the wastewater released from the textile industry. Color removal is very successful in textile wastewater by adsorption process. Recently, its widespread use is due to its high efficiency and relatively simple equipment. The porous microspheres with magnetic properties between the successful adsorbents perform invariably in the color removal of textile wastewater. For this purpose, when the composite materials are synthesized, it is intended to remove the dyestuff from the aqueous medium by adsorption process. Conventional treatment methods are insufficient in removing dyes from waste water or carry dyes to a second phase and cause further pollution.

In order to determine the pH value of adsorption, other parameters were kept constant. In the study of pH 2-12 maximum adsorption was observed at pH 3.

**Keywords:** Acid Violet 7, Adsorption, Magnetic polymer.

### INTRODUCTION

Paints play an important role among water pollutants. (CHUNG, K.T. ve ark. 1993) . A wide variety of paints are available on the market. (Van der Zee FP. 2002) . Dyestuffs are generally water-soluble, but some They become soluble during the process and then become insoluble. All color organic compounds include the unsaturated chromophore group which forms the color. These groups carrying compounds are called chromogen. For a chromogen to be a dye amino [-NH<sub>2</sub>], which is called oxochrome other than chromophore, [NHR, -NR<sub>2</sub>], hydroxyl [-OH], methoxyl [-OCH<sub>3</sub>], sulfonic [SO<sub>3</sub>H] and carboxyl [COOH] groups must also exist. These groups also dissolution and affinity to the fibers. Chromophore groups; nitro [R.NO<sub>2</sub>], nitroso [-N<sub>2</sub>O], azo [-N=N-], carbonyl [C=O], ethylenic double bond [-OC-], thiocarbonyl [-C=S] consists of double-bonded groups (Ölmez, 1999).

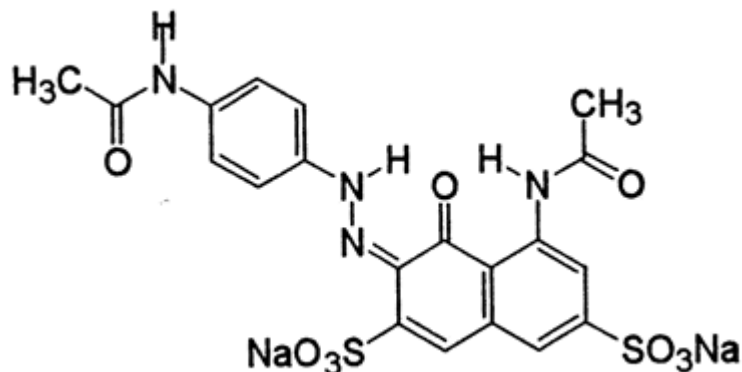
Dye-containing wastewater not only causes aesthetic problems, but also reduces water permeability, reduces water quality and is a threat to human health due to its toxic effects. (TALARPOSHTI, A.M. and ark. 2001).

Adsorption is cost-effective and yields at low concentrations. Chemical and physical adsorption are simple and effective methods. Thus, among other methods, adsorption is a preferred method of dye removal. The efficiency of adsorption is due to the quality of the adsorbent used. It is therefore important to design a good adsorbent. Adsorbents with affinity for the structure of dyes can achieve high efficiency adsorption when synthesized. (Farida Kaouah and ark. 2015).



## EXPERIMENTAL

### Chemical Structure



### Acid Violet 7 ;

**Molecular Formula:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>

**Molecular Weight:** 566.47

### Method

Magnetic polymer microspheres were obtained by suspension polymerization. In the synthesis of cross-linked, porous microspheres, this method involves a dispersion phase and an organic phase. Dispersion phase; It was formed by dissolving 0.2 g of PVA stabilizer in 50 ml of purified water in a stirrer heater. The organic phase; 0.1 g of initiator Benzoyl peroxide was prepared by dissolving in 10 mL of pore toluene for 5 minutes with stirring, adding 5.0 mL of crosslinker and monomer and stirring until a homogeneous phase was obtained. In a polymerization reactor made of closed cylindrical pyrex glass (Electromantle Jacketed Heater, England) at a constant temperature of 65°C, the system was mixed by magnetic stirrer and the dispersion phase, 1.0 g magnetite, organic phase were mixed respectively.

The polymerization was continued at a stirring speed of 600 rpm for 4 hours at 65°C and 2 hours at 75°C. After the indicated time, the dispersion phase was decanted. The resulting polymer microspheres were allowed to stand for one day in a mixture of water and ethyl alcohol. The liquid mixture was decanted. The polymer microspheres were washed with water and ethyl alcohol to remove unreacted monomer or solvent. After washing, the polymer microspheres were filtered off and dried in a vacuum oven at 70 ° C for 48 hours.

## EXPERIMENTAL RESULTS / DISCUSSION

Since the cross-linked polymer microspheres synthesized by suspension polymerization technique have a large surface area, they give successful results in adsorption process. Optimum parameters were determined for experimental studies and maximum adsorption conditions were determined. Reusability and swelling tests of polymer microspheres will be examined in future studies.

The maximum amount of adsorption was obtained at pH 3 between pH 2-10. The initial concentration was 50 ppm and the adsorption amount was 48.35 mg / g at pH 3.

## Tables and Figures

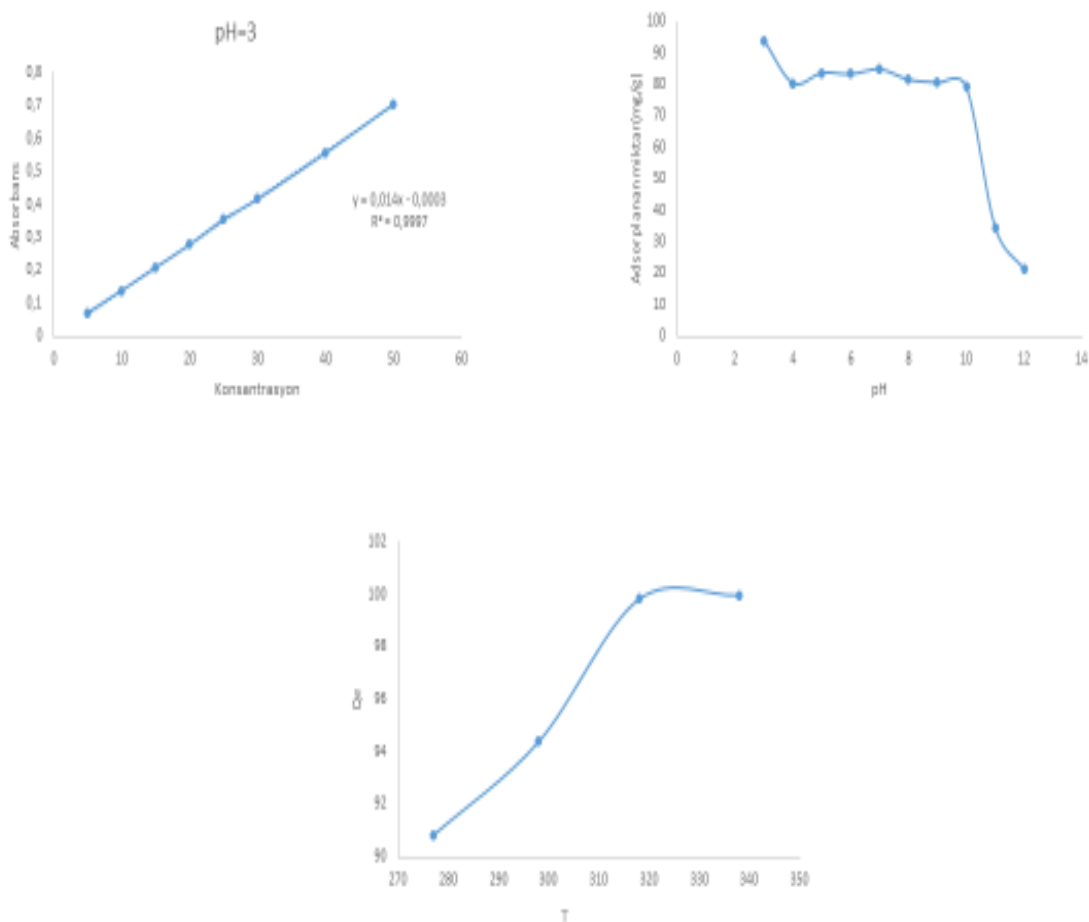


Figure 1. Parameters affecting adsorption

## RESULT

Dye removal and decolorization from waste water with high photocatalytic, magnetic form polymer composites with high surface area has been realized with high efficiency. Polymer adsorbents are of great importance for specific separation as they are easily modified with the desired functional groups. In addition to adsorption by photocatalyst doping to cross-linked, porous composite materials, this process is performed more quickly and easily with photocatalytic effect.

## REFERENCES

A study of the photocatalytic degradation of the textile dye CI Basic Yellow 28 in water using a P160 TiO<sub>2</sub>-based catalyst J. Serb. Chem. Soc. 77 (12) 1747–1757 (2012)

Adsorption of Basic Yellow 28 onto Chemically-Modified Activated Carbon: Characterization and Adsorption Mechanisms Catia R. L. Aguiar,<sup>1\*</sup> Eliton Fontana,<sup>1</sup> José A. B. Valle,<sup>1</sup> Antônio A. U. Souza,<sup>1</sup> Ayres F. Morgado<sup>2</sup> and Selene M. A. G. U. Souza<sup>2</sup> 1. Federal University of Santa Catarina, Textile Engineering Department, Laboratory of Mass Transfer, 89065-300,

Blumenau, SC, Brazil 2. Federal University of Santa Catarina, Chemical Engineering Department, Laboratory of Mass Transfer, P.O. Box 476, 88040-900, Florianopolis, SC, Brazil

CHUNG, K.T. and STEVENS, S.E.J. 1993. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 54: 435–441.

Equilibrium and kinetic study on the adsorption of basic dye (BY28) onto raw Ca-bentonite Kalpaklı Y, Toygun Ş , Köneçoğlu G & Akgün M. *Desalination and Water Treatment*, 52:37-39, 7389-7399

Ölmez T., 1999. *Tekstil Endüstrisinde Reaktif Boya Banyolarında Ozon ile Renk Giderimi*, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Removal of dyes by an integrated process coupling adsorption and photocatalysis in batch mode Salim Boumaza • Farida Kaouah • Said Omeiri • Mohamed Trari • Zoubida Res Chem Intermed (2015) 41:2353– 2375 DOI 10.1007/s11164-013-1351-5

Regeneration Research of Porous Magnetic Microspheres during Treatment of Wastewater Containing Cationic Dyes Qingquan Liu , LiWang , Anguo Xiao , Haojie Yu & Mårten Ericson *Separation Science and Technology*, 45:16, 2345-2349

TALARPOSHTI, A.M., DONNELLY, T. and ANDERSON, G.K. 2001. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Research*, 35 (2): 425–432.

Van der Zee FP. *Anaerobic azo dye reduction*. Doctoral thesis. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University; 2002. p. 142.

## Yarı kurak alanlarda yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Mehmet KÜÇÜK<sup>1\*</sup>, Esin ERDOĞAN YÜKSEL<sup>2</sup>, Doğukan YAZICI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Artvin, Türkiye

<sup>2</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>3</sup>Artvin Çoruh Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Artvin, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:mkck61@artvin.edu.tr

### Özet

Bu çalışma Artvin ili Ardanuç ilçesi sınırlarında yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Bu amaçla 2013 yılında ağaçlandırma yapılan yalancı akasya ve sedir ağaçlandırma alanları ile bitişiklerindeki ağaçlandırma yapılmayan (kontrol) alanlardan toprak örnekleri alınmıştır. Toprak örnekleri 0-15 cm derinlik kademesinden alınmıştır. Alınan toprak örneklerinde, toprak tekstürü, pH, Ec, kireç, organik madde, azot, C/N oranı, dispersiyon oranı, iskelet içeriği, hacim ağırlığı ve agregat stabilitesi gibi analizler yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen bulguları istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla “SPSS 19.0” istatistik programında varyans analizi yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda akasya ve sedir dikim sahaları ile kontrol alanları arasında, toz değeri haricinde diğer tüm toprak özelliklerinde farklılık önemli düzeyde çıkmıştır. Analiz sonucunda topraktaki kil, toz, kireç, organik madde, toplam azot, C/N oranı ve agregat stabilitesi gibi özellikler artarken; kum, pH, kireç, dispersiyon oranı, iskelet içeriği, hacim ağırlığı gibi özelliklerde azalma görülmüştür. Ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte toprak özelliklerinin iyileştiği görülmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, yarı kurak bölgelerde ağaçlandırılması mümkün alan yerlerde ağaçlandırılma çalışmalarının geciktirilmeden yapılması gerektiği, aksi takdirde erozyon ile birlikte çevresel tahribatın daha fazla olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Yarı kurak alan, ağaçlandırma, erozyon, Ardanuç.

### Determination of effects of afforestation on soil properties in semi-arid areas

#### Abstract

This study occurred to reveal the effects of afforestation on soil properties with in boundaries of Ardanuç district in Artvin city. For this purpose, soil samples were taken from cedar and black locust sites afforested in 2013 and adjacent control sites non-forested. Soil samples were taken from 0-15 cm soil depth level. Soil texture, soil pH, Ec, lime, organic matter, nitrogen, C/N rate, dispersion rate, skeleton content, bulk density, and aggregate stability analyses were done on soil samples. Variance analyze was done by SPSS 19.0 statistic program on results of soil analyses. As the result of variance analyze, significant differences were found out between control sites and cedar and locust planting sites for all soil analyses except silt content values. As a result of analyses, clay, silt, lime, organic matter, total nitrogen, C/N rate and aggregate stability in soil increased while sand, pH, lime, dispersion rate, skeleton content, bulk density decreased. It has been seen that soil properties got better together with afforestation studies. According to results of this study, we considered that afforestation studies should be done without retarding in potential sites of semi-arid areas, otherwise environmental disruption will be more with erosion effect.

**Keywords:** Semi-arid, afforestation, erosion, Ardanuc.

### GİRİŞ

Dünyada meydana gelen sanayi devrimi ardından takip eden teknolojik gelişmeler, nüfustaki düzensiz artış, düzensiz artışla birlikte oluşan aşırı tüketim, yeryüzü kaynaklarında azalmalara sebep olmuştur. Canlılığın devam etmesi için gerekli olan başlıca maddeler hava, su ve topraktır. Canlıların varoluşundaki ana yapıyı oluştururlar. Bu sebepten dolayı hayatın sürdürülebilir şekilde devam edebilmesi için bu kaynakların temiz kullanılması ve gelecek nesillere miras olarak bırakılması gerekmektedir (Babür, 2012).

Toprak oluşumu, katı haldeki ana kayanın fiziksel ve kimyasal olarak ayrışması sonucunda ana materyale dönüşen yapının topraklaşması sonucunda oluşur (Kantarci, 2000). 5 cm kalınlığındaki verimli bir toprak katmanının

oluşması için yaklaşık olarak 1000-2000 yıl gibi bir zaman gerekli olmaktadır. Bu açıklama ile toprağın insanlık için ne kadar önemli bir varlık olduğu görülmektedir (Kasap ve Irmak, 1998).

Doğal kuvvetlerin etkisiyle meydana gelen topraklar, yine bu etkiler altında aşınıp, uzaklaşıp kaybolmaktadırlar. Normal şartlarda, toprağın oluşması ile taşınması arasında doğal bir denge olması gerekmektedir. Fakat insanoğlu doğal yapıyı dolayısı ile toprakları kendi ihtiyaçları doğrultusunda kullanıp tahrip ettikleri ve toprakların taşınma hızına oluşum sürecinden daha fazla etki ettiklerinden durdurulması zaman alan hızlandırılmış erozyona sebebiyet vermektedir (Tok, 1998).

Ülkemizde uzun zamandan beri insanların yerleşim ihtiyacına ve diğer ihtiyaçlara göre araziyi kullandığı düşünülürse, genel olarak arazinin arazi kullanım sınıfına göre uygun şekilde işlendiği ifade edilebilir. Ancak zamanla yanlış kullanım veya diğer etkenler sebebiyle toprakların tahrip olmasının yanında, nüfusun hızla artması ile birlikte oluşan baskılarla, arazilerin kendi kullanım kabiliyeti dışına çıkarılması kaçınılmaz olmuştur. Bu durum, özellikle tarım arazimizin sınırları aşılarak orman ve açıklık alanları da tahrip ederek tarım alanları artırılmıştır. Açıklık alanların tarım arazisine dönüşmesi, açıklık alanlarda otlayan hayvanların orman arazilerinde otlamasına sebep olmuştur. Bu şekilde orman arazileri açma, otlatma ve diğer etkenlerin etkisinde ve uygulanan usulsüz kesimler sonucunda kendi yeteneği dışında kullanılması durumunu ortaya çıkmıştır (Kantarci, 1983).

Erozyon sahaları genellikle kurak ve yarı kurak olan yağışın az olduğu bölgelerde bulunur. Erozyon oluşumu sonucunda humusça ve organik madde bakımından zengin olan toprağın üst kısmı taşındığından geriye kalan toprak organik maddece fakir ve verimsizdir. Aynı zamanda üst toprağın taşındığı bu alanlarda toprağın taşınmasını engelleyici bitki örtüsü ortadan kalkarak ana kaya ortaya çıkmaktadır. Bitki örtüsü tahrip edilmiş bu alanlarda erozyonla birlikte yüzeysel akış daha fazla ve hızlı gerçekleşmektedir. Aynı zamanda topraktaki suyun buharlaşması da, üzerinde bitki örtüsü olmadığından dolayı hızlı olmaktadır. Bu tür alanlarda yapılacak erozyon kontrol ve ağaçlandırma çalışmalarında verimli bir ağaçlandırma ve bunun sonucunda başarının sağlanabilmesi için birtakım mekanik ve biyolojik önlemler alınması gerekmektedir. Özellikle eğimli arazilerde alınabilecek mekanik önlemlerin en başta geleni teraslama olurken, biyolojik önlemlerden en önemlisi toprağı kökleri ile tutabilecek otsu bitkiler ve odunsu bitkilerle bitkilendirmek olacaktır (Balcı 1996).

Yüzeysel akışın engellenmesi ve yağışların toprağı direkt ulaşmasını sağlamada uygulanan başlıca yöntemlerden biri olan teraslama ile eğimin kırılarak yamaç uzunluğunun tekdüzelikten çıkarılması planlanmaktadır. Diğer taraftan uygun yamaç teraslama biçimini belirlemede esas alınacak önemli faktörler iklim ve toprak şartlarıdır.

Teras tipinin belirlenmesinin yanında, önemli bir başka faktörde alana uyumlu çalı ve ağaç türlerinin belirlenmesidir. Ormancılık faaliyetleri uzun soluklu olduğu için uygun tür seçimi büyük önem arz etmektedir. Tür seçiminde yapılacak bir hata hem maddi kayba, hem de iş gücü ve zaman kaybına neden olacaktır. Ağaçlandırma yapılacak alanda tür seçimi yapılırken yöredeki türlerden elde edilen fidanların kullanılması gerekmektedir. Bu fidanlar yeterli gelmezse yöreye en yakın iklim ve coğrafi koşulların uygun olduğu yerlerde yetişen diğer ağaç türleri de düşünülebilir (Dutkuner ve Fakir 1999).

Diğer önemli bir husus ise ağaçlandırma yapılırken tek türden kaçınılmalı, karışıma önem verilmelidir. Karışık türler ile yapılan ağaçlandırmalar neticesinde yangın, böcek ve mantar gibi doğal afetlere karşı da önlem alınabilir.

Bu çalışmanın amacı, Ardanuç ilçesinde yapılan akasya ve sedir ağaçlandırma çalışmalarının toprak özellikleri üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

## **MATERYAL VE METOT**

Araştırma alanı Artvin ili Ardanuç ilçesi sınırları içerisinde yer almaktadır. Çalışma alanı ortalama yüksekliği 580 m'dir ve çalışma 253938-254192 m ile 4557133-4557301 m UTM koordinatları arasında kalan alanda gerçekleştirilmiştir. araştırma alanında, iklim elemanlarının değerlendirilmesini ortaya koyacak uygun meteoroloji istasyonu olmadığından en yakın meteoroloji istasyonu (Ardanuç Meteoroloji istasyonu (Anonim, 2018) verileri kullanılarak yükselti ile değişimleri göz önüne alınmıştır.

Ortalama sıcaklıklar ve yağışlar araştırma alanının ortalama yükseltisine (580 m), enterpole edilmiştir. Bu amaçla yağışta Shreiber formülü kullanılmış; sıcaklıkta ise her 100 m'de 0,5 °C değişim olasılığı üzerinden hesaplama yapılmıştır. Hesaplanan değerler Tablo 1'de verilmiştir (Çepel, 1988). Yapılan enterpolasyona göre yıllık ortalama

sıcaklık 12,6 °C ve yıllık ortalama yağış ise 536,2 mm olarak hesaplanmıştır. Walter-iklim grafiğine göre de haziran ile ekim ayları arasında kuraklık olduğu görülmüştür.

Tablo 19. Çalışma alanı yükseltisine uyarlanmış iklim verileri (580 m)

Meteorolojik Veriler	Aylar												Yıllık
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ortalama Sıcaklık (°C)	0,9	2,9	7,2	12,5	17	20,1	23,6	23,6	19,6	13,8	7,4	2,4	12,6
Ortalama Yağış (mm)	36,5	38,6	45,2	49,8	49,9	55,3	37,4	31,3	34,6	51,1	51,7	54,8	536,2

Bölge arazisi genel olarak üst kratese volkanik fasiyesten; ana kayası ise kum ve kil şistlerinden oluşmaktadır (Anonim 2016)

Toprak örnekleri deneme alanı olarak seçilen 3 farklı bölgeden (5 yıllık akasya dikim, 5 yıllık sedir dikim ve kontrol (dikim yapılmayan)) alınmıştır. Her bir bölgeden rastgele 10 örnekleme noktası seçilmiş olup, her bir örnekleme noktasından 3 tekrarlı olacak şekilde 0-15 cm derinlik kademesinden hem bozulmuş hem de bozulmamış (silindir) toprak örneği alınmıştır. Toplamda 90 toprak örneği alınmıştır. Kurutulan bozulmuş örnekler 2 mm'lik elekten geçirilmiş ve analize hazır hale getirilmiştir.

Alınan toprak örnekleri üzerinde tekstür, pH, Ec, toplam kireç, organik madde, toplam azot, karbon/azot oranı (C/N), dispersiyon oranı, hacim ağırlığı, iskelet içeriği ve agregat stabilitesi gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal analizler yapılmıştır.

Tekstür Bouyoucos'un hidrometre yöntemine göre; toprak türü sınıflarının ayırımı uluslararası tekstür üçgenine (E.C. Tommerup) göre belirlenmiştir (Gülçur, 1974). Toprak örneklerinin reaksiyonları (pH) ve elektriksel iletkenlikleri (Ec), Hach-Lange HQ40D cihazında cam elektrot yöntemiyle belirlenmiştir. Aktüel asitlik ve Ec için 1/2,5 oranında saf su/toprak karışımı kullanılmıştır (Gülçur, 1974). Kireç analizi Scheibler kalsimetresi yöntemine göre yapılmıştır (Kaçar, 2009). Organik madde analizi, Walkley - Black ıslak yakma yöntemine göre tespit edilmiştir (Gülçur 1974, Kacar, 2009). Toplam azot tayini için Kjeldahl yaş yakma yöntemi (Steubing, 1965) kullanılmıştır. Karbon azot oranı, organik madden belirlenen organik karbonun toplam azota bölünmesi ile elde edilmiştir. Dispersiyon oranı, Middleton'un dispersiyon oranı yöntemine göre hesaplanmıştır (Gülçur, 1974). Silindir ile alınan toprak örnekleri 105 °C de kurutulduktan sonra ortamdaki nem uzaklaştırılmıştır. Birim hacim içindeki toprak tartılarak, silindir hacmine bölünmek suretiyle hacim ağırlığı tespit edilmiştir (Gülçur, 1974). Hacim örneklemede alınan toprak örneğinin fırın kurusu ağırlığı belirlendikten sonra havanda dövülür ve 2 mm'lik elekten geçirilir. 2mm'lik elek üstünde kalan kısım iskelet içeriği olarak ayrılır. Ayrılan bu kısım tartıldıktan sonra toplam ağırlığa oranlanarak birim hacimdeki iskelet içeriği hesaplanmış olur (Gülçur, 1974). Agregat stabilitesi hava kurusu hale gelen topraklardan 2-4 g alınarak Yoder tipi ıslak eleme cihazında belirlenmiştir (Kemper ve Rosenau, 1986).

Elde edilen veriler sonucunda 5 yıllık akasya ve sedir dikim sahaları ile kontrol alanları kıyaslanmıştır. Kıyaslamalar tek yönlü varyans analizi yöntemine göre yapılmıştır. Varyans analizi sonucunda çıkan farklılıklar tukey testine göre gruplandırılmıştır. İstatistiksel analizlerin yapılmasında "SPSS 19.0" paket programı kullanılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Tablo 1'deki verilere göre toprakların kum içerikleri kontrol sahasında en yüksek çıkarken, akasya alanında en düşük değer tespit edilmiştir. Yine kil içeriği değerlendirildiğinde ise en yüksek kil içeriği sedir ağaçlandırma alanında tespit edilirken en düşük kil içeriği ise kontrol sahasında tespit edilmiştir. Ortalama toz içerikleri kıyaslandığında ise en yüksek değer akasya dikim sahasında en düşük değer ise kontrol sahasında olduğu bulunmuştur. Kontrol alanları ile dikim sahaları arasında kum ve kil bakımından olan değerlerin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,005$ ). Bu farklılıklar incelendiğinde kum ve kil bakımından

kontrol noktası ile akasya ve sedir alanları birbirinden farklı çıkarken sedir ve akasya birbiri ile benzer grup oluşturmuştur. Toz değerleri bakımından farklı gruplar oluşmamıştır.

Akasya ve sedir dikim alanlarında dikim ile birlikte kum miktarında bir azalma söz konusu olmuştur. Kontrol noktası ile 5 yıllık sedir ve akasya alanını kıyasladığımızda kum değeri bakımından % 8 lik bir azalma yönünde fark görülmüştür. Genel itibarı ile beklenen ağaçlandırma ile birlikte kum miktarının azalması yönünde eğilim olduğudur. Bu genel bilgiyi elde ettiğimiz sonuçlar doğrulamaktadır. Ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte ağaçlandırılan alanda oluşan tepe yapısı ve kök gelişimi ile birlikte ince materyalin taşınması engellenmektedir. Buda birim hacimdeki topraktaki kil taşınımını engellemekte, organik madde birikmesi ile birlikte kolloidal yapıyı artırıcı rol oynamaktadır.

Kil değerleri incelendiğinde ise ağaçlandırma ile birlikte kil değerlerinde % 8-9 değişimle bir artış söz konusu olmuştur. Ağaçlandırma ile birlikte alana yeşil örtünün gelmesi bitki köklerinin gelmesi ile hem rüzgârın hem de yağmurun erozyon ve taşıma etkisi azaltılmıştır. Bu sayede topraktaki kil miktarında bir artış gözlenmiştir.

Tablo 1. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama kum, kil ve toz değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Kum (%)	45,9a	47,1a	55,9b	0,000
Kil (%)	23,1b	24,0b	15,8a	0,000
Toz( %)	30,9a	28,9a	28,3a	0,098

Tablo 2'deki verilere göre pH bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer kontrol alanlarında çıkarken en düşük değer ise sedir alanlarında çıkmıştır. Ec bakımından değerler incelendiğinde en yüksek değer sedir ağaçlandırma alanında çıkarken en düşük değer ise akasya ağaçlandırma alanında çıkmıştır. Alanlar arasındaki pH ve Ec bakımından farklılık istatistik bakımdan anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık toprak pH'sında sedir ile kontrol ve akasya arasında belirgin çıkarken, Ec bakımından ise sedir ve akasya arasında önemli düzeyde çıkmıştır. Toprak pH değerleri incelendiğinde ağaçlandırma ile birlikte toprak pH değerinde bir azalma ortaya çıkmıştır. Toprak asitliliğinin artmasının sebebi ibrelerin ayrışması sonucu açığa çıkan organik asitler, kök solunumu gibi özellikler olabilir. Toprak asitliliğinin değişimine birçok faktör etki etmektedir. Bu faktörler hem toprağın kimyasal, fiziksel ve biyolojik özellikleri hem de toprağın oluşum ve gelişimini etkileyen yeryüzü şekli, iklim, ana kaya ve canlılar gibi faktörlerdir. Topraktaki kil içeriğinin artışı da pH değerini düşürebilir. Topraktaki kil içeriği ile birlikte suyun ve organik maddenin tutulmasının artacağı bu durumda pH değerinin azalmasına bir neden olarak söylenebilir. pH bakımından araştırma alanı toprakları Hafif alkali (7,5-8,5) grubunda yer almaktadırlar (Kantarci 2000).

Elektriksel iletkenlik değerlerini değerlendirdiğimizde sedir dikim sahalarında bir artış söz konusu olmuştur. Bitki örtüsünün fazla olması dökülen ölü örtünün ayrışması ve ayrışma ürünleri sonucu açığa çıkan katyonlar Ec değerini artırmıştır. Yapılan birçok çalışmada ağaçlandırma çalışmaları ile Ec değerinin arttığı görülmüştür.

Tablo 20. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama pH ve Ec değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
pH	7,93b	7,83a	7,95b	0,000
Ec (ms/cm)	129a	147b	133ab	0,025

Tablo 3'deki verilere göre kireç bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer akasya alanlarında çıkarken en düşük değer ise sedir alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasındaki kireç bakımından farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık sedir alanları ile kontrol ve akasya arasında belirgin düzeyde çıkmıştır. Genelde ağaçlandırma ile birlikte kireç içeriğinin düşmesi beklenmektedir. Fakat çalışma alanındaki anakayanın kireçli olmasından dolayı bitki örtüsünün kireç üzerindeki etkisi çok belirgin olmamıştır. Ağaçlandırılma ile birlikte kireç içeriğinin düşmesinin sebebi ise alana gelen bitki örtüsünden dökülen

organik materyalin ayrışması sonucunda salınan organik asitlerin yine kök ve mikro organizma solunumları sonucunda CO<sub>2</sub> açığa çıkması ve kireçle oksitlenmesi olarak düşünülmektedir. Araştırmacılar, ağaçlandırma ile birlikte genel olarak toprak kireç içeriğinin düştüğünü bulmuşlardır (Çavdar 2011, Dehşet 2011, Turan 2015). Kireç içeriğinin yüksek çıkması ile birlikte bitki besin maddesi alımında güçlükler ortaya çıkacaktır. Kirecin düşmesi ile bitki kökleri tarafından besin maddesi alımı da kolaylaşacaktır. Bu sayede ağaçlandırmanın başarısı da artacaktır. Çalışma bölgesinin topraklarının kireç sınıflamasına göre fazla kireçli sınıfına (%15-25) girdiği görülmektedir.

Tablo 21. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama toplam kireç değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Kireç (%)	24,9b	23,1a	24,3b	0,002

Tablo 4’deki verilere göre organik madde bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer akasya alanlarında çıkarken en düşük değer ise sedir alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasında organik madde miktarı bakımından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır (P<0,05). Bu farklılık akasya alanları ile kontrol ve sedir alanları arasında belirgin düzeyde çıkmıştır. Akasya ağaçlandırmalarındaki organik madde miktarının artışının sebebi yaprakların dökümü ile organik madde artışı ve aynı zamanda köklerindeki azot bağlayıcı bakterilerin oluşturduğu yumruların ayrışması olabilir.

Yapılan birçok araştırmada ağaçlandırma faaliyetlerinin toprak organik maddesini artırıcı etkisi olduğu ifade edilmiştir (Tüfekçioğlu ve ark. 2002, Dehşet 2011, Küçük 2013, Turan 2015). Araştırma alanındaki organik madde değerleri, yapılan sınıflandırmaya göre akasya ve sedir ağaçlandırmaları ve kontrol alanlarında az sınıfında (% 1-2) yer almaktadır.

Tablo 22. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama organik madde değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Organik madde (%)	1,50b	1,00a	1,08a	0,000

Tablo 5’deki verilere göre toplam azot yüzdesi bakımından akasya sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer akasya ve sedir alanlarında çıkarken en düşük değer ise kontrol alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasındaki toplam azot yüzdesi bakımından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır (P<0,05). Bu farklılık kontrol alanları ile akasya ve sedir alanları arasında belirgin düzeydedir. Akasya ve sedir ağaçlandırma sahalarında, akasya ağaçlandırma alanlarında azot içeriğinin daha yüksek çıkması bekleniyordu. Fakat bölgenin yarı kurak iklimde oluşu için mikro organizma faaliyetlerinin ve azot bağlayıcı bakterilerin faaliyeti daha yavaş gerçekleşmektedir. Uygun nem ve sıcaklık koşullarında daha aktif faaliyet gösterirler. Yalancı akasyanın ağaç köklerinde yaşayan yumru (Rhizobium) bakterileri ve mantarlar toprak havasındaki serbest azotu bağlamaktadırlar. Azot bağlayan bakterilere sahip olan ağaçlara kıvılcık, iğde, akasyalar ( Kıbrıs Akasyası dâhil), yalancı akasya gibi ağaçlar eklenebilir (Kantarci 2000). Dehşet 2011 yılında yaptığı çalışmada ağaçlandırılma yapan alanlardaki azot miktarının yapılmayan alanlara göre daha yüksek çıktığını ifade etmişlerdir. Yine benzer çalışmalarda Çavdar (2011) ve Turan (2015) tarafından, ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte azot miktarının arttığı ifade edilmiştir. Toprak azot değeri sınıflamasına göre çalışma alanı toprakları genel itibari ile azotça yeterli (% 0,09-0,17) sınıfına girmektedir.

Tablo 23. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama toplam azot değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Toplam Azot (%)	0,11b	0,11b	0,10a	0,000

Tablo 6’deki verilere göre C/N oranı bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer akasya alanında çıkarken en düşük değer ise sedir alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasında C/N oranı bakımından ortaya



çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık tüm alanlar arasında belirgin düzeydedir. Ağaçlandırma ile birlikte C/N oranının yüksek çıkmasının sebebinin ağaçlandırma ile birlikte alandaki ölü örtünün ve dolayısı ile organik materyalin ayrışması sonucunda açığa çıkan organik maddenin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 24. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama C/N değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
C/N	8,31c	5,39a	6,84b	0,000

Tablo 7’deki verilere göre dispersiyon oranı bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer kontrol alanında çıkarken en düşük değer ise akasya alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasında dispersiyon oranı bakımından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık akasya ve sedir alanında belirgin düzeyde çıkmıştır. Bu duruma sebep olarak organik madde ve kil içeriğini gösterebiliriz. Organik maddenin ve kilin yüksek olması dispersiyon oranını düşürmektedir. Ağaçlandırma yapılarak dispersiyon oranının düştüğü görülmüştür. Yılmaz (2007), yapmış olduğu çalışmada açıklık alandaki dispersiyon oranını orman alanlarına göre daha yüksek bulmuştur.

Tablo 25. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama dispersiyon oranı değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Dispersiyon Oranı (DO)	27a	32ab	37b	0,000

Tablo 8’deki verilere göre iskelet içeriği bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer kontrol alanında çıkarken en düşük değer ise sedir alanlarında çıkmıştır. Alanlar arasında iskelet içeriği açısından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık akasya ve sedir alanında belirgin düzeyde çıkmıştır. İskelet içeriği bakımından yapılan sınıflamaya göre (Kantarıcı 2000) , yıllık akasya ve sedir dikim sahalarının orta taşlı iskelet sınıfına (% 25-50) girdiği belirlenmiştir. İskelet içeriğinin yüksek çıkmasının sebebi olarak organik madde ve kil miktarının düşük olması, kum içeriği ve hacim ağırlığının fazla olması söylenebilir. Çalışmadan elde edilen bulgular da bu fikri destekler niteliktedir. Yapılan bazı çalışmalarda ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte toprakların iskelet içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir (Yüksek ve ark., 2010).

Tablo 26. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama iskelet içeriği değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
İskelet İçeriği (%)	45,7b	37,6a	51,4b	0,000

Tablo 9’deki verilere göre hacim ağırlığı değerleri bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer kontrol alanında belirlenirken en düşük değer ise sedir alanlarında bulunmuştur. Alanlar arasında hacim ağırlığı değerleri açısından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,05$ ). Bu farklılık kontrol alanında belirgin düzeydedir. Ağaçlandırma ile birlikte hacim ağırlığında bir düşüş olduğu elde edilen sonuçlara ortaya çıkmıştır. Bu durumun nedeni olarak ağaçlandırma ile birlikte kil ve organik madde içeriğinin artması olarak gösterilebilir. Diğer taraftan kum ve iskelet içeriğinin yüksek olması da hacim ağırlığını artırıcı etki yapmaktadır. Ağaçlandırma ile birlikte hacim ağırlığının azaldığını gösteren birçok çalışma da mevcuttur (Tüfekçioğlu ve ark. 2002, Yüksek ve ark. 2010, Dehşet 2011, Turan 2015).

Tablo 27. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama hacim ağırlığı değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Hacim Ağırlığı (g/cm <sup>3</sup> )	1,49a	1,47a	1,62b	0,021

Tablo 10’deki verilere göre agregat stabilitesi değerleri bakımından akasya, sedir ve kontrol alanları arasında en yüksek değer akasya alanında belirlenirken en düşük değer ise kontrol alanlarında bulunmuştur. Alanlar arasında iskelet içeriği açısından ortaya çıkan farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir ( $P<0,05$ ). Bu farklılık kontrol ve akasya alanları arasında belirgin düzeyde çıkmıştır. En düşük değer ise kontrol noktasında tespit edilmiştir.

Agregat stabilitesini etkileyen başlıca toprak özellikleri kum, kil, organik madde gibi özelliklerdir. Kil ve organik maddenin agregat stabilitesini artırdığı kum ve iskelet içeriğinin ise azalttığı bilinmektedir. Yapılan çalışma sonucunda ağaçlandırma ile kilin arttığı, hacim ağırlığının ve kum miktarının azaldığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgular dab u durumu destekler nitelikte olmuştur.

Yapılan bazı çalışmalarda toprağa organik materyal takviye yapılması sayesinde agregatlaşmanın arttığı (Özbek ve ark., 1993), aynı şekilde kil eklemesi ile yine agregatlaşmanın arttığı belirtilmiştir ( Páre ve ark., 1999).

Tablo 28. Akasya, sedir ve kontrol alanlarındaki ortalama agregat stabilitesi değerleri

Toprak Özelliği	Akasya	Sedir	Kontrol	Önem Düzeyi
Agregat Stabilitesi (%)	91,4b	88,7ab	87,8a	0,042

## SONUÇ

- Genel olarak ağaçlandırma ile toprağın kum miktarı azalırken, kil ve toz değerlerinde artış söz konusu olmuştur. Bu artış ve azalışlar zaman geçtikçe daha belirgin şekilde ortaya çıkacaktır.
- Ağaçlandırma toprak asitliliğini artırıcı etki yapmıştır. Ölü örtü içeriği ve zaman faktörü bu değişimde etkili olmuştur. Yine Ec değerleri genel itibari ile artış göstermiştir.
- Toplam kireç değerleri sedir sahasında azalırken, akasya alanlarında artış söz konusu olmuştur.
- Organik madde içeriği akasya sahasında artış gösterirken; sedir alanlarında değişim önemli düzeyde olmamıştır.
- Toplam azot verileri ağaçlandırma ile birlikte artış gösterirken; alanın yarı kurak bölgede olması azotun yeterli düzeyde artmasını engelleyici rol oynamıştır.
- Karbon azot oranı ağaçlandırmayla birlikte genel itibari ile artmıştır.
- Ağaçlandırma çalışmaları dispersiyon oranı değerlerini genel itibari ile azaltmıştır. Ağaçlandırmanın erozyon oluşumunu engellemesi açısından olumlu etkiler yaptığı görülmektedir. Fakat dispersiyon oranının 15 ten büyük olması bölgenin halen erozyon riski altında olduğunu göstermektedir.
- İskelet yüzdesi ağaçlandırma çalışmaları ile azalmıştır. Ağaçlandırmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan organik madde ve kil tutulması iskelet yüzdesini azaltıcı etki yapmıştır.
- Ağaçlandırma çalışmaları hacim ağırlığını azaltmıştır. Fakat bu azalma istenilen düzeyde değildir. Alanın yarı kurak bölge olması organik madde ayrışmasını ve anakayanın ayrışmasını güçlendirmekte dolayısı ile ince materyalin oluşumu ve tutulması zorlaşmaktadır.
- Agregat stabilitesi genel itibari ile ağaçlandırma ile artmıştır. Fakat bu artışlar belirgin şekilde olmamıştır. Kil içeriği ve organik madde miktarındaki değişimler bu artış üzerinde önemli düzeyde etki etmektedir.

Araştırma sonucunda elde edilen verilere göre özellikle yarı kurak bölge ağaçlandırmalarında toprak özellikleri açısından elde edilen olumlu sonuçlar, bu tür bölgelerde ivedi şekilde ağaçlandırma çalışmalarının yapılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Özellikle yarı kurak bölgelerde oluşan anlık şiddetli yağışlarla erozyon riskinin yüksek olduğu düşünülünce ağaçlandırmanın önemi de daha net biçimde ortaya çıkacaktır. Ağaçlandırma ile birlikte toprakta iyileşmelerin olduğu görülmektedir.

Aynı zamanda ağaçlandırma çalışmaları ile toprakların erozyona maruz kalması önenebilecektir. Çünkü çıplak alanda toprak tanelerini tutabilecek herhangi bir yapı bulunmadığı için yağışlarla birlikte özellikle eğimin olduğu bölgelerde toprak taşınacaktır. Bunun sonucunda erozyon kaçınılmaz olacaktır.

Bu çalışmanın ana amaçlarından birinin de yarı kurak bölgelerde ağaçlandırma yapılarak erozyonu engellemek ve mevcut toprak yapısını korumak olduğu düşünülürse, bu tür ağaçlandırmaların yapılmasının gerekliliği elde edilen bulgular sonucunda daha net ortaya çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2016 Ardanuç, Karanlık Meşe İşletme Şefliği amenajman planı.
- Anonim, 2018. Ardanuç ilçesi meteoroloji verileri.
- Babür, E., 2012. Galyan-Atasu Barajı Havzasında Farklı Arazi Kullanım Şekilleri Altındaki Toprakların Bazı Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon
- Balcı, N., 1996. Toprak Koruması., İ. Ü. Orman Fakültesi Yayınları No: 439, İstanbul.
- Çepel, N., 1988. Orman Ekolojisi. İÜ Toprak İlimi ve Ekoloji Anabilim Dalı, İÜ Yayın No. 3518, O.F. Yayın No. 399, İstanbul, 536 s.
- Çavdar, G., 2011. Yarı Kurak Alanlarda Gerçekleştirilen Ağaçlandırma Çalışmalarının Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkilerinin İrdelenmesi: Polatlı (Sarıoba) Örneği Yüksek Lisans Tezi, A.Ç.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Artvin.
- Dehşet, F. 2011. Baraj ve Yol İnşası Nedeniyle Tahrip Edilen Alanlarda Yapılan Erozyon Kontrol Çalışmalarının Toprak Özelliklerinin İyileştirilmesi Üzerine Etkilerinin İrdelenmesi. Artvin Çoruh Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Artvin.
- Dutkuner, İ. ve Fakir, H., 1999. Erozyon Kontrolü ve Ağaçlandırma., Çev-Kor Ekoloji Dergisi Cilt:8 Sayı:32, Isparta.
- Gülçur, F., 1974. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Analiz Yöntemleri. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, O.F Yayın No:201, Kurtuluş Matbaası, İstanbul, s.225.
- Kacar, B., 2009. Toprak Analizleri. Nobel Yayın dağıtım. Genişletilmiş 2. Baskı. 467 Sayfa.
- Kantarıcı, M.D., 1983. Türkiye’de Arazi Yetenek Sınıfları ile Arazi Kullanımının Bölgesel Durumu, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, Yayın No 350, İstanbul.
- Kantarıcı M. D., 2000. Toprak İlimi. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Matbaası. Yayın No: 4261/462, İstanbul.
- Kasap, Y. ve Irmak, S., 1998. Türkiye’de ve Kahramanmaraş İl’inde Tarım Arazileri ve Erozyon Sorunları, Ekoloji 8(29), 6-10.
- Kemper, W.D. and Rosenau, R.C., 1986. Aggregate Stability and Size Distribution. Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods. 2nd Edition. Agronomy No: 9. 425-442, 1188 p, Madison, Wisconsin USA.
- Küçük, M., 2013. Farklı eğim ve bakı gruplarında bulunan meşe meşcerelerinde ve mera alanlarında azot mineralizasyonu ve toprak solunumunun belirlenmesi. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Steubing, L., 1965. Pflanzenökologisches Praktikum. Berlin-Hamburg, Parey.
- Özbek, H., Kaya Z., Gök, M. ve Kaptan, H., 1993. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi Kitabı, Yayın no: 73, Ders Kitapları Yayın no: A-16, ss: 77-119, Adana.
- Pare, T., Dinel, H., Moulin, A. P. and Townley-Smith, L. 1999. Organic Matter Quality and Structural Stability of a Black Chernozemic Soil Under Different Manure and Tillage Practices. Geoderma, pp: 311-326.
- Tok, M., 1998. Çorum-Karhın Çayı Havzası Topraklarının Bazı Fiziksel ve Hidrolojik Özellikleri ile Erozyon Eğilimleri Değerlerinin Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon
- Turan, A. 2015. Ağaçlandırma Çalışmalarının Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkilerinin irdelenmesi. SDÜ, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Tüfekçioğlu, A., Yüksek, T. and Kalay, H.Z., 2002. Gümüşhane İli Torul İlçesi Yalancı Akasya Ağaçlandırmalarının Biyokütle ve Bazı Toprak Özellikleri Yönünden İncelenmesi, Gümüşhane ve Yöresinin Kalkınması Sempozyumu, Gümüşhane.
- Yılmaz, F., 2007. Erfelek Barajı Yağış Havzasında (Sinop) Farklı Arazi Kullanım Şekilleri Altındaki Toprakların Bazı Hidro-Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bolu.
- Yüksek, T., Özalp, M., Yüksek F., Erdoğan, E., Dehşet, F., İnanlı, E., 2010. Erozyon Kontrol Sahalarında Kullanılan Yalancı Akasyanın (Robinia Pseudoacacia L.) Toprak Özelliklerine Etkisi (Artvin-Pamukçular Havzası Örneği), III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, II, 708-715s.

## Baraj çevresi yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

Mehmet KÜÇÜK<sup>1\*</sup>, Esin ERDOĞAN YÜKSEL<sup>2</sup>, Uğurhan EVBAŞI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Artvin, Türkiye

<sup>2</sup>Bursa Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>3</sup>Artvin Çoruh Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Artvin, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:mkck61@artvin.edu.tr

### Özet

Bu çalışma Artvin ili Borçka ilçesi sınırlarında Borçka Barajı çevresinde yapılan ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Bu amaçla 2011 yılında ağaçlandırma yapılan sarıçam, yalancı akasya ağaçlandırma alanları ile bitişiklerindeki orman ve ağaçlandırma yapılmayan (kontrol) alanlarından toprak örnekleri alınmıştır. Toprak örnekleri 0-10 ve 10-20 cm derinlik kademelerinden alınmıştır. Alınan toprak örneklerinde toprak tekstürü, pH, Ec (elektriksel iletkenlik), kireç, organik madde, azot, C/N oranı, dispersiyon oranı, iskelet içeriği, hacim ağırlığı ve agregat stabilitesi gibi toprak analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda elde edilen bulgular “SPSS 19,0” istatistik programında değerlendirilerek; varyans analizi yapılmıştır. Yapılan varyans analizi sonucunda akasya ve sarıçam dikim sahaları ile orman ve kontrol alanları arasında, her iki derinlik kademesinde yapılan tüm toprak analizleri için farklılık önemli düzeyde çıkmıştır. Baraj yapımı ile birlikte alanda toprak özellikleri bakımından ciddi tahribat olmakla birlikte ağaçlandırma faaliyetleri ile birlikte bu tahribatın kısmen iyileştirildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, özellikle baraj çevresi ağaçlandırma çalışmalarının geciktirilmeden yapılması gerektiği, aksi takdirde erozyon ile birlikte baraj ömrünün kısılacağı ve çevresel tahribatın daha fazla olacağı sonucu kaçınılmaz olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Baraj, ağaçlandırma, dispersiyon oranı, erozyon, Borçka.

### Determination the effects of afforestation around dam on soil properties

#### Abstract

Aim of this study was to find out the effects of afforestation around the Borçka Dam on soil properties with in boundaries of Ardanuç district in Artvin city. For that purpose, soil samples were taken from scotch pine and black locust sites afforested in 2011 and adjacent control sites non-forested and forest sites. Soil samples were taken from 0-10 cm and 10-20 cm soil depth levels. Soil texture, soil pH, Ec, lime, organic matter, nitrogen, C/N rate, dispersion rate, skeleton content, bulk density, and aggregate stability analyses were done on soil samples. Variance analyze was done by SPSS 19.0 statistic program on results of soil analyses. As the result of variance analyze, significant differences were found out between forest sites, control sites and pine and locust planting sites for all soil analyses of both soil depth levels. We found that although dam building led to critical disruptions on soil properties, afforestation partly recuperated this disruption. According to results of this study, afforestation studies around dams must be done without retarding, otherwise existence of dam will get shorter with erosion and more environmental disruption will become unavoidable.

**Keywords:** Dam, afforestation, dispersion rate, erosion.

### GİRİŞ

Enerji sorunu 2000’li yılların başında insanlık için önemli bir sorun haline gelmeye başlamıştır. Enerji sorunu, teknolojinin gelişmesi ile ortaya çıkan enerji harcaması sonucunda daha da artmıştır. Birçok ülkede yaşanan bu enerji sorununa ihtiyacı gidermek için ülkeler yeni bir takım projeler üretmek ve enerji elde etmek zorunda kalmıştır. Ülkemizdeki enerji kaynaklarının bir kısmı dış ülkelere karşılanırken bir kısmı ise doğal kaynaklarımızdan karşılanmaktadır. Ülkemizde dışarıdan alınan doğal gaz ile enerji üretiminin yanında kendi doğal kaynaklarımız olan kömür, su, rüzgâr ve son olarak da güneş enerjisinden yararlanarak enerji üretimi için projeler yapılmaktadır. Doğal kaynaklarımız içinde, suyun gücü ile enerji elde etmenin yeri çok önemlidir. Su gücü ile enerji üretimi için ülkemizde hidroelektrik santraller (HES) ve barajlar yapılmaktadır. Çalışma alanımızın

bulunduğu Artvin İli sınırları içerisinde, Çoruh Nehri ana kolu üzerinde 5 adet baraj projesi olup; mansaptan membaya doğru Muratlı, Borçka, Deriner, Artvin ve Yusufeli Barajı ile HES tesisleri yer almaktadır. Barajların yapımından sonra, su tutması ve yükselmesi ile birlikte baraj havzasındaki yerleşim yerleri ve yollar da su altına kalmıştır. Bu nedenle, baraj çalışmaları ile birlikte yeni yol yapım çalışmaları da yapılmıştır. Çoruh Nehri Vadisinde yeryüzü şekillerinin dağlık ve eğimli olmasından dolayı, baraj yapımı çalışmalarının doğaya vermiş olduğu zararın en önemli kısmını önceleri Çoruh Nehri ve yan kollarına paralel olarak yapılan ulaşım yollarının yüksek kotlara çıkarılması sırasında ortaya çıkan kazı malzemesinin şevlerden aşağıya gelişigüzel bir şekilde atılması oluşturmaktadır. Bu durum hem o şevlerdeki bitki örtüsüne zarar vermekte; hem de arazi tahribatı ve toprak erozyonu oluşmasına neden olmaktadır. Eğimle beraber yol genişliği ve dolgu hacmi arttıkça çevreye verilen zarar da büyümektedir. Uygun tekniklerin uygulanmadığı bu çalışmalara denetimsizlik, plansız çalışmalar ve duyarsızlık da eklenince vadide yürütülen baraj ve yol inşaatlarının doğal kaynaklar üzerindeki olumsuz etkileri daha da ciddi boyutlara ulaşmaktadır.

1990' lı yılların sonlarında başlayan baraj ve yeni yol inşaatları nedeni ile tahrip olan araziler üzerinde 2000'li yılların başından itibaren eski ismi ile "Artvin İl Çevre ve Orman Müdürlüğü" bünyesindeki "Ağaçlandırma ve Erozyon Kontrol Şube Müdürlüğü" tarafından erozyon kontrol ve ağaçlandırma çalışmaları başlatılmıştır. Ancak, yapılan bu çalışmaların zarar görmüş arazilerdeki toprağı iyileştirmede, toprak erozyonunu önlemede başarılı olup olmadığı konularında yapılan bilimsel çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada, Borçka Barajı havzasında 2009 yılında yapılan sarıçam ve yalancı akasya ağaçlandırma çalışmalarının durumu incelenmiş ve bu çalışmaların bozulan arazilerdeki toprak özelliklerinde, zarar görmemiş doğal orman örtüsü altındaki toprak özellikleri ile kıyaslanarak iyileşmeye katkı gösterip göstermediği araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma alanı Artvin ili Borçka ilçesi sınırları içerisinde yer almaktadır. Çalışma yaklaşık 10 km' lik yol hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma alanı 41°18'15'' ile 41°17'42'' kuzey enlemleri ve 41°46'24'' ile 41°45'14'' doğu boylamları arasında yer almaktadır. Ortalama yükseklik 250 m olup, bakışı kuzey bakıdır. Ağaçlandırma faaliyeti 2011 yılında yapılmıştır.

Çalışma alanında, alanın iklim özelliklerinin incelenmesini sağlayacak uygun meteorolojik istasyon yoktur. Araştırma alanına en yakın meteoroloji istasyonu Borçka (150 m.) ilçesinde bulunmaktadır. Çalışma alanının iklim değerlerinin belirlenmesinde Borçka Meteoroloji istasyonunun uzun dönem (1987–2010) verileri kullanılarak yükselti ile değişimleri göz önüne alınmıştır (Anonim, 2010). Ortalama sıcaklık ve yağışlar araştırma alanının ortalama yükseltisine (250 m), Shreiber formülü ile enterpole edilmiş ve bulunan değerler Tablo 1'de verilmiştir (Çepel, 1988). Yapılan enterpolasyon yöntemine göre yıllık ortalama sıcaklık 13 °C ve yıllık ortalama yağış ise 1064,2 mm olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. Çalışma alanı yükseltisine uyarlanmış iklim verileri

Meteorolojik Veriler	Aylar												Yıllık
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Ortalama Sıcaklık (°C)	3,5	4,3	7,8	12,9	15,9	19,6	22,1	22,1	18,3	14,2	8,9	5,8	13
Ortalama Yağış (mm)	159,5	102,4	69,4	38,4	53,5	49,1	37,6	48,4	75,9	125,4	169,6	135	1064,2

Çalışma alanı; eosen, miosen, fliş kalkerleri ve yer yer volkanik kayalardan ibarettir. Topraklar bu oluşumların ayrışmasından meydana gelmiştir (Anonim,1990). Genel olarak bitki örtüsü bakımından akasya, sarıçam gibi ağaçlandırma sahaları yanında, yine ormanlık alanda sarıçam, gürgen, akçağaç gibi türler; ayrıca açıklık alan olarak alınan araştırma alanlarında da otsu bitkiler bulunmaktadır.

Toprak örnekleri deneme alanı olarak seçilen 4 farklı bölgeden (sarıçam dikim, akasya dikim, orman ve kontrol (dikim yapılmayan)) alınmıştır. Dikim yapılan her bir bölgeden 6 örnekleme noktası, kontrol ve orman alanlarından ise 3'er örnekleme noktası rastgele seçilmiş olup her bir örnekleme noktasından 2 tekrarlı olacak şekilde 0-10 ve 10-20 cm derinlik kademesinden hem bozulmuş hem de bozulmamış (silindir) toplam 72 adet toprak örneği alınmıştır. Bozulmuş toprak örnekleri hava kurusu hale gelinceye kadar kurutulmuştur. Topraklar

kök ve taşları ayıklandıktan sonra porselen havanda dövülerek 2 mm'lik elekten geçirilmiştir. Toprak örnekleri üzerinde tekstür, pH, Ec, toplam kireç, organik madde, toplam azot, karbon azot oranı (C/N), dispersiyon oranı, iskelet içeriği, hacim ağırlığı ve agregat stabilitesi gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal analizler yapılmıştır.

Hazırlanan toprak örnekleri Bouyoucos'un hidrometre yöntemine göre mekanik analize tabi tutulmuş; kum, kil ve toz oranları bulunmuştur. Bu oranlardan, toprak türü (tekstürü) sınıflarının ayırımı için hazırlanmış olan uluslararası tekstür üçgenine (E.C. Tommerup'a) göre toprak türü belirlenmiştir (Gülçur, 1974). Toprak örneklerinin pH ve Ec değerleri 1/2,5 oranında saf su/toprak karışımında, Hach-Lange HQ40D multiparameter ölçüm cihazı ile belirlenmiştir (Gülçur, 1974). Kireç analizi Scheibler kalsimetresi yöntemine göre yapılmıştır (Kacar, 2009). Organik madde analizi, güncellenmiş Walkley - Black ıslak yakma yöntemine göre tespit edilmiştir (Gülçur 1974, Kacar, 2009). Toplam azot tayini için Kjeldahl yaş yakma yöntemi (Steubing, 1965) kullanılmıştır (Öztürk ve ark., 1997). Karbon/azot oranı, organik madden belirlenen organik karbonun toplam azota bölünmesi ile elde edilmiştir. Dispersiyon oranı, Middleton'un dispersiyon oranı yöntemine göre hesaplanmıştır (Gülçur, 1974).

Hacim örneklemede alınan toprak örneği 105 C etüvde kurutulduktan sonra toplam ağırlık belirlenir. Daha sonra havanda dövüldükten sonra 2 mmlik elekten geçirilir. 2mm lik elek üstünde kalan kısım iskelet içeriği olarak ayrılır. Ayrılan bu kısım tartıldıktan sonra toplam ağırlığa oranlandıktan sonra birim hacimdeki iskelet içeriği hesaplanmış olur (Gülçur, 1974). Silindir ile alınan toprak örnekleri 105 °C de kurutulduktan sonra ortamdaki nem uzaklaştırılmıştır. Birim hacim içindeki toprak tartılarak, silindir hacmine bölünmek suretiyle hacim ağırlığı tespit edilmiştir (Gülçur, 1974). Hacim örneklemede alınan toprak örneğinin fırın kurusu ağırlığı belirlendikten sonra havanda dövülür ve 2 mm'lik elekten geçirilir. 2mm'lik elek üstünde kalan kısım iskelet içeriği olarak ayrılır. Ayrılan bu kısım tartıldıktan sonra toplam ağırlığa oranlanarak birim hacimdeki iskelet içeriği hesaplanmış olur (Gülçur, 1974). Agregat stabilitesi hava kurusu hale gelen topraklardan 2-4 g alınarak Yoder tipi ıslak eleme cihazında belirlenmiştir (Kemper ve Rosenau, 1986).

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, tek yönlü varyans (One way Anova) analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi ile birlikte hem kontrol alanı, hem de orman alanları ile ağaçlandırma sahaları arasında farklılık olup olmadığı belirlenmiştir. Ortaya çıkan farklılıklar tukey testi ile gruplandırılmıştır. Bu istatistiksel analizler "SPSS 19.0" paket programında yapılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan analizler sonucunda toprak tekstürüne ait ortalama veriler Tablo 2'de verilmiştir. Kontrol alanları ile dikim sahaları ve orman alanı arasında kum, kil ve toz bakımından farklılıklar her iki derinlik kademesinde de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır (P<0,005). Yapılan birçok çalışmada da sonuçlarımıza paralel olarak ağaçlandırma ile birlikte kum miktarının azaldığı, kil ve toz miktarının arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 2. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama kum, kil ve toz değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Kum (%)	0-10 cm	67,4ax	55,6ax	65,8ax	81,7bx	0,004
Kum (%)	10-20 cm	68,3bcx	53,5ax	65,5bx	78,8cx	0,007
Kil (%)	0-10 cm	13,1ax	18,2ax	13,8ax	5,1bx	0,001
Kil (%)	10-20 cm	12,3bcx	19,6abx	14,0ax	6,4cx	0,005
Toz (%)	0-10 cm	19,5abx	26,2ax	20,4abx	13,2bx	0,021
Toz (%)	10-20 cm	19,4ax	26,9bx	20,5ax	14,9ax	0,017

Yol yapımı ile birlikte yeşil örtü ortadan kaldırılmış olup, yüzey yağmura maruz bırakılmıştır. Dolayısı ile toprak taneciklerinin tutunması zorlaşmış; ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte oluşan tepe örtüsü ve kökler toprağın taşınmasını engelleyerek, yağmurun parçalama etkisi ve taşınma azalmıştır. Bu sayede kontrol alanlarına nazaran kum miktarında bir azalma söz konusu olmuştur. Kil ve toz değerleri incelendiğinde ise en düşük değer kontrol alanında olduğu sonrası akasya, sarıçam ve orman alanları olarak sıralandığı görülmüştür. Ağaçlandırma ile

birlikte alana yeşil örtünün gelmesi sonucu hem rüzgârın hem de yağmurun erozyon ve taşıma etkisi azaltılmıştır. Bu sayede topraktaki kil ve toz miktarında bir artış gözlenmiştir.

Yapılan analizler sonucunda toprak pH ve Ec değerlerine ait ortalama veriler Tablo 3’ de verilmiştir. Yol yapımı ile birlikte dökülen hafriyat anakayasının kireçli olmasından dolayı kireç içeriği kontrol alanlarında yüksek çıkmıştır. Doğal orman örtüsü ile ağaçlandırma yapılmayan alanlar arasındaki pH farkı yaklaşık 2 birim kadarken, ağaçlandırma ile birlikte bu fark 1 birim kadar azalmıştır. Toprak asitliliğinin artmasının sebebi, dökülen ölü örtünün ayrışması sonucu açığa çıkan organik asitler ve kök solunumu gibi değişimler olabilir. Toprak asitliliğinin değişiminde birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörler toprağın kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin yanında, toprağın oluşum ve gelişimini etkileyen yeryüzü şekli, iklim, anakaya ve canlılar gibi faktörlerdir. Topraktaki kilin artması ile birlikte suyun ve organik maddenin tutulması da pH değerinin düşmesine neden olabilir. Ormandaki toprak pH değerinin yüksekliği ağaçlandırma alanlarına göre daha yoğun bitki örtüsüne sahip olması dolayısı ile kil tutulmasının ve organik asitlerin daha yoğun olmasından kaynaklanabilmektedir. Yapılan bazı araştırmalarda, ağaçlandırma çalışmalarının toprak pH değerini bazı durumlarda artırdığı bazı durumlarda azalttığı sonucu ortaya çıkmıştır (Kara ve Bolat 2008; Grerup ve ark., 2006; Balestend ve ark., 2000; Çavdar, 2011; Akçay, 2018). Ec değerinin ise üst toprakta orman alanında yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan birçok çalışmada ağaçlandırma çalışmaları ile Ec değerinin arttığı görülmüştür. Bitki örtüsünün fazla olması dökülen ölü örtünün ayrışması ve ayrışma ürünleri sonucu açığa çıkan katyonlar Ec değerini artırmıştır.

Tablo 3. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama pH ve Ec değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
pH	0-10 cm	7,18bx	5,85ax	7,54cx	8,02dx	0,000
pH	10-20 cm	7,39by	6,00ax	7,63bx	8,18cx	0,000
Ec (µS/cm)	0-10 cm	115ax	118ax	84bx	91bx	0,003
Ec (µS/cm)	10-20 cm	78abx	70ay	90abx	104bx	0,002

Yapılan analizler sonucunda topraktaki toplam kireç ölçümlerine ait ortalama veriler Tablo 4’ de verilmiştir. Kireç değerleri bakımından çalışma alanları arasındaki farklılık her iki derinlik kademesinde de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P<0,005$ ). Derinlik kademeleri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak sadece orman alanında anlamlı düzeyde çıkmıştır ( $P>0,05$ ). Toplam kireç değerlerini incelediğimizde, her iki derinlik kademesinde en düşük kireç içeriğinin orman alanında olduğu görülmüştür. Daha sonra bu sıralama akasya, sarıçam ve kontrol alanı olarak gerçekleşmiştir. Bunun sebebi pH değerleri yüksek olan toprakların kireç içeriklerinin de yüksek olabilmesidir. Diğer taraftan özellikle kontrol alanlarında yol yapımında gelişigüzel dökülen hafriyatın kireçli anakayadan oluşması da yüksek çıkmasına sebebiyet verebilir. Ağaçlandırılma ile birlikte kireç içeriğinin düşmesinin sebebi ise alana gelen organik maddenin ayrışması sonucu açığa çıkan organik asitlerin yine kök ve mikro organizma solunumları sonucunda  $CO_2$  açığa çıkarak kireçle oksitlenmesidir. Turan (2015) yapmış olduğu çalışmada ağaçlandırma ile birlikte kireç miktarının azaldığını ifade etmiştir. Yine başka bir çalışmada, yol şevlerinde yapılan ağaçlandırma çalışmaları ile birlikte kireç miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Dehşet 2011). Benzer şekilde ağaçlandırma ile birlikte kireç içeriğinin arttığını belirten başka çalışmalar da bulunmaktadır (Çavdar 2011).

Tablo 4. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama toplam kireç değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Kireç (%)	0-10 cm	6,0abx	4,9ax	6,6bx	10,2cx	0,000
Kireç (%)	10-20 cm	6,1ax	6,1ay	6,6ax	10,2bx	0,000

Topraktaki organik madde ölçümlerine ait ortalama veriler Tablo 5’de verilmiştir. Bu verilere göre her iki derinlik kademesinde de toprakların organik madde değerleri orman alanında en yüksek çıkarken, kontrol alanında en düşük değer tespit edilmiştir. Genel itibari ile derinlik kademesi arttıkça organik madde değerlerinde azalış görülmüştür. Orman örtüsünün fazla ve çeşitli olması, bunun sonucunda dökülen ölü örtünün ayrışması ve toprağa karışması organik maddenin ormanda yüksek çıkmasının sebebi olarak gösterilebilir. Ağaçlandırma ile birlikte

organik maddenin artışı da alana getirilen bitki örtüsünün kök ve toprak üstü bitki ayrışmasından ileri gelmektedir. Diğer taraftan kil içeriğinin yüksek olması da organik maddenin tutulmasında önemli rol oynamaktadır. Ölü örtünün fazla olması mikroorganizma faaliyetlerinin de fazla olmasına sebep olacaktır. Bu durum toprakta salınan organik asitlerin ve CO<sub>2</sub>'nde fazlalığını ortaya çıkaracaktır. Ağaçlandırma faaliyetleri yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı toprak organik maddesini artırmıştır. Yapılan birçok araştırmada ağaçlandırma faaliyetlerinin toprak organik maddesini artırıcı etkisi olduğu ifade edilmiştir (Göl 2002, Tüfekçioğlu ve ark. 2002, Atmaca ve Tuluhan 2006, Turan 2015, Dehşet 2011, Küçük 2013).

Tablo 5. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama organik madde değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Organik Madde (%)	0-10 cm	3,62bx	5,30ax	1,68cx	1,17cx	0,000
Organik Madde (%)	10-20 cm	1,88by	3,28ay	1,24bcx	1,10cx	0,000

Topraktaki toplam azot ölçümlerine ait ortalama veriler Tablo 6'da verilmiştir. Değerler irdelendiğinde, yine en yüksek değer orman alanında olduğu bunu sırası ile akasya, sarıçam ve kontrol alanlarının izlediği belirlenmiştir. Bu duruma orman topraklarında bulunan mikroorganizma faaliyetlerinin çok ve hızlı olmasının neden olduğu söylenebilir. Ölü örtü açısından bol ve zengin olan orman toprağının ayrışması sonucu azot içeriğinde de bir artışın olası olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ölü örtünün cinsi ve ayrışma süresi de azot miktarı üzerinde etkili olmaktadır. Diğer taraftan yalancı akasya ağaçlandırma sahalarındaki azot içeriğinin yüksek oluşunun köklerdeki azot bağlayıcı bakterilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yalancı akasyanın köklerinde yaşayan yumru (Rhizobium) bakterileri ve mantarlar toprak havasındaki serbest azotu bağlamaktadırlar. Dehşet (2011), yaptığı çalışmada ağaçlandırma yapılan alanlardaki azot miktarının yapılmayan alanlara göre daha yüksek çıktığını ifade etmişlerdir. Yine Artvin'de yapılan baraj kenarı ağaçlandırma çalışmaları ile azot içeriğinin arttığı söylenmiştir (Sarıyıldız, 2008). Benzer çalışmalarda da ağaçlandırma ile birlikte azot içeriğinin arttığı ifade edilmiştir (Çavdar, 2011; Turan, 2015).

Tablo 6. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama toplam azot değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Toplam Azot (%)	0-10 cm	0,19ax	0,22ax	0,08bx	0,06bx	0,000
Toplam Azot (%)	10-20 cm	0,11by	0,15ay	0,07cx	0,04cx	0,000

Topraktaki C/N oranına ait ortalama veriler Tablo 7'de verilmiştir. Karbon azot oranı değerleri incelendiğinde 0-10 cm derinlik kademesinde en yüksek değer orman alanında daha sonra sarıçam, kontrol ve akasya alanında olduğu görülürken; 10-20 cm derinlik kademesinde ise sıralama kontrol, orman, sarıçam ve akasya olarak değişmiştir.

Tablo 7. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama C/N değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
C/N	0-10 cm	10,8ax	13,8ax	13,1ax	12,2ax	0,589
C/N	10-20 cm	9,4ax	12,4bx	10,6ax	14,9cx	0,000

Orman alanında C/N oranının yüksek oluşu, ölü örtü ve dolayısı ile organik maddenin yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Kontrol noktasında yüksek çıkmasının sebebi ise hafriyatın taşınması sonucunda özellikle yağışlarla birlikte azotun yüzeyel akışla taşınması ve azalması olabilir. Çalışmada dikkat çeken en önemli husus ise her iki derinlik kademesinde de C/N oranının en düşük akasya alanlarında olduğudur. Akasya ağaçlarının köklerinde bulunan yumrular sayesinde azotun tutulması ile yüzeyel akışla azot kaybı en aza inmiş; bu da karbon azot oranını düşük tutmuştur.

Topraktaki dispersiyon oranına ait ortalama veriler Tablo 8'de verilmiştir. Dispersiyon oranı değerleri incelendiğinde en yüksek değer kontrol alanında olduğu bunu sırası ile sarıçam, akasya ağaçlandırmaları ve orman alanlarının izlediği görülmüştür. Bu duruma sebep olarak organik madde ve kil içeriğini gösterilebilir.



Organik madde ve kil içeriğinin yüksek olduğu topraklarda dispersiyon oranı düşmektedir. Aynı zamanda hacim ağırlığının artması da dispersiyon oranını arttırmaktadır. Çalışmamızda organik maddenin de en yüksek ormanda, en düşük kontrol alanında olması bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Kontrol noktasındaki hacim ağırlığının yüksek çıkmasının da burada dispersiyon oranının yüksek çıkmasına neden olduğu söylenebilir. Çalışmada yer alan bütün alanların dispersiyon oranı için sınır değeri olan 15 in üstünde olduğu görülmüştür. Bölgenin erozyon riskinin yüksek olduğu elde edilen bulgularla da görülmüştür. Alanın orman olarak kalması ile dispersiyon oranının düştüğü, yol yapımı ile birlikte bu oranın ciddi şekilde arttığı ve bölgenin erozyona maruz kaldığı görülmüştür. Yılmaz (2007), yapmış olduğu çalışmada açıklık alandaki dispersiyon oranını orman alanlarına göre daha yüksek bulmuştur.

Tablo 8. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama dispersiyon oranı değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Dispersiyon Oranı	0-10 cm	63bx	44ax	73bcx	83cx	0,000
Dispersiyon Oranı	10-20 cm	69bx	44ax	65bx	58aby	0,016

Topraktaki iskelet içeriğine ilişkin ortalama veriler Tablo 9’da verilmiştir. İskelet içeriği bakımından incelendiğinde en yüksek iskelet içeriğinin her iki derinlik kademesinde de kontrol alanında daha sonra sıralamanın sarıçam, akasya ve orman alanı şeklinde olduğu görülmüştür. İskelet içeriği bakımından yapılan sınıflamaya göre (Kantarci 2000) orman ve akasya alanın orta taşlı sınıfına girdiği (% 25-50), sarıçam ve kontrol alanının (%50-75) ise çok taşlı iskelet sınıfına girdiği belirlenmiştir. İskelet içeriğinin yüksek çıkmasının sebebi organik maddenin ve kil içeriğinin düşük olması, kum içeriği ve hacim ağırlığının yüksek olması olabilmektedir. Diğer taraftan kum içeriğinin yüksek olduğu topraklar iskelet içeriği yüksek topraklardır. Çalışmada elde edilen kum değerleri de bu fikri destekler niteliktedir. Yapılan bazı çalışmalarda ağaçlandırma yapılan alanlarda iskelet içeriğinin azaldığı ifade edilmiştir (Yüksek ve ark.; 2010).

Tablo 9. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama iskelet içeriği değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
İskelet İçeriği (%)	0-10 cm	47bx	30ax	51bx	59bx	0,001
İskelet İçeriği (%)	10-20 cm	50ax	43ax	54abx	65bx	0,027

Topraktaki hacim ağırlığı değerlerine ilişkin ortalama veriler Tablo 10’da verilmiştir. Çalışma alanlarında en yüksek hacim ağırlığı kontrol sahasında çıkarken, sonra sarıçam ve akasya dikim sahaslarında en düşük ise orman alanlarında saptanmıştır.

Tablo 10. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama hacim ağırlığı değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Hacim Ağırlığı (g/cm <sup>3</sup> )	0-10 cm	1,37bx	1,08ax	1,48bx	1,68cx	0,000
Hacim Ağırlığı (g/cm <sup>3</sup> )	10-20 cm	1,60cy	1,17ay	1,56bx	1,79dx	0,000

Bu duruma ağaçlandırma ile birlikte kil ve organik madde içeriğinin artmasının sebep olduğu söylenebilir. Aynı zamanda iskelet içeriğinin yüksek olması da hacim ağırlığını artırıcı etki yapmaktadır. Turan (2015) yaptığı çalışmada, ağaçlandırma ile birlikte hacim ağırlığının azaldığını ifade etmiştir. Yine başka bir çalışmada Tüfekçioğlu ve ark. (2002), akasya ağaçlandırması ile birlikte hacim ağırlığının azaldığını tespit etmişlerdir. Yüksek ve ark. (2010), erozyon kontrolü ağaçlandırmaların toprak özellikleri üzerine etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada, ağaçlandırma ile birlikte hacim ağırlığını azalttığını tespit etmişlerdir. Dehşet (2011) baraj ağaçlandırmaları üzerine yaptığı çalışmada ağaçlandırma ile birlikte hacim ağırlığının azaldığını bulmuştur.

Agragat stabilitesi değerlerine ilişkin ortalama veriler Tablo 11’ de verilmiştir. En yüksek değer orman alanında, daha sonra sarıçam ve akasya alanlarında, en düşük değer ise yine kontrol alanlarında bulunmuştur. Agregat stabilitesini etkileyen ana etmenler kum, kil, organik madde gibi toprak özellikleridir. Kil ve organik maddenin

agregat stabilitesini artırdığı; kum ve iskelet içeriğinin ise azalttığı bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda toprağa organik madde (Özbek ve ark.; 1993) ve kil ilavesi ile (Páre ve ark.; 1999) agregatlaşmanın arttığı belirtilmiştir.

Tablo 11. Ağaçlandırma, orman ve kontrol alanlarındaki ortalama agregat stabilitesi değerleri

Toprak Özelliği	Derinlik	Akasya	Orman	Sarıçam	Kontrol	Önem Düzeyi
Agregat Stabilitesi (%)	0-10 cm	52,2bx	85,7ax	58,0bx	27,1cx	0,000
Agregat Stabilitesi (%)	10-20 cm	38,2cy	80,4ay	56,1bx	26,0dx	0,000

## SONUÇ

Ağaçlandırma çalışmaları sonucunda toprakta görülen değişimler şu şekilde sıralanabilir.

- Ağaçlandırma ile birlikte topraklardaki kum içeriği azalırken, kil ve toz içeriklerinde bir artış söz konusudur. Fakat bulunan bu değerler doğal yapıdaki orman alanlarının sahip olduğu değere henüz ulaşamamıştır.
- Ağaçlandırma ile birlikte toprak pH değeri azalış gösterirken bu değişim orman alanındaki değere ulaşamamıştır. Yine benzer şekilde ağaçlandırma ile birlikte Ec değerleri ağaçlandırma ile birlikte artış gösterirken sadece akasya alanındaki topraklar ile orman alanındaki toprakların EC değerleri birbirine yakın çıkmıştır.
- Toplam kireç değerleri ağaçlandırma ile birlikte azalma eğilimi göstermiştir. Orman alanındaki kireç değerine yaklaşamamıştır.
- Organik madde değerleri ağaçlandırma ile birlikte artış göstermiştir. Orman alanındaki organik madde ile akasya alanındaki organik madde değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Ağaçlandırma ile birlikte toprağın gelişimi ve verimliliği artış göstermiştir. Ağaçlandırma ile alana gelen bitki örtüsü ve bu örtünün artıkları ile organik madde artışı gerçekleşmiştir.
- Toplam azot verileri ağaçlandırma ile birlikte artış gösterirken bu artış en çok akasya alanında gerçekleşmiştir. Azot bağlayıcı bakterilerin etkisi burada net şekilde ortaya çıkmıştır.
- Karbo/ azot oranı ağaçlandırma ile birlikte farklı değişim göstermiştir. Sarıçam alanında artarken akasya alanında azalmıştır. En yüksek değer orman alanında tespit edilmiştir. Bu değişimlerin ana sebebi organik materyalin cinsi ve ayrışma süresinden ileri gelmektedir.
- Dispersiyon oranı ağaçlandırma ile birlikte azalmıştır. Buda ağaçlandırmanın erozyonu engellemesi bakımından olumlu sonuçlar ortaya çıkardığını göstermiştir. Fakat tüm alanların dispersiyon oranı değerleri 15'ten büyük olduğu için bölgenin erozyon riski altında olduğu aşikardır.
- İskelet içeriği ağaçlandırma ile birlikte azalma göstermiştir. Ağaçlandırma ile birlikte organik madde birikmesi ve kil tutulması ile birlikte ince materyalin tutulması dolayısı ile iskelet içeriğinin azalması sağlanmıştır.
- Hacim ağırlığı ağaçlandırma ile birlikte düşüş göstermiştir. Fakat hacim ağırlığı değerleri bitişindeki orman alanları değerine ulaşamamıştır. Hacim ağırlığı kilin tutulması ve alanda organik madde birikmesinin artması iskelet içeriğinin azalması ile birlikte artış göstermiştir.
- Toprakların agregat stabilitesi değerleri ağaçlandırma ile birlikte artış göstermiştir. Organik madde, kil tutulması ile birlikte agregatlaşma artmış dolayısı ile toprakların strüktür dayanıklılığı da artış göstermiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre özellikle baraj yapımı için yapılan yolların neticesinde dökülen şev topraklarında geciktirmeden ağaçlandırma çalışmaları yapılma zorunluluğu ortaya çıkmıştır. Ağaçlandırma ile birlikte toprakta iyileşmelerin olduğu görülmektedir. Diğer taraftan ağaçlandırma yapılarak toprakların erozyona uğramaları engellenebilecektir. Çünkü çıplak alanda toprak materyalini tutacak herhangi bir etken olmadığı için yağın yağışla birlikte toprak materyali eğim yönünde taşınacak ve toprak verimsizleşecektir.

Bu çalışmanın ana amaçlarından biri de erozyonu engelleyerek baraj ömrünün uzumasını sağlamaktır ve baraj kenarı ağaçlandırmalarının elzem olduğu araştırma bulguları sonucunda da ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

- Akçay, S. 2018. Sarıçam Ağaçlandırma Sahalarında Azot Mineralleşme Potansiyelinin Belirlenmesi (Giresun-Şebinkarahisar Örneği) Artvin Çoruh Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Artvin.
- Anonim, 1990. Cu-Pb-Zn Aramaları Artvin Projesi M.T.A., Trabzon.
- Anonim, 2010. Borçka ilçesi meteoroloji verileri, Artvin.
- Atmaca, F. ve Tuluhan, Y., 2006. Turan Emeksiz Kıyı Kumul Ağaçlandırmasının Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkisi. Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Doğa Dergisi (Journal Of Doğa), Sayı: 12.
- Balesdent, J., Chenu, C. and Balabane, M., 2000. Relationship of Soil Organic Matter Dynamics to Physical Protection and Tillage. . pp. 101-107. Soil and Tillage Research 53, pp. 215-230.
- Çavdar, G., 2011. Yarı Kurak Alanlarda Gerçekleştirilen Ağaçlandırma Çalışmalarının Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkilerinin İrdelenmesi: Polatlı (Sarıoba) Örneği Yüksek Lisans Tezi, A.Ç.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Artvin.
- Çepel, N., 1988. Orman Ekolojisi. İÜ Toprak İlimi ve Ekoloji Anabilim Dalı, İÜ Yayın No. 3518, O.F. Yayın No. 399, İstanbul, 536 s.
- Dehşet, F. 2011. Baraj ve Yol İnşası Nedeniyle Tahrip Edilen Alanlarda Yapılan Erozyon Kontrol Çalışmalarının Toprak Özelliklerinin İyileştirilmesi Üzerine Etkilerinin İrdelenmesi. Artvin Çoruh Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Artvin.
- Göl, C., 2002. Çankırı Eldivan Yöresinde Arazi Kullanım Türleri ile Bazı Toprak Özellikleri Arasındaki İlişkiler. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 201s, Ankara.
- Grerup, U. F., Brink, D. J. and Brunet, J., 2006. Land Use Effects on Soil N, P, C and pH Persist Over 40-80 Years of Forest Growth on Agricultural Soils. , Seri: A, Sayı: 2, ISSN: 1302-7085, s. 17-29. Forest Ecology and Management.
- Gülçur, F., 1974. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Analiz Yöntemleri. İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları, O.F Yayın No:201, Kurtuluş Matbaası, İstanbul, s.225.
- Kacar, B., 2009. Toprak Analizleri. Nobel Yayın dağıtım. Genişletilmiş 2. Baskı. 467 Sayfa.
- Kantarci M. D., 2000. Toprak İlimi. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Matbaası. Yayın No: 4261/462, İstanbul.
- Kara Ö, Bolat İ., 2008. The effect of different land uses on soil microbial biomass carbon and nitrogen in Bartın province. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 32 (4), 281-288.
- Kemper, W.D. and Rosenau, R.C., 1986. Aggregate Stability and Size Distribution. Methods of Soil Analysis.Part 1. Physical and Mineralogical Methods. 2nd Edition. Agronomy No: 9. 425-442, 1188 p, Madison, Wisconsin USA.
- Küçük, M., 2013. Farklı eğim ve bakı gruplarında bulunan meşe meşcerelerinde ve mera alanlarında azot mineralizasyonu ve toprak solunumunun belirlenmesi. Doktora Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Öztürk, M., Pirdal, M., ve Özdemir F., 1997. Bitki Ekolojisi Uygulamaları, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No, 157, Bornova, İzmir.
- Sarıyıldız, T., 2008. Çoruh Havzası Deriner Barajı Yol Şevi Ve Geçici Yerleşim Yeri Çevre Ağaçlandırılmasında Kullanılan Farklı Türlerin Altındaki Toprakların Bazı Özelliklerinin Doğal Ve Açık Alanların Toprak Özellikleriyle Karşılaştırılması., Baraj Havzalarında Ormancılık I. Ulusal Sempozyumu, K.S.Ü. Orman Fakültesi Yayın No: 46060, Kahramanmaraş.
- Steubing, L., 1965. Pflanzenökologisches Praktikum. Berlin-Hamburg, Parey.
- Özbek, H., Kaya Z., Gök, M. ve Kaptan, H. 1993. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi Kitabı, Yayın no: 73, Ders Kitapları Yayın no: A-16, ss: 77-119, Adana.
- Pare, T., Dinel, H., Moulin, A. P. and Townley-Smith, L. 1999. Organic Matter Quality and Structural Stability of a Black Chernozemic Soil Under Different Manure and Tillage Practices. Geoderma, pp: 311-326.
- Turan, A. 2015. Ağaçlandırma Çalışmalarının Bazı Toprak Özellikleri Üzerine Etkilerinin İrdelenmesi. SDÜ, Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Tüfekçiöğlü, A., Yüksek, T. and Kalay, H.Z., 2002. Gümüşhane İli Torul İlçesi Yalancı Akasya Ağaçlandırmalarının Biyokütle ve Bazı Toprak Özellikleri Yönünden İncelenmesi, Gümüşhane ve Yöresinin Kalkınması Sempozyumu, Gümüşhane.

- Yılmaz, F 2007. Erfelek Barajı Yağış Havzasında (Sinop) Farklı Arazi Kullanım Şekilleri Altındaki Toprakların Bazı Hidro-Fiziksel Özelliklerinin Araştırılması Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Düzce.
- Yüksek F., Küçük M., Erdoğan Yüksel E., Güner S., (2010), Artvin merkez Seyitler köyünde erozyon kontrol amaçlı yapılan ağaçlandırma çalışmasının bazı toprak özelliklerine etkisi, III. Ulusal Karadeniz Ormanlık Kongresi Bildiriler Kitabı'nın içinde, Artvin, ss. 973-980.ç

DRAFT

## First record of *Liacarus (L.) subterraneus* (Koch, 1844) from Turkey

Merve Yaşa<sup>1</sup>, Saniye Tetik<sup>1</sup>, Şule Baran<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sakarya University, Faculty Arts and Sciences, Department of Biology, Sakarya, Turkey.

\* Corresponding author e-mail: merve.yasa1@ogr.sakarya.edu.tr

### Abstract

Oribatid mites are one of the richest groups of mites about 11,000 species identified to date. They usually live in soil, debris, moss, lichen, bark, rock cracks and rarely in aquatic environments. Oribatid mites play an important role in soil formation, decomposition of organic matter, and nutrient cycle in soil. It is also known that some species are important as bioindicators in intermediate worms.

Soil samples were taken in Kocaeli and placed to Berlese funnel. Oribatid mites were selected with needle and pipette. Identification of species were studied on compound light microscope. Species belonging to family Liacaridae; *Liacarus (L.) subterraneus* (Koch, 1844) were found first record for Turkey.

**Keywords:** Acari, Oribatida, *Liacarus*, first record, Kocaeli, Turkey.

### INTRODUCTION

Oribatid mites are one of the richest groups of mites about 11,000 species identified to date (Subias, 2018). They usually live in soil, debris, moss, lichen, bark, rock cracks and rarely in aquatic environments (Evans, 1992). Oribatid mites play an important role in soil formation, decomposition of organic matter, and nutrient cycle in soil (Behan-Pelletier, 2002; Wallwork and Rodriguez 1961). It is also known that some species are important as bioindicators in intermediate worms (Sengbusch, 1977).

### MATERIALS AND METHODS

Soil and debris samples taken from Kocaeli province in 2018 were labeled and put into bags. In the laboratory, samples were placed in Berlese-Tulgrenn funnels and kept under a light source for one week. In the stereomicroscope, oribatid mites were removed with needles and pipettes and 50% lactic acid was added to the oribatid mites on the slide. Sem photos were taken. Family, genus and species were identified.

### RESULTS

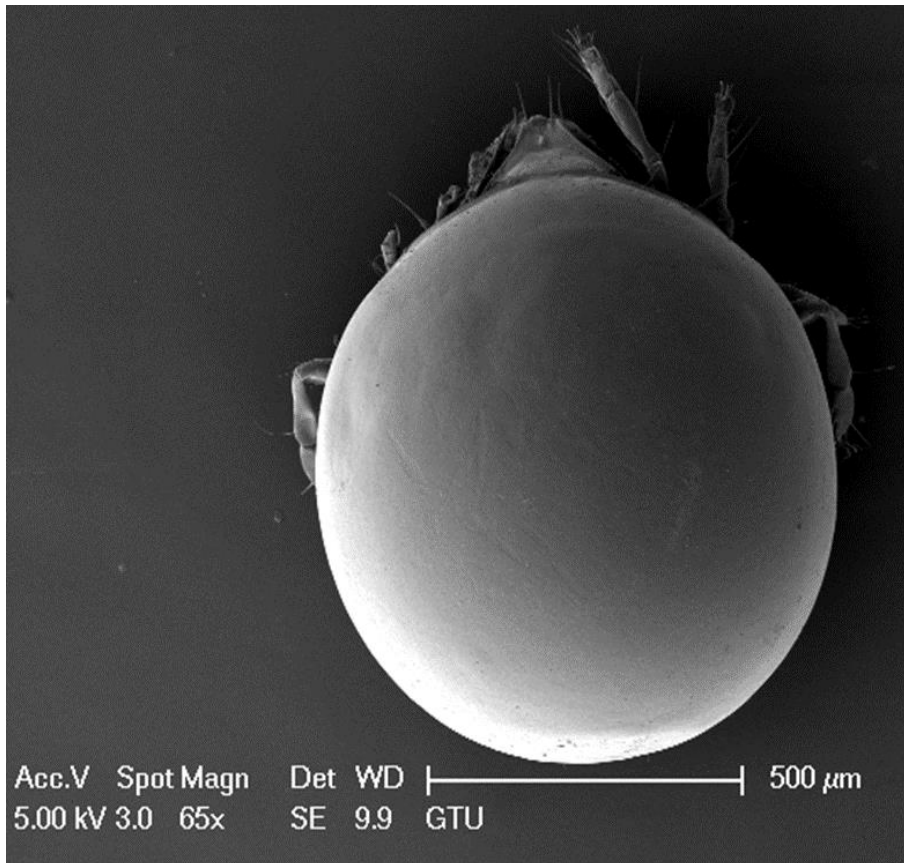
Dimensions is 1038×812 µm. Rostrum long and little rough and sharp incision on each side. Their seta setiform. Lamellar long, well separated and their cuspides thin, long, apex pointed. Translamella very short and no tooth. Lamellar seta setiform. Interlamellar seta setiform, short and thin. Notogaster surface smooth and very dark (Figure 1). Sensillus spindle shaped (Figure 2). Epimeral setae formula 3-1-3-3. 6 pairs of genital, 1 pairs of aggenital, 2 pairs of anal and 3 pairs of adanal seta thin and smooth. All claw heterotridactylous.

### DISCUSSION and CONCLUSION

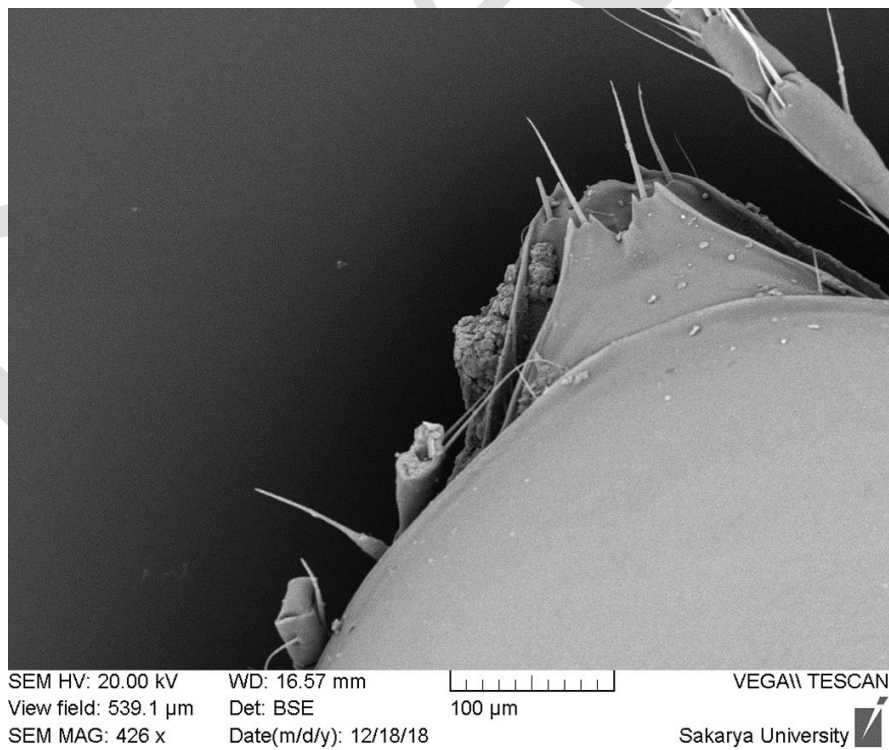
*Liacarus (L.) subterraneus* is widespread in the Holarctic region Subias (2018). The dimensions of the specimens found in Turkey are in accordance with previously known specimen. The body length of this species was described as 810-1200 µm Weigmann (2006) and 1.185-1.200 x 825-900 µm Perez Inigo (1997). *Liacarus (L.) brevilamellatus* and *Liacarus (L.) coracinus* were found previously in Erzurum (Ocak et al., 2007; Akman et al., 2018), Giresun, Mersin, Ordu, Samsun, Trabzon, (Grobler et al., 2003) Turkey.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Prof. Dr. Fatih Üstel and Semih Yücel in Metallurgical and Materials Engineering Department of Sakarya University for scanning electron microscopy investigations.



**Figure 1.** *Liacarus (L.) subterraneus* dorsal view



**Figure 2.** *Liacarus (L.) subterraneus* prodorsum view

## REFERENCES

- Akman, N., D. Aydın & N. Ayyıldız, 2018. Erzurum ili gustaviooid akarları (Acari, Oribatida, Gustavioidea). Bitki KorumaBülteni, 58 (2): 55-62.
- Behan-Pelletier, V.M. 2002. Acari and Collembola biodiversity in Canadian agricultural soils. Canadian journal of Soil Science 83; 279-288.
- Evans, G.O., 1992. Principles of Acarology, CA.B International, Wallingford.
- Grobler, L., S. K. Ozman & S. Cobanoğlu, 2003. The genera *Liacarus*, *Stenoxenillus* and *Xenillus* (Oribatida: Gustavioidea) from Turkey. Acarologia, 43 (1-2): 131-147.
- Ocak, I., S. Doğan, N. Ayyıldız & I. Hasenekoglu, 2007. The external mycoflora of the oribatid mites (Acari) in Turkey, with three new mite records. Archives des Sciences, 61 (1): 1-6.
- Pérez-Íñigo, C., 1997. "Acari, Oribatei, Gymnionota I, 1-374". In: Fauna Iberica, Vol. 9 (Eds. M. A. Ramos, J. A. Tercedor, X. B. Ros, J. G. Noguera, A. G. Sierra, E. Macpherson Mayol, F. M. Piera, J. S. Marino & J. T. González) Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, 374 pp.
- Sengbusch, H.G., 1977. Review of oribatid mites-anoplocephalan tapeworm relationships (Acari: Oribatei: Cestoda: Anoplocephalidae). In: Dindal, D.L. (Ed.), Biology of Oribatid Mites. State University of New York, Syracuse, pp. 87-102.
- Subías, L. S., 2004. Listado sistemático, sinonímico y biogeográfico de los ácaros oribatidos (Acariformes: Oribatida) del Mundo (Excepto fósiles). Graellsia 60: 3-305.
- Wallwork, J. A., Rodríguez, J. G., 1961. Ecological studies on oribatid mites with particular reference to their role as intermediate hosts of Anoplocephalid cestodes. Journal of Economic entomology. 54(4), 701-705.
- Weigmann, G., 2006. Hornmilben (Oribatida) Die Tierwelt Deutschlands, Begründet 1925 von Friedrich Dahl 76. Teil. Goecke & Evers, Keltern, 520 pp.

## Synthesis and structural characterization of HMBOS; A comparative MP2 and DFT study

Derya Güngördü Solğun<sup>1\*</sup>, Mehmet Salih Agirtas<sup>1</sup>, Ümit Yildiko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Van Yuzuncu Yıl University, 65080, Van, Turkey

<sup>2</sup>Architecture and Engineering Faculty, Department of Bioengineering, Kafkas University, Kars, 36100, Turkey

\* gungorduderya@hotmail.com

### Abstract

A new compound (4-hydroxy-3-ethoxybenzoyl) oxy silver (HMBOS) was synthesized. Quantum chemical calculations of the molecule were performed by the density functional theory (DFT) and second order Møller-Plesset perturbation theory (MP2). The characterization of the molecular structure by ionic bonding with silver (I) via oxygen was investigated by a combination of DFT studies and experimental results. Nonlinear optical properties, natural bond orbitals (NBOs), frontier orbitals and electrostatic potential mapping (MEP) surfaces were also calculated. Parameters such as HOMO-LUMO band spacing ( $\Delta$ ), ionization potential (I) electron affinity (A) were obtained. The thermodynamic properties were calculated by the vibration analysis. Experimentally obtained FTIR analysis and theoretical values were compared and SEM techniques were used to determine the structure.

**Keywords:** DFT, MP2, HOMO-LUMO gap, Natural Bond Orbital

### INTRODUCTION

Benzoate with metal, benzoic, salicylic acid structure, molecular properties and electronic charge distribution, has been subject to various studies (Abe S et al., 2018). The level of quantum chemical calculations is that it achieves close results with an experiment in organic synthesis, molecular design, drug design, and reaction research. Another advantage is that when compared to experimental methods, the calculation method can provide detailed information about reaction paths and transition states. DFT, which is based on electron density functions, is frequently used in determining several parameters, such as molecular structures, properties, chemical shifts, and vibrational frequencies. Its success has been shown in the study of electronic orbital properties such as nonlinear optics (NLO) (Karakaş D and Sayin K, 2015) and natural bond orbital (NBO)(Mary YS and ark., 2019). Comparative studies of DFT and MP2 methods are available (Adamovich SN et al., 2018) significant results are obtained by DFT method in characterization of organometallic compounds (Tsipis AC, 2017). Theoretical studies of the frontier molecular orbital, molecular electrostatic potential and thermodynamic parameters are included in many studies (Kumaresan P et al., 2017).

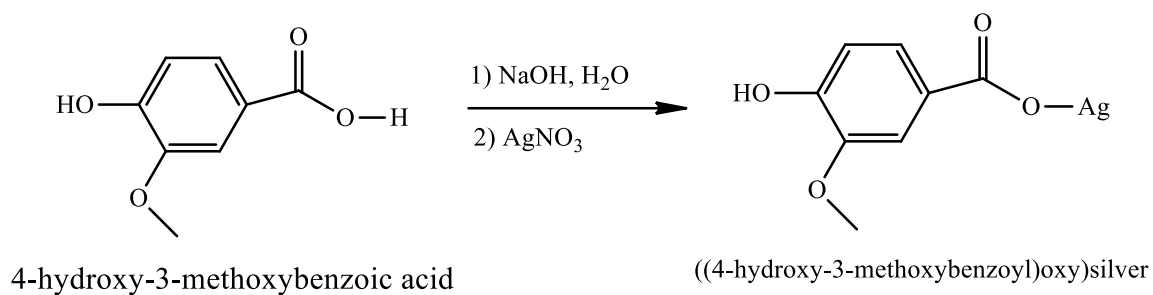
In this study, the synthesis of the ((4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)oxy)silver compound was carried out. The theoretical analyses of the compound was calculated by DFT / B3LYP and second order Møller-Plesset perturbation theory (MP2) method. Optimized structural parameters of the molecule, experimental and theoretical vibrational spectra, total dipole moment, and thermo-chemical parameters (energy, entropy and heat capacity) analysis are presented. NBO, NLO, HOMO-LUMO Mulliken charge analysis and PED analysis was performed. It was observed that the results were consistent with the theoretical and experimental results.

### MATERIALS AND METHODS

#### Synthesis of ((4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)oxy)silver

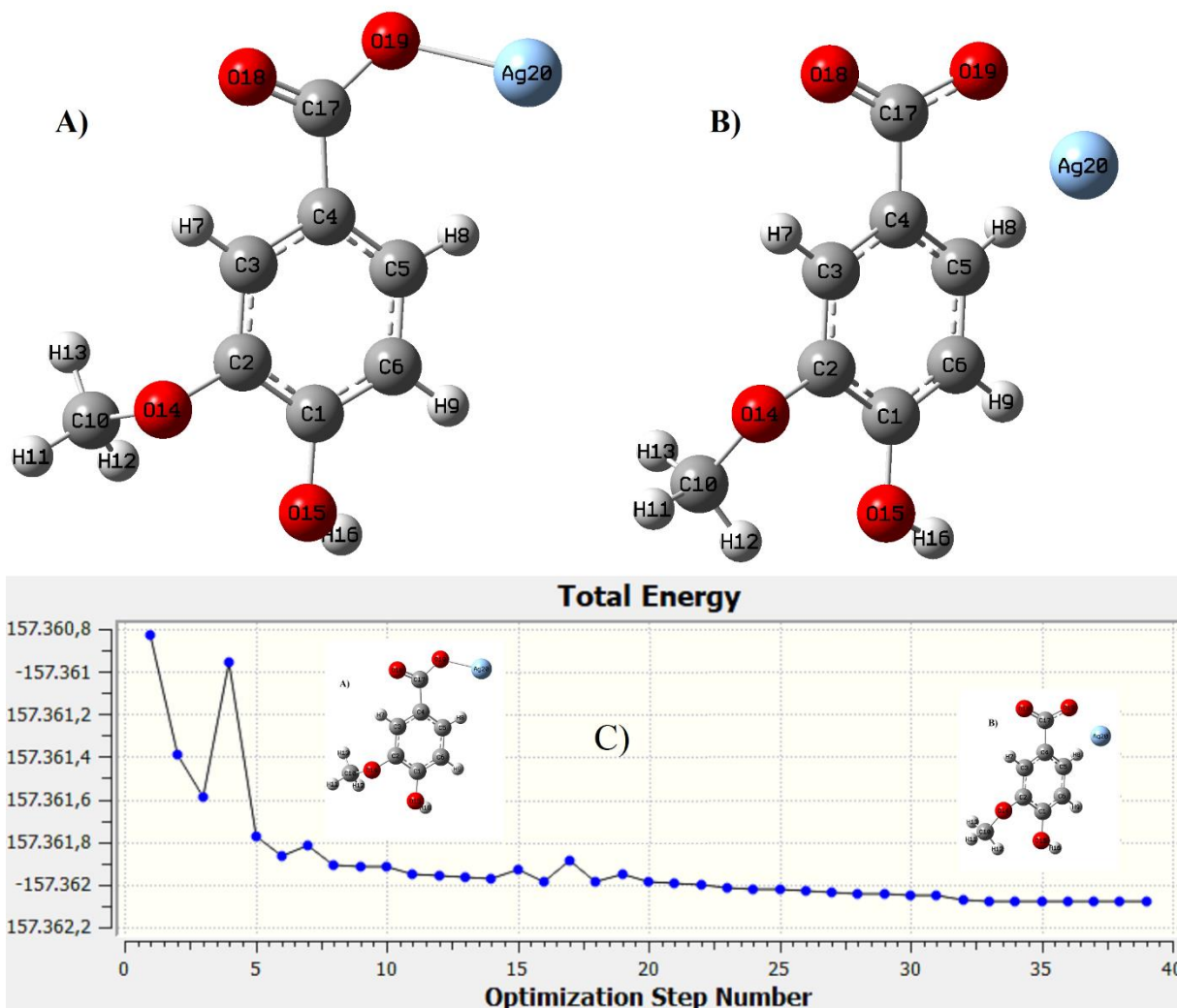
0.16 g of vanilic acid, 0.2 g of NaOH and 0.164 g of AgNO<sub>3</sub> were mixed in 10 ml of water at room temperature. With the addition of AgNO<sub>3</sub>, the color changed and the product collapsed. After stirring for 30 minutes, it was stopped. The product was washed with water and methanol. It dried. C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>AgO<sub>4</sub>, Yield: 0.11g, Mp > 300 ° C



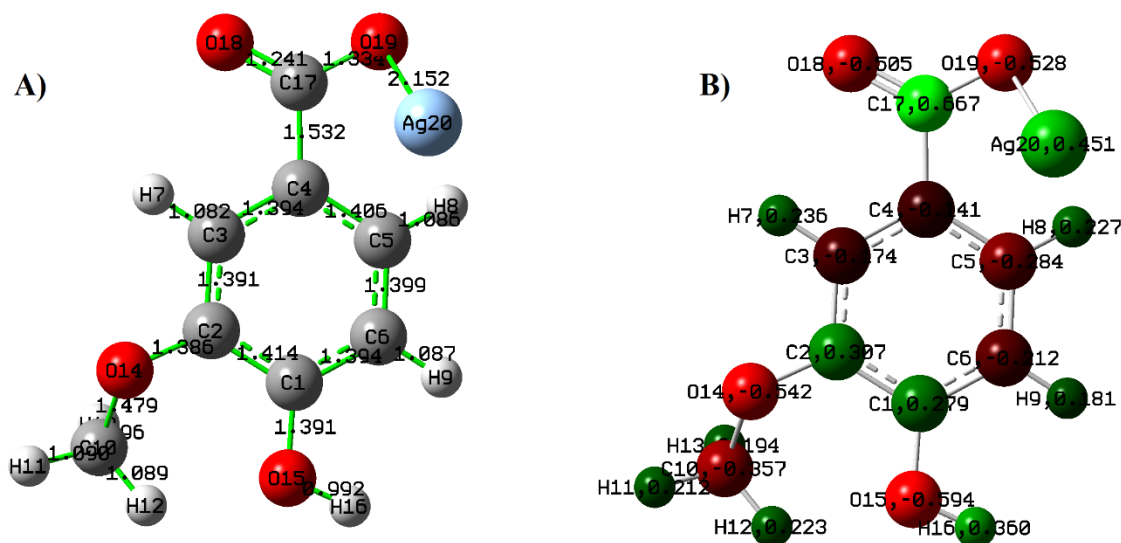


**Scheme 1.** Synthesis of ((4-hydroxy-3-methoxybenzoyl)oxy)silver

## RESULTS AND DISCUSSION



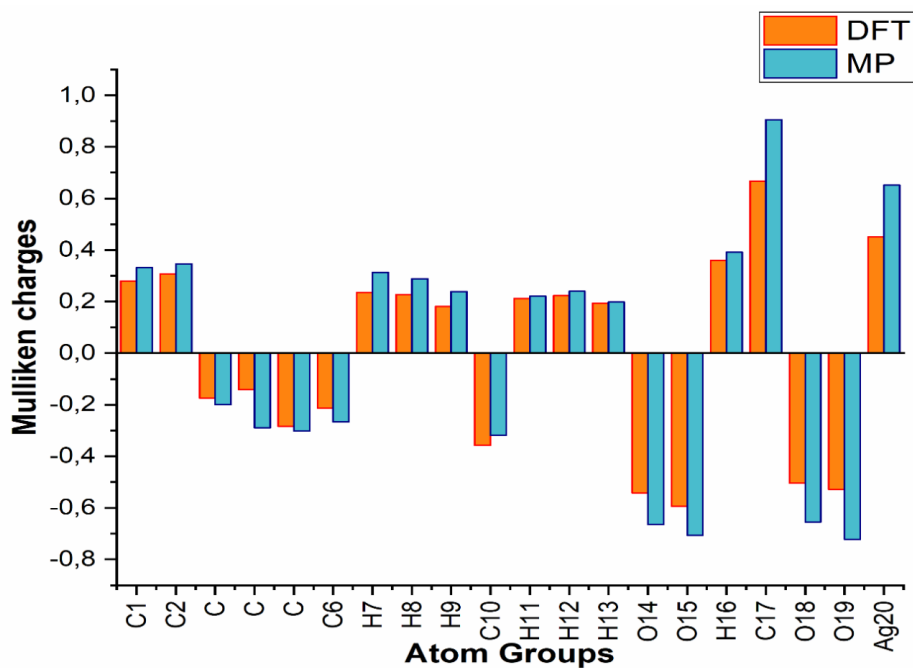
**Figure 1.** Optimized structures of ((4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oxy)silver (HMBOS). (A) pre-optimized, (B) optimized.



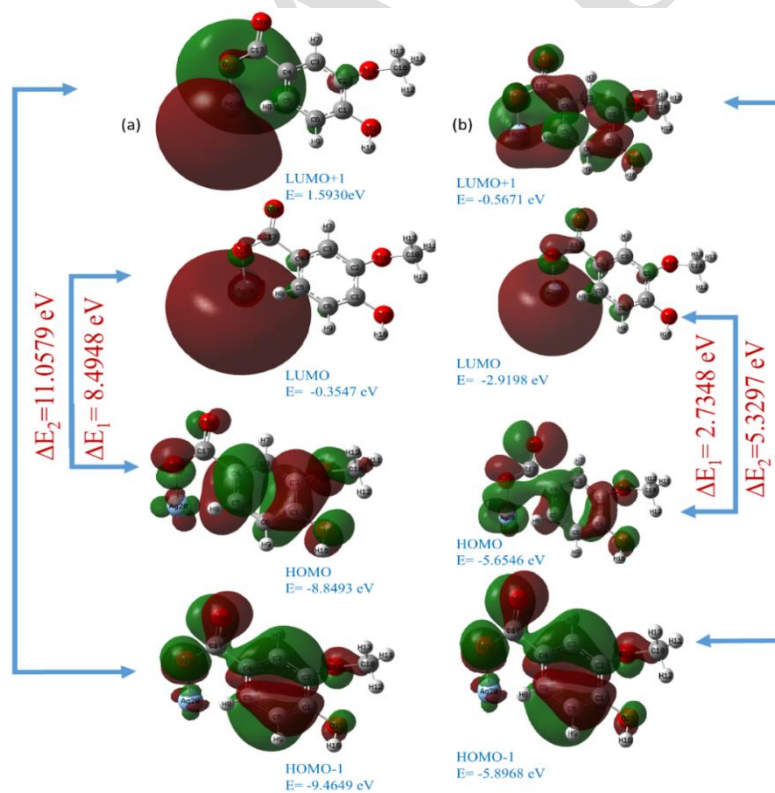
**Figure 2.** A) Optimized bond lengths of HMBOS and B) Mulliken atomic charges

**Table 1.** Optimized atomic charges of HMBOS.

Atom Groups	DFT	MP2	Atom Groups	DFT	MP2
C1	0.279062	0.331703	H11	0.211504	0.221249
C2	0.307040	0.345896	H12	0.223164	0.240468
C3	-0.174325	-0.200165	H13	0.193895	0.198445
C4	-0.141453	-0.289791	O14	-0.541516	-0.665307
C5	-0.283541	-0.301523	O15	-0.593785	-0.707099
C6	-0.211987	-0.267276	H16	0.360020	0.391422
H7	0.235696	0.313481	C17	0.667336	0.904836
H8	0.227397	0.288088	O18	-0.504773	-0.655131
H9	0.181203	0.238918	O19	-0.528103	-0.721563
C10	-0.357442	-0.318556	Ag20	0.450610	0.651904



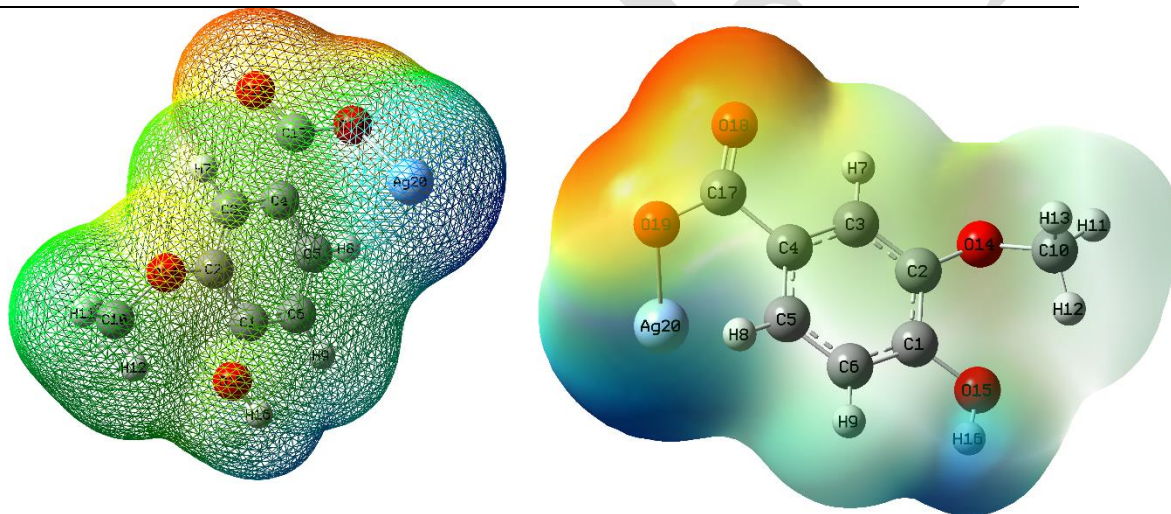
**Figure 3.** Graphical comparison of HMBOS Mulliken atom charges in DFT and MP2 method.



**Figure 4.** Visual and energy values of HOMO, HOMO-1, LUMO and LUMO + 1 for HMBOS. (a) MP, (b) DFT

**Table 2.** Electronegativity ( $\chi$ ) and global electrophile ( $\omega$ ) etc. values

Molecules Energy	MP2	DFT
$E_{LUMO}$	-0,3545	-2,9198
$E_{HOMO}$	-8,8493	-5,6546
Energy Gap ( $\Delta$ ) $ E_{HOMO} - E_{LUMO} $	8,4948	2,7348
Ionization Potential ( $I = -E_{HOMO}$ )	8,8493	5,6546
Electron Affinity ( $A = -E_{LUMO}$ )	0,3545	2,9198
Chemical hardness ( $\eta = (I - A)/2$ )	-4,2474	-1,3674
Chemical softness ( $s = 1/2 \eta$ )	-2,1237	-0,6837
Chemical Potential ( $\mu = -(I + A)/2$ )	-4,6019	-4,2872
Electronegativity ( $\chi = (I + A)/2$ )	0,6772	1,9599
Electrophilicity index ( $\omega = \mu^2/2 \eta$ )	-2,4929	13,4416



**Figure 5.** Molecular electrostatic potential (MEP) maps of the HMBOS compound

## CONCLUSION

In the present study, the synthesized (4-hydroxy-3-ethoxybenzoyl oxy) silver compound was optimized by using the basic set of MP2 and DFT 6-311G (d, p). We have calculated several parameters, such as the neutral band orbitals, the boundary orbitals, the electronic surface map of the molecule. In the theoretical study, we have used DFT and MP2 methods, which have proven reliability. We have compared the obtained results with some experimental parameters. Band energy gap, dipole moment and polarity values of the compound indicated the reactive and polarity of the molecule. Thermodynamic data are important for further studies in other areas of the compound. Synthetic and theoretical chemical work could also play an important role in understanding the dynamics of the molecule. The molecular stabilization energy obtained from NBO analysis shows hyperconjugative interaction.

## REFERENCES

- [1] Abe S., Chen X., Chen Z., Hojo M. (2018) Chemical interaction between alkaline earth metal ions and the benzoate or 2,6-naphthalenedicarboxylate ion in acetonitrile and alcohols. *Journal of Molecular Liquids* 262:119-25.
- [2] Abid Y., Feki H., Guidara S. (2015) Structural, vibrational, NLO, MEP, NBO analysis and DFT calculation of bis 2,5-dimethylanilinium sulfate. *Journal of Molecular Structure* 1080:176-87.
- [3] Adamovich SN, Aksamentova TN, Chipanina NN, Oznobikhina LP, Smirnov VI. (2018) Molecular structure, proton affinity and hydrogen bonds of (2-hydroxyethyl)amine-N-oxides: DFT, MP2 and FTIR study. *Journal of Molecular Structure* 1151:142-51.
- [4] Albanov AI, Belyaeva VV, Bolgova YI, Trofimova OM. (2019) Stimulation intramolecular F...H hydrogen bond by intramolecular N → Si interaction in Si-fluoro derivatives of 8-mercaptoquinoline: DFT and MP2 calculations. *Chemical Physics Letters* 715:293-8.
- [5] Anbalagan G, Bhuvaneshwari R, Chakkaravarthi G, Divya Bharathi M, Murugesan KS. (2018) Molecular structure, vibrational spectroscopic (FT-IR, FT-Raman), NBO, HOMO and LUMO analysis of morpholinium oxalate by density functional method. *Journal of Molecular Structure* 1173:188-95.
- [6] Arivazhagan M, Jeyavijayan S, Manivel S, Meenakshi R. (2015) Vibrational spectroscopic (FTIR and FT-Raman), first-order hyperpolarizability, HOMO, LUMO, NBO, Mulliken charge analyses of 2-ethylimidazole based on Hartree-Fock and DFT calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 134:493-501.
- [7] Asirvatham PS., Priya MK., Renuka V., Revathi BK, Sathya S. (2019) Molecular Structure, Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR) Analysis, HOMO-LUMO Energies, Mulliken, MEP and Thermal Properties of New Chalcone Derivative by DFT Calculation. *Materials Today: Proceedings* 8:37-46.
- [8] Ayala R, López-López JA. (2016) Assessment of the performance of commonly used DFT functionals vs. MP2 in the study of IL-Water, IL-Ethanol and IL-(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> clusters. *Journal of Molecular Liquids* 220:970-82.
- [9] Balakina MY, Fominykh OD, Vasilyev IV. (2018) Dynamic first hyperpolarizability of trans- and cis-isomers of azobenzene chromophore DO3 calculated at DFT and MP2 levels. *Computational and Theoretical Chemistry* 1139:1-8.
- [10] Barańska H., Lewandowski W. (1991) Comparison of the influence of silver, iron(III) and chromium(III) on the aromatic system of benzoic and salicylic acids in hydrated and anhydrous complexes. *Vibrational Spectroscopy* 2:211-20.
- [11] Belhouchet M, Ben Ahmed A, Dammak T, Kessentini A. (2018) DFT computations on: Crystal structure, vibrational studies and optical investigations of a luminescent self-assembled material. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 191:241-8.
- [12] Benhamada L, Ghalla H, Issa TB, Sayari F. (2019) Synthesis, crystal structure, DFT calculations and molecular docking of l-pyroglutamic acid. *Journal of Molecular Structure* 1178:436-49.
- [13] Beni AS, Monfared SM (2013) DFT and MP2 calculations on new series of hydroxythioxanones. *Journal of Molecular Structure* 1039:8-21.
- [14] Bestaoui-Berrekchi-Berrahma N, Derreumaux P, Sekkal-Rahal M, Yousfi N. (2016) MP2 and DFT studies of β-d-neocarrabiose and β-d-neocarrabiose monohydrate. *Computational and Theoretical Chemistry* 1091:24-30.
- [15] Cheng Z, Hu H, Ji G, Qiu X, Yang J. (2019) A theoretical investigation on the selective extraction of Cu(II) from Ni(II) by 2-aminomethylpyridine derivatives: A DFT study. *Polyhedron* 157:200-7.
- [16] Dai Y., Gao L., Hu Y., Liu Y., Song Z., Zhang H. (2016) DFT computational study on decarboxylation mechanism of salicylic acid and its derivatives in the anionic state. *Journal of Molecular Structure* 1116:56-61.

- [17] De Carvalho EFV, Lopez-Castillo A, Roberto-Neto O. (2018) A comparative study of the structures and electronic properties of graphene fragments: A DFT and MP2 survey. *Chemical Physics Letters* 691:291-7.
- [18] Dorofeeva OV, Osina EL. (2017) Performance of DFT, MP2, and composite ab initio methods for the prediction of enthalpies of formations of CHON compounds using isodesmic reactions. *Computational and Theoretical Chemistry* 1106:28-35.
- [19] Elhorri AM, Zouaoui-Rabah M. (2017). NLO response of derivatives of benzene, stilbene and diphenylacetylene: MP2 and DFT calculations. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 25:800-8.
- [20] Ingram AL., Nickels TM., Maraoulaite DK., White RL. (2016) Thermogravimetry-mass spectrometry investigations of salicylic acid and acetylsalicylic acid desorption from montmorillonites. *Thermochimica Acta.* 639:120-9.
- [21] Kalinowska M., Lewandowska H., Lewandowski W. (2005) The influence of metals on the electronic system of biologically important ligands. Spectroscopic study of benzoates, salicylates, nicotinate and isoorotates. Review. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99:1407-23.
- [22] Karakaş D., Sayin K. (2015) Structural, spectral, NLO and MEP analysis of the  $[MgO_2Ti_2(OPri)_6]$ ,  $[MgO_2Ti_2(OPri)_2(acac)_4]$  and  $[MgO_2Ti_2(OPri)_2(bzac)_4]$  by DFT method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 144:176-82.
- [23] Kumar A., Rahangdale D. (2018) Chitosan as a substrate for simultaneous surface imprinting of salicylic acid and cadmium. *Carbohydrate Polymers* 202:334-44.
- [24] Kumaresan P, Latha B, Nithiyantham S, Sampathkumar K. (2017) Spectroscopic, Homo-Lumo and NLO studies of tetra fluoro phthalate doped Coumarin crystals using DFT method. *Journal of Molecular Structure* 1142:255-60.
- [25] Mary YS., Mehdipour E, Shafieyoon P. (2019) Synthesis, characterization and biological investigation of glycine-based sulfonamide derivative and its complex: Vibration assignment, HOMO – LUMO analysis, MEP and molecular docking. *Journal of Molecular Structure* 1181:244-52.
- [26] Pálincó I., Sipos P., Sztankovics D., Timár Z, Varga G. (2019) Esterification reactions with acetate- or benzoate-containing CaAl-layered double hydroxide samples. *Journal of Molecular Structure* 1186:303-6.
- [27] Tsipis AC. (2014) DFT flavor of coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* 272:1-
- [28] Tsipis AC. (2017) DFT challenge of intermetallic interactions: From metallophilicity and metallaromaticity to sextuple bonding. *Coordination Chemistry Reviews* 345:229-62.

## Porous Polyurethane Film Fabricated Via The Breath Figure Approach For Biomedical Application

Gizem Daban<sup>1</sup>, Cem Bayram<sup>2</sup>, Betül Bozdoğan<sup>3</sup>, Emir Baki Denkbaş<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Division, Graduate School of Science and Engineering, Hacettepe University, 06800, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup>Advanced Technologies Application and Research Center, Hacettepe University, 06800, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup>Chemistry Department, Faculty of Science and Letters, Aksaray University, 68100, Aksaray, Turkey

<sup>4</sup>Biomedical Engineering Department, Faculty of Engineering, Başkent University, 06530 Bağlıca, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: [emirbaki@gmail.com](mailto:emirbaki@gmail.com)

### Abstract

Self-assembly is the most basic mechanism of nature, and scientists have been inspired by nature. The breath figure (BF) method is an effective process for fabricating porous polymeric films. In this method, the polymer solution is cast onto the substrate surface, such as glass, silicone, or an immiscible liquid, then the solvent in the polymer solution evaporates immediately, and the surface temperature of the polymer solution decreases, which is also an environmental friendly procedure. BF method can be applicable to various polymers, yet polyurethane (PUs) come forward on biomedical applications like cardiac pacemakers, vascular prostheses, drug-delivery implants, tissue adhesives, and wound-burning dressings, because of their biocompatibility, stability, sterilizability, resistivity to chemicals, high strength, and elastic properties. In this study, we fabricated porous polymer films from thermoplastic polyurethane (PU) through static BF with  $\text{CHCl}_3$  as a solvent under 55–80% relative humidity. The porous PU films were prepared within various pore structures and sizes, which were adjustable, depending on the fabrication conditions. The humidity and exposure time were examined as variable parameters affecting the surface morphology, wettability, and cytotoxicity. Atorvastatin calcium as a model drug was loaded into the porous films during the casting process, and the drug-loading and drug-releasing behaviors of the porous PU membranes were evaluated. Approximately 60–80% of the drug was released in 14 days. The films exhibited sustained drug-release performances because of the hydrophobicity and nonbiodegradable nature of PU for perivascular drug administration.

**Keywords:** Polyurethane; Breath Figure; Self-Assembly; Drug release.

### INTRODUCTION

Scientists have been inspired from nature ever since. As so the same phenomenon occurred for ordered porous pattern films, which have wide usage area such as templates<sup>12</sup>, separation<sup>3</sup>, optical and optoelectronic devices<sup>4</sup>, chemical power source<sup>5</sup>, micro-patterning of biological molecules<sup>6</sup>, cell culture and inhibition<sup>7</sup>, drug release<sup>8</sup> etc. Francois et al. have realized that ordered porous films can be obtained via self-assembled orientation of the polystyrene-polyphenylene (PS-PPP) block copolymer solution with carbon disulphide ( $\text{CS}_2$ ) in humid environment<sup>9</sup>. The method of producing honeycomb shaped films are so called as breath figure (BF). The production of BF films is based on evaporation of volatile solvent and liquid form of solvent, used for humidity source like water, methanol, ethanol etc., at the end of the process. Process starts with casting of polymer solution onto substrate surface of various types, such as glass, silicone or immiscible liquids, and evaporation of solvent in the solution begins immediately which decreases the surface temperature of the polymer solution. Because of high humidity percentage in the system, water or other possible humidity sourced molecules coagulate and condense on the polymer surface. With capillary attractive forces and surface convention, the condense drops can create hexagonally ordered arrays. Even after all solvent of polymer solution evaporates, the condense drops stays on the polymer surface. After these drops evaporates from the polymer surface, the ordered patterned porous film is ready. Several types of polymers, like types of polystyrene (PS) block copolymers (polystyrene-block-polyacrylic acid (PS-b-PAA)<sup>10</sup>, polystyrene-b -poly-(ethylene oxide) (PS-b-PBO)<sup>11</sup> etc.), star and branched polymers (star homo PS polymers with 5, 8, and 18 arms using initiators based on glucose, sucrose, and  $\alpha$ -cyclodextrin<sup>12</sup>), some of the linear homo-polymers (PS<sup>13</sup>), biodegradable polymers (poly(3-hydroxybutyrate (PHB)<sup>14</sup>), and some non-

polymeric substances (like gold nanoparticles<sup>15</sup>, carbon nanotubes and graphene<sup>16</sup>, small organic molecules<sup>17</sup> etc.) may be used to ordered porous surface production through breath figure. Morphological control of film pattern is possible with the changing materials - solvents<sup>18</sup>, substrate<sup>19</sup> etc. - and conditions – vapor conditions (like humidity percentage, air flow)<sup>20</sup>, polymer solution concentration<sup>21</sup> etc. - used for preparation process.

Polyurethanes (PUs) fulfills most of the necessary features for biomaterials and biomedical applications, with their high elasticity, strength, resistance to erosion and chemicals, biocompatibility<sup>22</sup>. The first application of PUs dates back to 1960s, which are related to cardiovascular applications<sup>23</sup>. Nowadays, the main use of PU as a cardiovascular biomaterial is the coating of heart and vascular implants like drug eluting stents, pacemaker etc.<sup>24</sup>, tissue adhesives, wound-burn dressings and controlled release systems<sup>25</sup>. Thermoplastic PUs (TPUs) consists of a hard and a soft segment, which are many linear or be branched polymers. Formation mechanism of PUs includes a diisocyanate and a chain extender like diol or diamine as hard segment, where the soft segment is created by a linear and long chain of diol. Thus, PUs are copolymers indiscriminately formed<sup>26</sup>. Different limbs and parts of human body have porous, smooth or co-existing tissues, so cytocompatibility is a key property for a biomaterial. In addition, biomaterials should fulfill the other requirements of a tissue, depending on where and what purpose the biomaterial will be used for. Therefore, biocompatible materials should be porous to be more efficient, permitting the nutrient and cellular transport. Convenient size of porosity makes biomaterials to catch these properties accessibly.

Cardiovascular diseases especially coronary artery disease among males and females are at the top of fatal diseases worldwide.<sup>27,28</sup> Atherosclerosis is a disease characterized by the formation of plaque inside the artery walls, resulting in hardening of artery, narrowing of their internal diameter, and slows down the blood flow therein. Hyperlipidemia is the strong risk factor for the atherosclerotic plaque formation.<sup>29,30</sup> Clinical and pathological investigations have shown a close relationship between high plasma levels of total cholesterol (total-C), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), and apolipoprotein-B (apo-B) and the development of atherosclerotic plaque formation.<sup>31,32</sup> The use of lipid-lowering drugs in the treatment of hyperlipidemia becomes necessary in most cases. The most prominent group of lipid-lowering drugs is statins. Atorvastatin (AT) reversibly inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which has an important role in lipid metabolism, and prevents atherosclerotic plaque formation by lowering plasma levels of total-C, LDL-C, and triglycerides. AT and its metabolites first undergo bile elimination after hepatic metabolism. The mean blood elimination half-life of atorvastatin in humans is 15-30 hours and the inhibition activity half-life is 20-30 hours. AT reaches maximum plasma concentration ( $C_{max}=5,4-23,7$  ng/mL) within 1-2 hours ( $t_{max}$ ) after oral administration at a dose of 10-80 mg.<sup>33,34</sup> To increase the bioavailability of AT, the daily dosage is increased. The side effects such as insomnia, euphoria, nausea, headache, myopathy, myalgia, rhabdomyolysis, acute renal failure, liver damage, and thrombocytopenia have been associated with increased oral dose and blood levels of statins.<sup>33,35-37</sup> Drug carrying and releasing systems are being developed in today's research and technology in order to overcome the drawbacks of low bioavailability of AT.<sup>38-41</sup> Drug release systems may be nanoparticles, nanorods or nanotubes that can circulate freely in blood, as well as body immobilized prosthesis.

In the article, PU films were prepared through BF methodology between 55-80% RH at room conditions to use as biomaterials. To our knowledge, there has not been any reports about the PU porous BF films, and as far as known humidity range has the lowest value that is applied to PU BF films without any additional polymers, nanoparticles etc. or mixing with another methodology. In this study, two of the parameters that have influence on morphological change, relative humidity percentage of closed system and exposure time, were examined. Atorvastatin as a lipid lowering drug was loaded to the PU films, and their drug release rate was examined.

## EXPERIMENTAL PART

### Materials and Methods

Medical grade thermoplastic polyurethane was purchased from Lubrizol, USA. The polymer was dissolved in chloroform (Sigma-Aldrich, USA), at 5% w/w ratio, and centrifuged at 3000 rpm for 15 min for the removal of the additives and colorings. The solution stored at room conditions (25°C degree and 1 atm), and necessary concentrations was prepared from the stock solution through dilution. With the use of glass syringe, porous films were obtained on glass slides. Distilled water used as humidity source. Atorvastatin (Sigma-Aldrich, USA) was used as model drug.



### **Fabrication of Porous Films**

The PU films were produced under closed system conditions, and the polymer solution prepared at desired concentration through direct usage or dilution of centrifuged polymer solution casted on glass substrate, when the relative humidity reaches to requested level between 55-80% at room temperature. Because of the static BF method chosen, exposure time should be waited without any interrupt after casting approximately 100  $\mu$ l of PU solution on the substrate. At the end of the humidity exposure time all chloroform had already evaporated and the ordered porous film was produced.

### **Characterization of the films**

Morphological controls of fabricated films were characterized through an inverted microscopy (Nikon Eclipse Ti2, Japan) and a scanning electron microscopy (SEM) (NanoSEM FEI, USA). The samples for SEM analysis were coated with gold. Contact angle (CA) was carried out with sessile drop method (Biolin Scientific, Attenson Theta, ABD).

### **Cell Culture and Cytotoxicity**

The cytotoxicity of the porous TPU film were evaluated by MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay on HUVECs. To begin, HUVEC line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. The cells were harvested after reaching confluency. All medium was removed and cells were trypsinized with 0.25% trypsin/EDTA solution. Then, the cells were collected with centrifugation at 3000 rpm for 3 min and suspended in DMEM with FBS. The cells were seeded at a density of 3x10<sup>5</sup> cells/well in a 24-well plate and incubated for 24 h. To prepare the sample extract, disc-shaped specimens were prepared under aseptic conditions incubated at 37 °C for 72 hours in serum-free DMEM. Following cell adhesion, the cells were washed twice in PBS and fresh media were replaced. The sample extracts were inoculated with the cells and incubated for 24 h under 5% CO<sub>2</sub>-95% air atmosphere at 37 °C. After incubation, the extract containing medium was removed and MTT solution (5 mg/ml) was added to each well and incubated for another 4 h in the dark at 37 °C. The medium was aspirated and replaced with 0,04M isopropanol-HCl (hydrochloric acid) to dissolve the formazan salt formed. The color intensity was measured at 570 nm using a microplate reader, and the percentage viability was calculated.

### **Water Uptake**

In order to characterize the water uptake capacity of porous PU films, the pre-weighed PU films were incubated in swelling medium (PBS, pH 7.4) for 20 hours at 37 °C. At pre-determined time intervals, the films were removed from the PBS solution, gently blotted to remove the excess medium from the surface, and weighed again. The water uptake % of PU films was calculated using the following equation in which W<sub>w</sub> indicates the weight of swollen PU films and W<sub>D</sub> is the weight of dry films before water uptake.

$$WU \% = ((W_w - W_D) / W_D) \times 100$$

### **Drug Loading**

To characterize *in vitro* drug entrapment and release behavior of PU films, atorvastatin calcium (AC) as a model drug was loaded in the porous PU matrix. For this purpose, AC was dissolved in PU-chloroform stock solution at concentration of 2 mg.ml<sup>-1</sup> and then the solution was casted on glass substrate at desired conditions. Thus, the drug molecules were trapped in the bulk structure when the film was formed.

The mini-1240 UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was used to quantify the concentration of entrapped and released AC. To calculate the drug entrapment efficiency (%EE) and loading capacity (%LC) of PU films, AC loaded PU films were washed in 5 mL PBS buffer for 0.5 min to remove untrapped drug molecules from the film surface. The absorbance of the wash water was detected UV-vis spectrophotometrically at 242 nm and convert to AC concentration using equation of calibration curve (R<sup>2</sup>=0,998). %EE and %LC was calculated as follows:

$$\%EE = \frac{\text{the drug entrapped in film}}{\text{total added drug}} \times 100$$

$$\%LC = \frac{\text{the drug entrapped in film}}{\text{total weight of film}} \times 100$$

### ***In vitro* Drug Release Studies**

To determine the *in vitro* drug release behavior of films, washed films were incubated in glass vials containing 5 mL of PBS in a shaking water bath (85 rpm) at 37 °C for 14 days. The absorbance of the incubation solution at 242 nm was measured and recorded at predetermined time intervals.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological Evaluation of Films

100  $\mu$ l of PU (5% w/v) solution was casted on a glass substrate to prepare porous film between 55-80% relative humidity and different exposure times, at 25°C. Figure 1 shows the morphological changes caused by two influencing feature, relative humidity and exposure time, when the concentration of polymer solution and temperature kept constant.

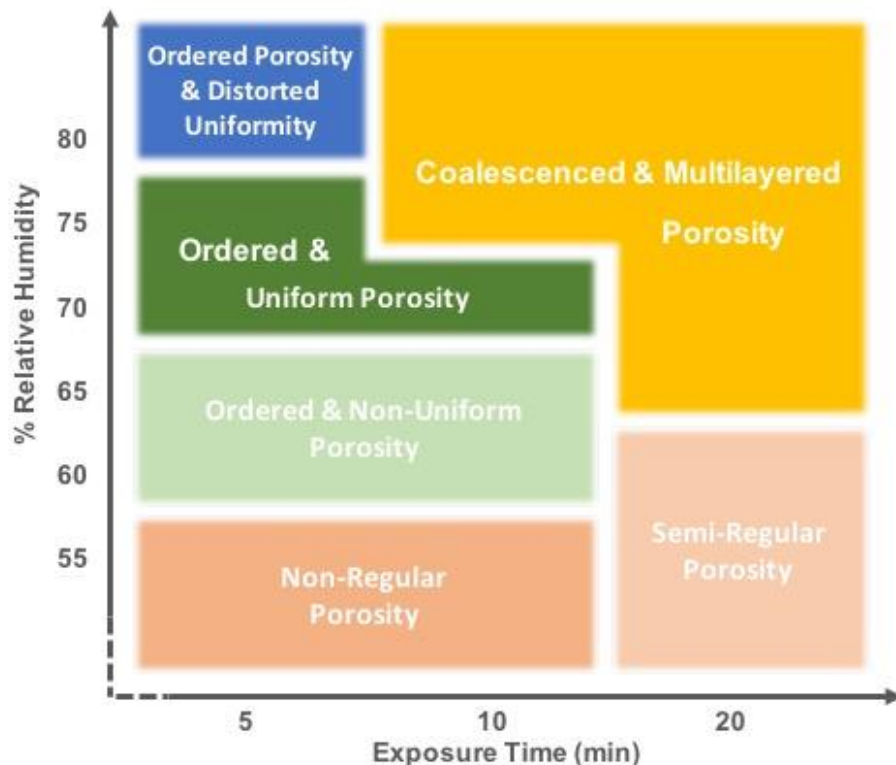


Figure1. Morphological changes influenced by RH% and exposure time

The relative humidity was studied widely to optimize the finest possible porous structure. Previously, it is known as under 58% relative humidity, ordered structure of pores cannot be observed in the BF application of polyvinyl chloride (PVC)<sup>42</sup>, so the lower limit was chosen accordingly. Also, the exposure time is another aspect, affecting the self-assembling process, and in order to evaluate the exposure time, the duration was tested between 5 and 20 minutes. The regularity of porosity of the samples produced in 55% relative humidity was found possible with sufficient exposure time, when the process lasted longer than 10 min. The samples of the same relative humidity % were observed with disordered porosity for 5 and 10 min exposure time, yet the 20 min samples displayed regularly settled pores. It is concluded that as the exposure time increased during the evaporation of chloroform from the polymer solution surface, more water droplets at the system atmosphere found chance to settle onto the polymer surface and coalesced afterwards. Despite of the increasing consistency in pore size at 55% relative humidity with increasing exposure time, planar arrangement of films disrupted at elevated humidity since the water droplets on the atmosphere of closed system interacted with water condensed on the polymer surface more intensely. Thus, coalescence of water droplets occurs and surface structure corrupted.

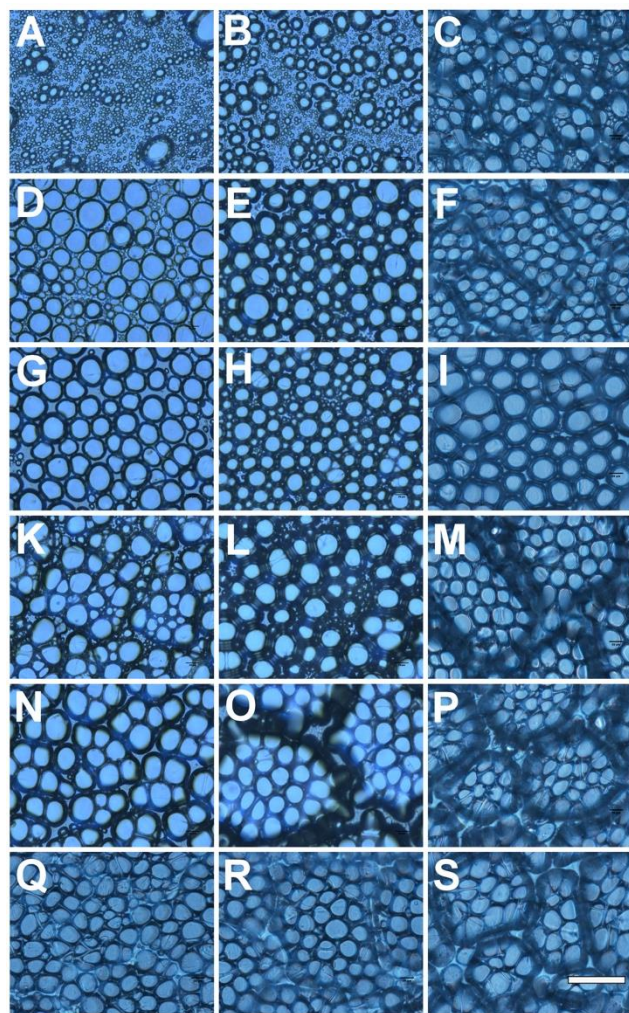


Figure 2: Optical microscope images of the films produced at 55% RH (A-C), 60% RH (D-F), 65% RH (G-I), 70% RH (K-M), 75% RH (N-P), and 80% RH (Q-S) for 5, 10 and 20 min respectively; X40 (Scales of all photos are identical and the bar equals to 80  $\mu\text{m}$ ).

The optical microscope images (Figure 2) show that when the exposure time increased the volume of water droplets on the non-dried polymer solution surface increases and then water droplets submerge more in non-dried polymer solution. Thus, after evaporation of first solvent in polymer solution and then water droplets from the surfaces, the distance among pores looks like increased yet the reason is submerging of the droplets. The submerging depends on the volume increase of water droplets, and increasing of water droplets bases on the exposure time. Also, there are several factors that have influence on the droplet growth like droplet density in the atmosphere of system, temperature of surface etc.<sup>43</sup>. In addition, the narrowest pore distribution for each RH% value was seen at 10 min sample series among the 5 and 20 min ones, even with the increase of humidity ratio except 55% RH. On the basis of information collected from Figure 2, it is deduced that the most efficient parameters for the narrowest pore size distribution were found as 75% relative humidity and 10 minutes of exposure time. With the guidance of these parameters, SEM analysis was carried out.

#### **Effect of Relative Humidity and Exposure Time on Pore Size**

Pore sizes were calculated from SEM photos of samples through ImageJ software (provided by National Institutes of Health) Figure 3A, shows the relationship between the pore diameter and humidity when the exposure time was kept 5, 10 and 20 min separately. For 5 min exposure time the mean diameters of pores increase with increasing RH%, yet the trend changes at 80% RH. Even there is a trend between 55 and 65%, pore sizes were found not to be affected after 65% of RH, ranging between 23 to 26  $\mu\text{m}$  accordingly, so it can be said that there is a stabilization effect after 65% RH. There was a catastrophic rise of pore sizes from 55 to 60% RH, because no regular porous structure examined for 55% RH among the samples.

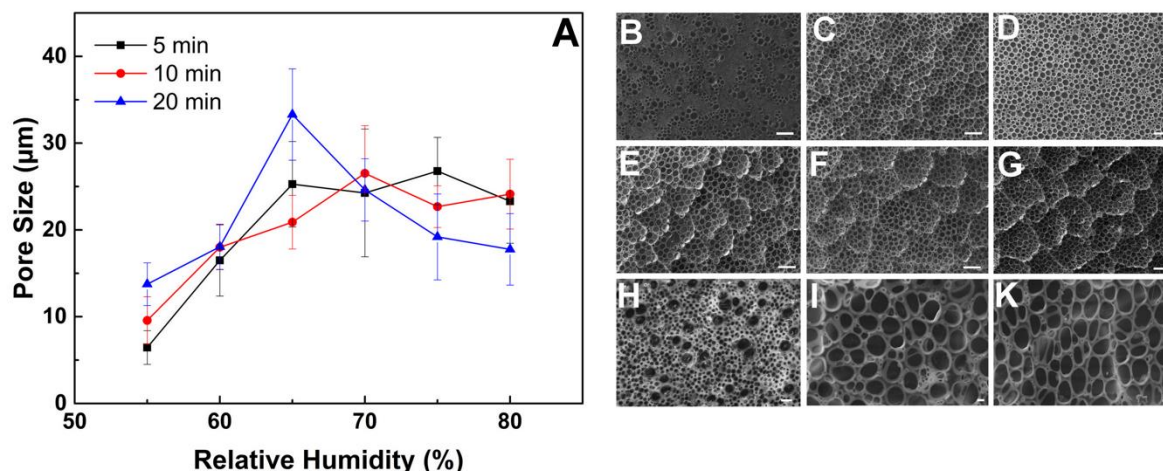


Figure 3: RH vs. Pore Size graph (A); the effect of RH on surface morphology samples prepared at 10 min and room temperature 55% RH (B), 60% RH (C), 65% RH (D), 70% RH (E), 75% RH (F), and 80% RH (G); the effect of exposure time on surface morphology samples prepared at 75% RH and room temperature 5 min (H), 10 min (I), and 20 min (K); Scales bars show 100µm for B-G and 10 µm for H-K.

In Figure 3A of 10 min data, there is a straight pore size increase with the increase of RH till 70% and the average pore size of samples at 70% RH is approximately 26 µm, which is also the biggest pore diameter for 10 min exposure time. The pore diameter average values after 70% RH have decreasing trend compared to the result of 70% RH. However, when the 75% and 80% RH results are compared, there is slightly increase 75 to 80 % RH, average pore diameters are 23 µm and 24 µm respectively.

The most stable relation between mean diameter and RH among the samples was detected for 20 minutes' samples, as seen in Figure 3A of 20 min data. There is a continuous increase in pore size up to 65% RH and a continuous decrease from this point, yet the decrease did not as high as the increase since there was a huge difference between 60% and 65% RH values, which were 18 and 33 µm, respectively. However, both increase and decrease have exponential rate.

The overall evaluation of the results also construed that increasing relative humidity value caused an interesting singularity. Regular settlement of pores kept, yet there was a look of bigger water drop settlement on the top of smaller ones without leading disruption of pore regularity at high RH%, which can be seen clearly in figure 3(B-G). There are two types of possible condensation of water on the surface either dropwise or filmwise. The reason of formation filmwise condensation is the adhesion forces between water droplets<sup>43</sup>, which might be the cause of it. It was observed bigger in size, when RH value and the exposure time increased, since water droplets found at system atmosphere were higher in quantity.

For the examination of the effect of exposure time on porous film formation, RH % was kept constant (Figure 3A). If RH was kept constant at 55%, there is a straight increase seen for pore sizes with the increase of exposure time. However, as it was mentioned before, a consistent porosity did not observe at 55% RH and 5 and 10 minutes (min) of exposure time. Even though there is a pore size increase observed slightly at 60% RH, pore settlement did not uniform so perfect honeycomb structure was not reached. The highest pore size values were calculated at 65% RH among all other RH, and there is an opposite exposure time relation that the other RH values have. In the graph, there is a waving trend of pore sizes for 65 and 70% RH, however the rest of the RH values at the figure, 75 and 80%, a decreasing or stabilizing trend, which correlates with the previous outcome from relative humidity parameter graphs, was observed. As seen in graph at 70%, RH the change of pore size with the change of exposure time is the smallest, almost like no change, among the other RH values. Even it seems like the most stable value is 70 % and the pore diameter values are 24 µm for 5 mins, 26µm for 10 mins, and 24µm, the uniformity of surface produced at 70% RH was not provided. There is a straight decrease of pore size values observed with the increase of exposure time at 75% RH. Even though there is a decrease seen at pore sizes, the shapes of pores are distorted with increase of exposure time as it is mentioned above. This distortion effect can also be seen in the figure 3(H-

K). 20 mins' pore size value is 18  $\mu\text{m}$ , which is lower than the pore size values of 5 and 10 mins are close to each other.

### Hydrophobic Properties of Fabricated Films

PU can have either hydrophilic or hydrophobic properties depended on which type of soft and hard segments are used during synthesise of PU.<sup>44,45</sup> Because of the commercial thermoplastic PU was used in the study, the hard and soft segment could not be known, the CA value was not known. CA analysis of non-porous films were initially carried out to know whether the polymer is hydrophobic or hydrophilic. The polymer solutions with various concentrations ranged between 1, 2 and 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  were used to prepare both non-porous and porous films. There is no significant difference between the CA values of non-porous films of the concentrations, which are 88,61°, 91,22° and 91,58° respectively (Figure 4). CA results of porous films with increasing polymer concentration shows at least 20° difference with respect to CA result of non-porous film at same polymer concentration and the difference increases with increasing polymer concentration. As mentioned above surface uniformity increases with the upsurge of polymer concentration so the porosity of film surface enhances. The enhancement of porosity causes rise of hydrophobicity property of surface.<sup>46</sup>

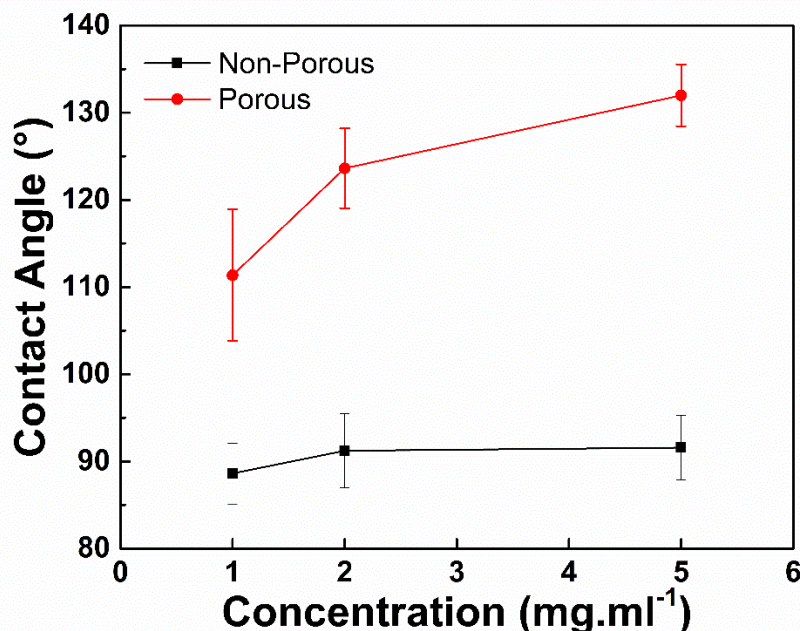


Figure 4: Polymer Concentration vs. Contact Angle Graph

To understand how RH % effective on CA values of fabricated porous PU films by BF exposure times (5,10 and 20 mins) examined separately (Figure 5). As mentioned before uniform and homogenous porosity could not be achieved at the 5 and 10 mins samples of 55% RH. The CA of 5 and 10 mins of 55% BF films are calculated as 109,33° and 118,90° and shows rise compared to control samples, prepared without humidity. When the CA of films fabricated at 5 mins examined, the CA increases from 109° to 132° till 75% RH. Up to this RH % value porosity and uniformity of these pores were increased so the idea of hydrophobicity of the PU films increases with the rise of RH % is inferred. However, this rising trend was not be observed among the 10 and 20 mins samples because of the double layer formation at higher exposure time and higher RH % (Figure 5). The CA of 75% and 80% of RH shows decrease among their 10 and 20 mins of sample groups which are emphasized with red and blue respectively.

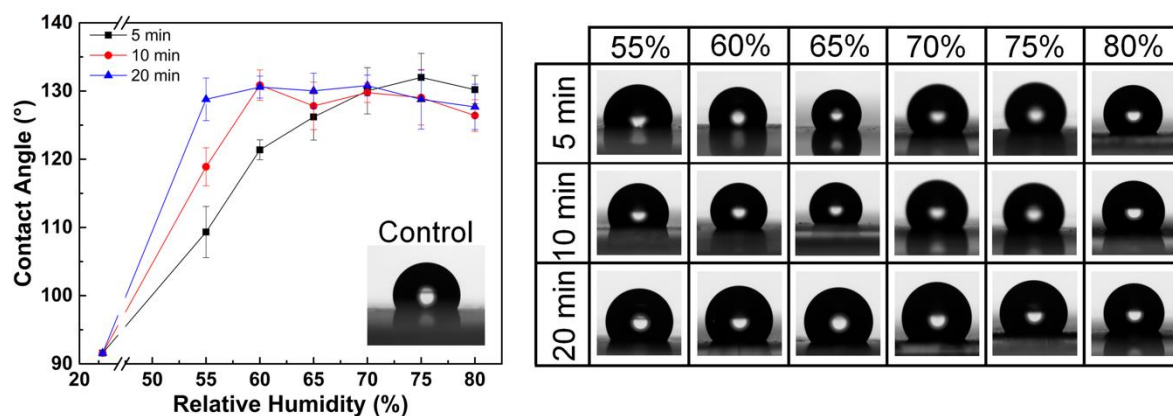


Figure 5: RH % vs. Contact Angle Graph (As a control of experiments non-porous PU film is used)

To understand the effect of exposure time, the RH % was kept constant and the change of the CA examined. As the surface porosity and uniformity go up the CAs of 55% RH 5, 10 and 20 mins increase so porosity increases the hydrophobic property of a surface rises because of surface free energy is decreases through uniform porosity.<sup>47</sup> Even though the samples exhibit similar CAs, 130,04°, 129,77° and 130,80° for 5, 10 and 20 mins of exposure time, respectively; morphologically the uniform and homogenous porosity amongst them was not be achieved. The decrease observed at the CAs of 5, 10 and 20 mins of 75% and 80% RH separately, and the reason of this phenomenon is thought as the double layer of porosity.

#### Cytotoxicity

Tests carried out with the samples fabricated at conditions decided as the superlative. As seen on Figure 6 the films prepared in 5 min increase in the ratio of 20% the cell proliferation. The films prepared in 10 mins and 20 mins enhances the cell proliferation by 40% and 60%, respectively. Namely, there is no toxic effect was obtained from the films and even improves the cell viability %.

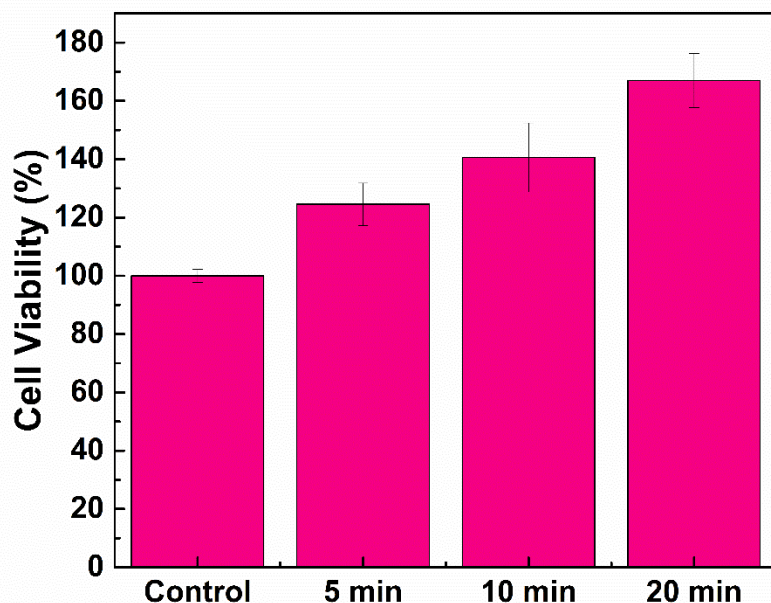


Figure 6: Cell Viability graph of the films prepared at 75% RH (n=6)

#### Water uptake

The swelling behavior of the drug-carrying polymer plays an important role in drug release studies because there is a linear relationship between the water uptake capacity (WUC) of polymer matrix and drug diffusion to the outside. According to the results of swelling experiments, films produced in 55-80% relative humidity for 10 min exhibited WUC 70%, 56%, 75%, 50%, 162%, and 114% of their dry weights, respectively (Figure 7A). Films produced in 75% relative humidity for 5, 10, and 20 min exhibited WUC 148%, 162%, and 114.4% of their dry weights, respectively (Figure 7B). It is thought that WUCs of films are directly proportional to the total volume of

the pores in the polymer matrix. It is notable that the WUCs of films increase with the increase the number, regularity, diameter of pores and number of layers.

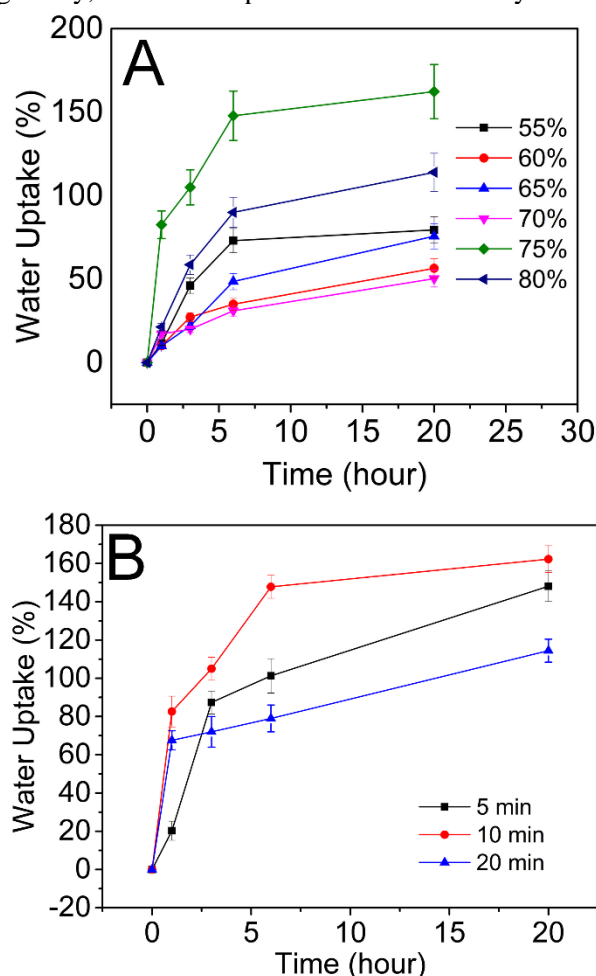


Figure 7: Water uptake capacity of films produced in various relative humidity (A) and for various exposure time (B) (n=3).

### Drug Loading Studies

The drug loading characteristics of films fabricated in different humidity and for different exposure time are given in Table 1. According to the results, the films have high entrapment efficiency among 93-97%. On the other hand, films can trap up to 16% of their weight. These high EE% and LC% confirm that PU films produced via BF method are strong candidates as drug delivery agents.

Table 1: Effect of relative humidity and exposure time on the entrapment efficiency and loading capacity of PU films (values represent mean±standard deviation, n=3).

Relative humidity (%)	Exposure time (min)	%EE	%LC
%55	10	97.0±0.8	16.2±0.2
%60		98.7±2.0	16.5±0.4
%65		96.4±1.9	16.2±0.4
%70		97.2±0.8	16.3±0.2
%75	5	94.4±4.0	15.9±0.8
	10	95.4±0.9	16.0±0.2
	20	93.4±0.4	15.7±0.1
%80	10	99.1±2.6	16.5±0.5

### ***In vitro* Drug Release Studies**

Drug release rates of AC loaded porous PU films fabricated in different humidity and for different exposure times recorded at 37 °C and pH 7.4, which are simulated the physiological conditions, for 14 days are given in Figures 8 A and B, respectively. Accordingly, the model drug was released from PU films for several weeks. The release from PU films is in two phases. The first phase is a rapid release profile namely burst effect lasts for about 5-6 hours and in which 40-50% of drug was released, which has first-order kinetic. The second phase is the slow release profile namely sustained drug release that continues for several weeks, which has zero-order kinetic.

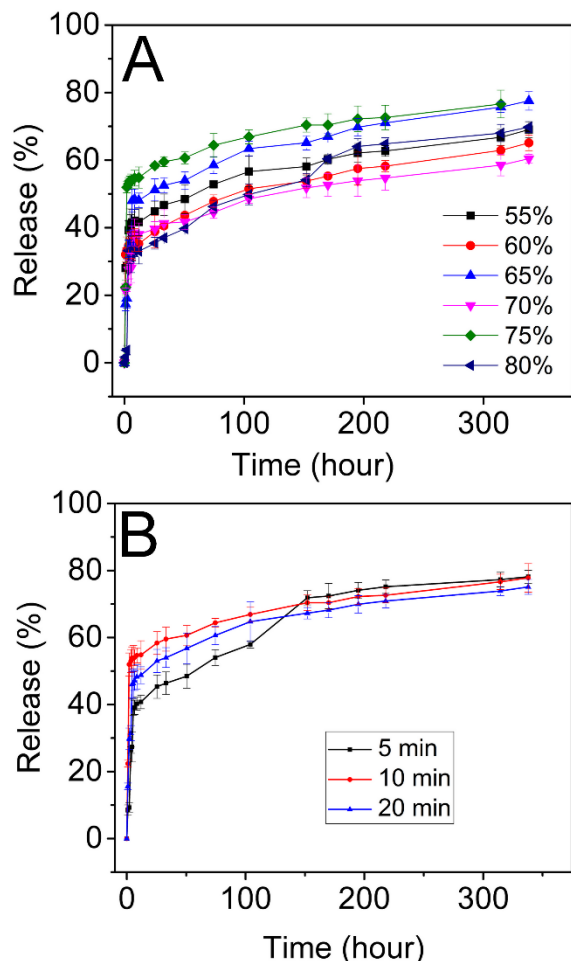


Figure 8: Drug release vs. Time graph.

The film fabricated in 55, 60, 65, 70, 75, and 80% humidity for 10 min exposure time, released 69% ( $1.34 \pm 0.08 \mu\text{g}$ ), %65 ( $1.28 \pm 0.04 \mu\text{g}$ ), %77.5 ( $1.5 \pm 0.02 \mu\text{g}$ ), %60.4 ( $1.17 \pm 0.05 \mu\text{g}$ ), %78.3 ( $1.5 \pm 0.06 \mu\text{g}$ ), and %69.7 ( $1.38 \pm 0.07 \mu\text{g}$ ) of the drug trapped within two weeks, respectively. The films fabricated in 75% humidity for 5, 10, and 20 min exposure time released approximately %78 ( $1.47 \pm 0.04 \mu\text{g}$ ), %77.8 ( $1.48 \pm 0.08 \mu\text{g}$ ), and %76.7 ( $1.43 \pm 0.04 \mu\text{g}$ ) of drug within two weeks, respectively. These results can be explained by the increase of space volume and surface area of the films depends on the rise of number, diameter, and layering of pores within. With increased space volume, more water penetrates into the film and the increase in surface area allows more drugs to be diffused. Drug release rates of films are associated with their water uptake capacity from swelling experiments. Daily release of AC from PU films were calculated as 31.8-47.1 ng/mL and the maximum plasma concentration of AC was reported as 5.4-23.7 ng/mL.<sup>33</sup> Polymer-drug, drug-drug, water-polymer and water-drug interactions are most important factors among drug release trends.<sup>48</sup> The slow release of AC from PU films can be attributed to non-biodegradable nature of PU films and the hydrophobic nature of PU and AC that prevents water penetration, drug dissolution, and polymer degradation.<sup>25,49</sup> Drug release from non-degradable polymers, which are characterized by tissue and blood compatibility, mechanically and chemically robust, and long-term use possibilities, is often diffusion controlled.<sup>50</sup>



## CONCLUSION

In this paper, surface topography of polyurethane films was altered with breath figure forming approach, which has been assisted for the production of porous films with various polymer structures. This feature has been rarely applied to polyurethane and derivatives, which have a broad usage as biomedical materials since the porous surface and structures are essential for biomaterial studies. Porous membranes with precise dimensions obtained by BFA are possible candidates for the templates for isolated cell culture studies, directing them to adhere individually onto the culture flasks and they can be easily peeled off. Our cytotoxicity tests showed that there was not any harmful chemical leech from the obtained material. In addition to that, structures that will provide 3D culture environment can also be obtained with breath figures, apart from 2D porous membrane. These types of porous scaffolds can easily be obtained at high RH% values as previously stated in the discussion section. The sole use of water as pore generators in the synthesis of porous tissue scaffolds with interpenetrating networks will also bring another added value, without introducing any wash-step required component. Porous PU structures can also be a promising candidate for the long-lasting drug releasing membranes for cardiovascular applications since the release rate was found to be close to zero order kinetics after the burst release. Additionally, porous membranes of polyurethane can be used as an alternative for skin dressings to be used after surgical incisions, lacerations or superficial abrasions when both elasticity and air permeability required.

## References

1. Uraki Y, Nemoto J, Otsuka H, et al. Honeycomb-like architecture produced by living bacteria, *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydr Polym*. 2007;69(1):1-6. doi:10.1016/j.carbpol.2006.08.021.
2. Ishii D, Yabu H, Shimomura M. Selective metal deposition in hydrophobic porous cavities of self-organized honeycomb-patterned polymer films by all-wet electroless plating. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2008;313-314:590-594. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.04.170.
3. Cong H, Wang J, Yu B, Tang J. Preparation of a highly permeable ordered porous microfiltration membrane of brominated poly(phenylene oxide) on an ice substrate by the breath figure method. *Soft Matter*. 2012;8(34):8835. doi:10.1039/c2sm25706h.
4. Ghannam L, Garay H, François J, Billon L. New polymeric materials with interferential optical properties. In: *Macromolecular Chemistry and Physics*. Vol 208. ; 2007:1469-1479. doi:10.1002/macp.200700069.
5. Tsai H, Xu Z, Pai RK, et al. Structural dynamics and charge transfer via complexation with fullerene in large area conjugated polymer honeycomb thin films. *Chem Mater*. 2011;23(3):759-761. doi:10.1021/cm102160m.
6. Zhang Y, Wang C. Micropatterning of proteins on 3D porous polymer films fabricated by using the breath-figure method. *Adv Mater*. 2007;19(7):913-916. doi:10.1002/adma.200601169.
7. Chen S, Lu X, Huang Z, Lu Q. In situ growth of a polyphosphazene nanoparticle coating on a honeycomb surface: facile formation of hierarchical structures for bioapplication †. *Chem Commun*. 2015;51:5698-5701. doi:10.1039/C4CC10379C.
8. Li XY, Zhao QL, Xu TT, Huang J, Wei LH, Ma Z. Highly ordered microporous polystyrene-b-poly(acrylic acid) films: Study on the influencing factors in their fabrication via a static breath-figure method. *Eur Polym J*. 2014;50(1):135-141. doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.10.017.
9. Widawski G, Rawiso M, François B. Self-organized honeycomb morphology of star-polymer polystyrene films. *Nature*. 1994;369(6479):387-389. doi:10.1038/369387a0.
10. Li L, Chen C, Zhang A, et al. Fabrication of robust honeycomb polymer films: A facile photochemical cross-linking process. *J Colloid Interface Sci*. 2009;331(2):446-452. doi:10.1016/j.jcis.2008.11.053.

11. Takekoh R, Russell TP. Multi-length scale porous polymers. *Adv Funct Mater.* 2014;24(10):1483-1489. doi:10.1002/adfm.201301693.
12. Stenzel MH, Davis TP, Fane AG. Honeycomb structured porous films prepared from carbohydrate based polymers synthesized via the RAFT process. *J Mater Chem.* 2003;13(9):2090. doi:10.1039/b304204a.
13. Limaye a., Narhe R, Dhote a., Ogale S. Evidence for Convective Effects in Breath Figure Formation on Volatile Fluid Surfaces. *Phys Rev Lett.* 1996;76(20):3762-3765. doi:10.1103/PhysRevLett.76.3762.
14. Huh M, Jung MH, Park YS, et al. Fabrication of honeycomb-structured porous films from poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) via the breath figures method. *Polym Eng Sci.* 2012;52(4):920-926. doi:10.1002/pen.22161.
15. Saunders AE, Shah PS, Sigman MB, et al. Inverse opal nanocrystal superlattice films. *Nano Lett.* 2004;4(10):1943-1948. doi:10.1021/nl048846e.
16. Takamori H, Fujigaya T, Yamaguchi Y, Nakashima N. Simple preparation of self-organized single-walled carbon nanotubes with honeycomb structures. *Adv Mater.* 2007;19(18):2535-2539. doi:10.1002/adma.200602704.
17. Karthaus O, Cieren X, Maruyama N, Shimomura M. Mesoscopic 2-D ordering of inorganic/organic hybrid materials. *Mater Sci Eng C.* 1999;10(1-2):103-106. doi:10.1016/S0928-4931(99)00108-3.
18. Sharma V, Song L, Jones RL, Barrow MS, Williams PR, Srinivasarao M. Effect of solvent choice on breath-figure-templated assembly of "holey" polymer films. *EPL (Europhysics Lett.)* 2010;91(3):38001. doi:10.1209/0295-5075/91/38001.
19. Wan L-S, Zhu L-W, Ou Y, Xu Z-K. Multiple interfaces in self-assembled breath figures. *Chem Commun (Cambridge, U K).* 2014;50:4024-4039. doi:10.1039/c3cc49826c.
20. Zhao B, Zhang J, Wang X, Li C. Water-assisted fabrication of honeycomb structure porous film from poly(l-lactide). *J Mater Chem.* 2006;16(5):509-513. doi:10.1039/B512398D.
21. Servoli E, Ruffo GA, Migliaresi C. Interplay of kinetics and interfacial interactions in breath figure templating - A phenomenological interpretation. *Polymer (Guildf).* 2010;51(11):2337-2344. doi:10.1016/j.polymer.2010.03.039.
22. Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials.* 2005;26(35):7457-7470. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.079.
23. Gunatillake P, Adhikari R. *Biodegradable Polyurethanes: Design, Synthesis, Properties and Potential Applications.*; 2011.
24. Seo E, Na K. Polyurethane membrane with porous surface for controlled drug release in drug eluting stent. *Biomater Res.* 2014;18(1):15. doi:10.1186/2055-7124-18-15.
25. Kang SG, Lee SC, Choi SH, et al. Paclitaxel-polyurethane film for anti-cancer drug delivery: Film characterization and preliminary in vivo study. *Macromol Res.* 2010;18(7):680-685. doi:10.1007/s13233-010-0715-6.
26. Qi HJ, Boyce MC. Stress-strain behavior of thermoplastic polyurethanes. *Mech Mater.* 2005;37(8):817-839. doi:10.1016/j.mechmat.2004.08.001.

27. Stewart J, Manmathan G, Wilkinson P. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2017;6:204800401668721. doi:10.1177/2048004016687211.
28. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart Disease and Stroke Statistics'2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135(10):e146-e603. doi:10.1161/CIR.0000000000000485.
29. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care.* 2013;40(1):195-211. doi:10.1016/j.pop.2012.11.003.
30. Kerenyi L, Mihalka L, Csiba L, Bacso H, Bereczki D. Role of Hyperlipidemia in Atherosclerotic Plaque Formation in the Internal Carotid Artery. *JCU.* 2006;34(6):283-288. doi:10.1002/jcu.20233.
31. Heinonen TM, Stein E, Weiss SR, et al. The lipid-lowering effects of atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor: Results of a randomized, double-masked study. *Clin Ther.* 1996;18(5):853-863. doi:10.1016/S0149-2918(96)80045-2.
32. Li Z, Tao W, Zhang D, et al. The studies of PLGA nanoparticles loading atorvastatin calcium for oral administration in vitro and in vivo. *Asian J Pharm Sci.* 2017;12(3):285-291. doi:10.1016/j.ajps.2016.08.006.
33. Chou YC, Wang YK, Charng MJ, Ueng YF. Determination of serum atorvastatin concentrations in lipid-controlling patients with and without myalgia syndrome. *J Food Drug Anal.* 2013;21(2):147-153. doi:10.1016/j.jfda.2013.05.003.
34. Lennernäs H. Clinical Pharmacokinetics of Atorvastatin. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(13):1141-1160. doi:10.2165/00003088-200342130-00005.
35. Ahn P, Min H-J, Park S-H, et al. Rhabdomyolysis and acute kidney injury associated with hypothyroidism and statin therapy. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea).* 2013;28(4):331-334. doi:10.3803/EnM.2013.28.4.331.
36. Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2008;8(6):373-418. doi:10.2165/0129784-200808060-00004.
37. Kidney A, Dragos D, Pruteanu D, Constantin R. SM Gr up SM Journal of Nephrology and Kidney Diseases High-Dose Statin Associated with Thrombocytopenia. *SM J Nephrol Kidney Dis.* 2017;1(1):1-7.
38. Anwar M, Warsi MH, Mallick N, et al. Enhanced bioavailability of nano-sized chitosan-atorvastatin conjugate after oral administration to rats. *Eur J Pharm Sci.* 2011;44(3):241-249. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.001.
39. Khan F, Islam MS, Roni MA, Jalil RU. Systematic development of self-emulsifying drug delivery systems of atorvastatin with improved bioavailability potential. *Sci Pharm.* 2012;80(4):1027-1043. doi:10.3797/scipharm.1201-06.
40. Sripriyalakshmi S, Anjali CH, George Priya Doss C, Rajith B, Ravindran A. BSA nanoparticle loaded atorvastatin calcium - A new facet for an old drug. *PLoS One.* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0086317.
41. Tian Q, Ding F, Guo L, Wang J, Wu F, Yu Y. Targeted solid lipid nanoparticles with peptide ligand for oral delivery of atorvastatin calcium. *RSC Adv.* 2016;6(42):35901-35909. doi:10.1039/C6RA02371A.

42. Liu CX, Lang WZ, Shi B Bin, Guo YJ. Fabrication of ordered honeycomb porous polyvinyl chloride (PVC) films by breath figures method. *Mater Lett*. 2013;107:53-55. doi:10.1016/j.matlet.2013.05.114.
43. Anand S, Rykaczewski K, Subramanyam SB, Beysens D, Varanasi KK. How droplets nucleate and grow on liquids and liquid impregnated surfaces. *Soft Matter*. 2015;11(1):69-80. doi:10.1039/C4SM01424C.
44. Gorna K, Gogolewski S. In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on  $\epsilon$ -caprolactone and Pluronic® with various hydrophilicities. *Polym Degrad Stab*. 2002;75(1):113-122. doi:10.1016/S0141-3910(01)00210-5.
45. Gogolewski S, Gorna K. Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;80(1):94-101. doi:10.1002/jbm.a.30834.
46. Hwangbo K-H, Kim MR, Lee C-S, Cho KY. Facile fabrication of uniform golf-ball-shaped microparticles from various polymers. *Soft Matter*. 2011;7(22):10874. doi:10.1039/c1sm06529g.
47. Pulat M, Senvar C. Structural and surface properties of polyurethane membranes of different porosities. *Polym Test*. 1995;14(2):115-120. doi:10.1016/0142-9418(95)93191-3.
48. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *Int J Pharm*. 2011;415(1-2):34-52. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.
49. Elkharraz K, Faisant N, Guse C, et al. Paclitaxel-loaded microparticles and implants for the treatment of brain cancer: Preparation and physicochemical characterization. *Int J Pharm*. 2006;314(2):127-136. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.07.028.
50. Ebewele RO. Polymer Science and Technology. *Polym Sci Technol*. 2000;483. doi:10.1016/0025-5416(85)90434-3.

## Synthesis, characterization, electronic and nonlinear optical properties of new schiff base of sulfamethoxazole and its Pd(II) complex

Saliha Alyar<sup>1\*</sup>, Hamit Alyar<sup>2</sup>, Ümmühan Özdemir Özmen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Çankırı, Turkey.

<sup>2</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Physics, Çankırı, Turkey.

<sup>3</sup>Gazi University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Ankara, Turkey.

\* Corresponding author e-mail: saliha@karatekin.edu.tr

### Abstract

New Schiff base 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde sulfamethoxazole (**5MS-S1**), and its Pd (II) complex was synthesized for the first time. The synthesized compounds were characterized by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC-MS, magnetic susceptibility, conductivity measurements. The complex having general composition of [ML<sub>2</sub>] was found. The results of elemental analysis showed 1:2 (metal/ligand) stoichiometry for the complex. Magnetic and spectral data indicate a square planar geometry for Pd (II) complex. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C shielding tensors for **5MS-S1** were calculated with GIAO/DFT/B3LYP/6-311++ G(d,p) methods in DMSO. The nonlinear optical (NLO) properties and frontier molecular orbitals have been investigated by B3LYP/6-311++ G(d,p) and B3LYP/LanL2DZ level of theory.

**Keywords:** Sulfametoksazol, NLO, Pd(II), DFT

### 1. INTRODUCTION

Sulfonamides are one of the first antibiotics discovered against various diseases (Domagk, 1935). In 1908, P. Gelmo, a German chemist, built the first sulphanilamide. Until the 1930s, however, the true value of the drug was not fully understood. Gerhard Domagk, a German biochemist at this time, discovered that the drug streptococcal bacillus was very effective against blood poisoning caused by it. From that day on, medication has been developed, and many new variants have made. Later, thousands of more effective and less toxic molecules containing sulfonamide structure have been formed. Sulfa medicines are still widely used for the treatment of a variety of diseases such as acne and urinary tract infections, and they are attracting much attention to the treatment of infections caused by other antibiotic-resistant bacteria. At present, some metal sulphonamides are of great interest since complexes are more effective than ligands. Antibacterial (Chohan et al., 2010), antitumor (Owa et al., 2000), diuretic (Boyd, 1988), anti-carbonic anhydrase (Supuran et al., 2008), hypoglycaemic (Thorner, 1979) of various sulphonamide metal complexes have been reported. In our previous studies, we synthesized different sulfonamides and tested their antimicrobial activity (Alyar et al., 2013). Spectroscopic properties and conformation analysis of methanesulfonic acid 1-methylhydrazide (Özbek et al., 2009) and some methanesulfonylhydrazone derivatives were also studied (Gündüzalp et al., 2014). In addition, different aromatic/heteroaromatic sulfonylhydrazone derivatives and their transition metal complexes have been investigated for their inhibitory effects on carbonic anhydrase II (hCA II) isoenzyme (Alyar and Adem, 2014).

In the present study, New Schiff base (2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde sulfamethoxazole (**5MS-S1**) and its **Pd(5MS-S1)<sub>2</sub>** complex have been synthesized. Synthesized compounds have been characterized by using elemental analyses, spectrometric methods (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR, FT-IR and LC-MS) magnetic susceptibility, conductivity measurements. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR calculations for **5MS-S1** performed with GIAO/DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) methods in DMSO. The nonlinear optical (NLO) activity and frontier molecular orbitals (FMOs) have been investigated by B3LYP/6-311++G(d,p) and B3LYP/LanL2DZ level of theory.

## 2. MATERIALS AND METHODS

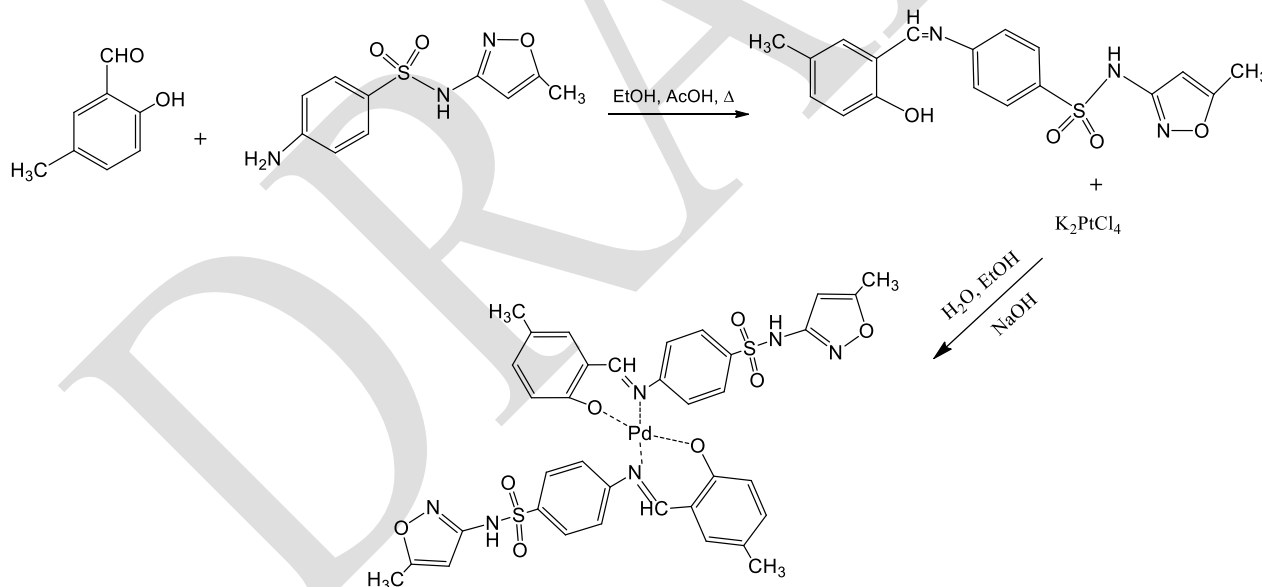
General synthesis method of the Schiff base and its complex were depicted schematically in **Fig. 1**.

### 2.1. Synthesis of 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde sulfamethoxazole Schiff Base (5MS-S1)

2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde sulfamethoxazole (**5MS-S1**), To 2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde (0.15 g, 0.98 mmol) in 20 mL super dry ethanol sulfamethoxazole (0.263 g, 0.98 mmol) was added and was stirred at room temperature for 15 min followed by reflux for 24 h. Yellow-orange precipitate appeared and was filtered and washed with ethanol (3x15 mL). The product was dried and crystallized from ethanol at. Yield 72%; mp: 218-220 °C. Molecular Weight: 371.41 g/mol; Elemental analysis results (%) for C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: (Calcd) C, 58.21; H, 4.61; N, 11.31; S, 8.63 (Found): C, 58.55; H, 4.70; N, 11.25; S, 8.80. Exact Mass: 371.09 m/z: 372.66 (100.0%), 373.53 (19.8%), 374.56 (4.7%).

### 2.1. Synthesis of the Pd(II) complex (Pd(5MS-S1)<sub>2</sub>)

To a hot solution (1 mmol) of Schiff base ligand in (30 mL) ethanol, a hot solution of corresponding metal chloride [Na<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (0.5 mmol, in 2mL water) were added slowly by the molar ratio 1:2 (L:M) in the presence of few drops of NaOH as basic medium. The resulting mixtures were stirred and refluxed on a hot plate for 48 h and then concentrated to a small volume. The formed solid complexes were collected by filtration and washed with a small volume of ethanol, water and ether. Then they were left in glass oven at 150 °C for a 2 h in vacuo to prevent the hydration dried in a desiccators over CaCl<sub>2</sub>. Yield: 85% for Pd (II) complex. Pd(L)<sub>2</sub> (C<sub>37</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Pd): mp: 268-270 °C. Molecular Weight: 862.26 g/mol; Elemental analysis results: (Calcd) C, 51.54; H, 4.09; N, 9.75; S, 7.44; Pd, 12.34. (Found): C, 51.45; H, 4.05; N, 9.72; S, 7.40; Pd, 12.80.



**Figure 37.** General synthesis method of the Schiff base and Pd(II) complex

## 3. RESULTS and DISCUSSION

### 3.1. The characterization of compounds

Schiff base ligand and its Pd(II) complex of the elemental analysis results show 1:2 (metal:ligand) stoichiometry for the complex. The analytical results are in good agreement with those required by the general formula [ML<sub>2</sub>]. The molar conductivity (Λ<sub>m</sub>) of 10<sup>-3</sup>M solutions of the complex in DMSO at 25 °C was measured. The whole complex was found nonelectrolytic nature in the range of 2.6 - 4.7 Ω<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.1. IR spectra

The IR spectrum of the prepared compounds exhibits the characteristic bands of the expected functional groups (Fig. 2). The IR spectrum of free **5MS-S1** ligand shows a strong band at  $1615\text{ cm}^{-1}$ , which refers to the stretching vibration of azomethine as the main characteristic band and obviously confirms the formation of the Schiff base. Schiff bases are expected to coordinate to metal ions via the nitrogen atom, reduce the electron density at the azomethine linkage, and reduce the frequency of  $\nu(\text{C-N})$  absorption. A comparison of the IR spectra of metal complexes with the corresponding Schiff base ligands demonstrates that the absence of a band assigned to  $\nu(\text{O-H})$  of the o-vanillin moiety which supports the involvement of phenolic OH groups in bonding with the metal ions. Also, shifting of the  $\nu(\text{C=N})$  to lower wave number side supports the coordination of azomethine groups with the metal ions through the one pair of electrons on the nitrogen in complex formation. This is also confirmed by the appearance of the new band at  $555\text{-}570$  and  $424\text{-}459\text{ cm}^{-1}$  due to  $\nu(\text{M-O})$  and  $\nu(\text{M-N})$  stretching modes in the metal complexes respectively. The strong  $\nu(\text{C-O})$  strain vibration determined in the free ligand at  $1270\text{ cm}^{-1}$  was shifted to the low wave number in the  $\text{Pd(L)}_2$  complex and was observed to be a medium band at about  $1215\text{ cm}^{-1}$ . This indicates that the phenolic oxygen and azomethine nitrogen atoms are involved in coordination. For this reason, Schiff base ligands behave as bidentate ligands. In the IR spectra of ligand vibrational band observed at  $1339\text{-}1341\text{ cm}^{-1}$  and  $1151\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$  are assigned to asymmetric and symmetric  $\text{SO}_2$  stretching modes, respectively. The absence of shifting in symmetric and asymmetric  $\text{SO}_2$  modes in the complexes is attributed to the not participating in coordination.

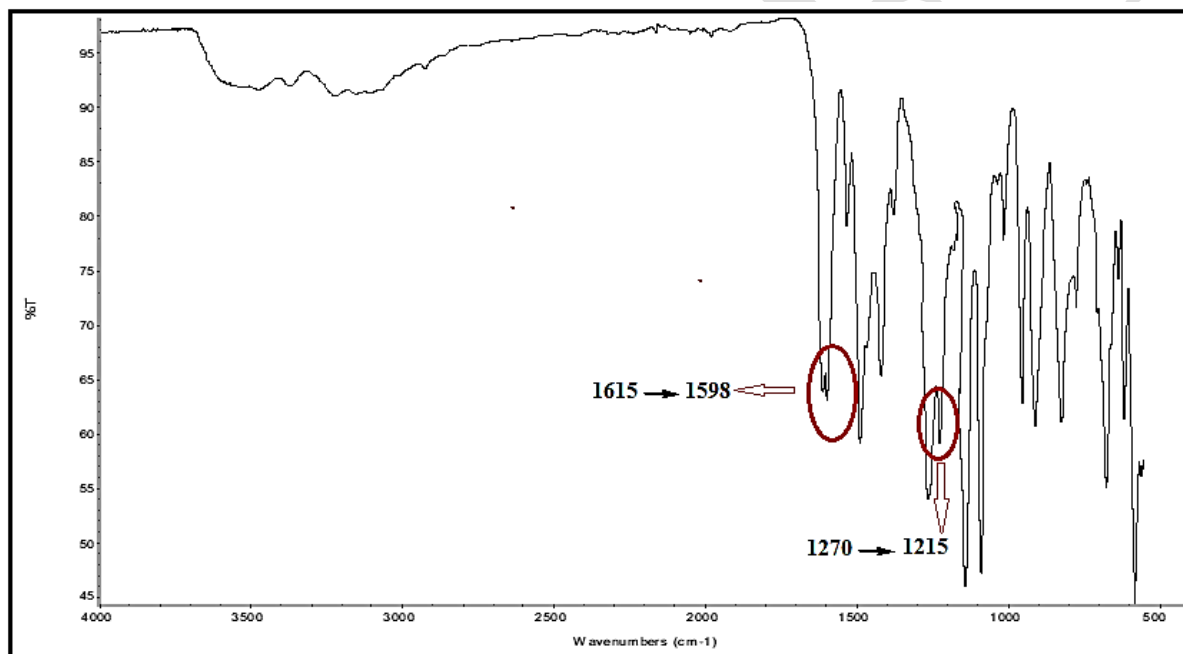


Figure 2. IR spectrum of the  $\text{Pd}(\mathbf{5MS-S1})_2$  complex

### 3.1.2. NMR spectra

The NMR spectra ( $^1\text{H}$  -  $^{13}\text{C}$ ) of **5MS-S1** was measured and interpreted in DMSO. Theoretical NMR calculations were performed with B3LYP/6-311G++ (d, p) level of theory in DMSO phase. Isotropic shielding tensors of  $^{13}\text{C}$  were changed into chemical shifts by using a linear relationship suggested by Blanco et al. (Blanco et al., 2007). A similar relationship proposed by Silva et al. (Silva et al., 2008) was used to obtain chemical shifts for  $^1\text{H}$ . The computed chemical shift values fit well with experimental values. The  $^{13}\text{C}$  NMR and  $^1\text{H}$  NMR spectrums of the Schiff base in DMSO is given in Fig. 3, 4. In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of L; H1, H12 and  $-\text{CH}_3$  protons appeared at 2.28 ppm, 8.91 ppm and 2.31 ppm were calculated at 2.30 ppm, 8.90 ppm and 2.32 ppm. A signal were also observed at  $\delta=12.20$  ppm of the phenolic H-O- group (calculated at 12.53 ppm) and at  $\delta=11.50$  ppm of the N-H-

group (calculated at 11.26 ppm). Signals in the range of  $\delta$  6.88-7.91 ppm region belong to aromatic Ar-H protons. In  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of L; C1, C12 and  $-\text{CH}_3$  carbon signals were assigned at 12.52 ppm and 192.18 ppm, and 20.37 ppm (calculated 12.65 ppm, 191.90 ppm and 20.70 ppm), respectively. Signals in the range of  $\delta$  95.75-170.86 ppm region belong to aromatic Ar-C carbons.

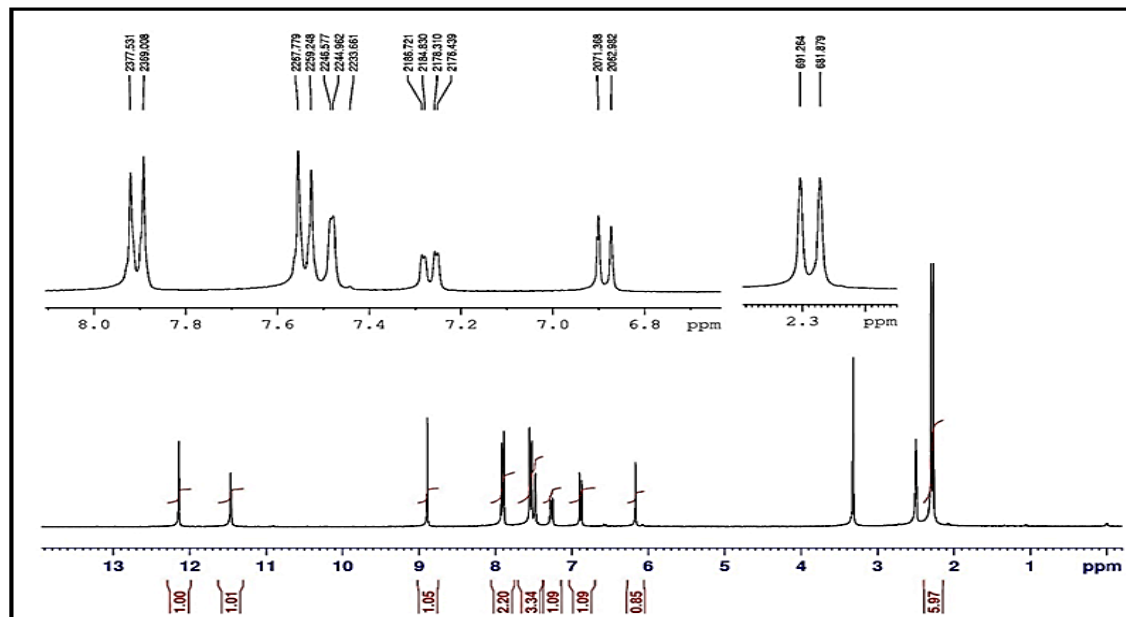


Figure 3.  $^1\text{H}$  NMR of the 5MS-S1 Schiff base

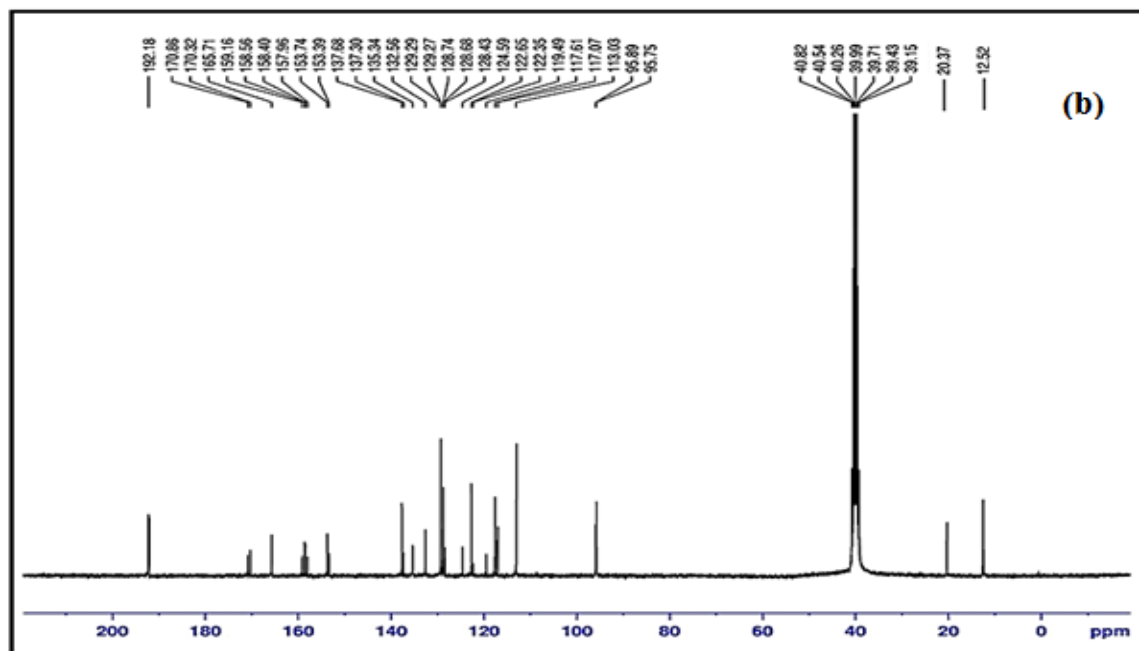


Figure 4.  $^{13}\text{C}$  NMR of the 5MS-S1 Schiff base



### 3.1.3. LC-MS Spectrum Pd(5MS-S1)<sub>2</sub> complex

The theoretical calculated molecular weight of the Schiff base ligand is 847,22 gmol<sup>-1</sup>. The molecular ion peak [M]<sup>+</sup> is observed at m/z= at 847,74. Besides this peak, the Schiff base showed a fragment ligand ion peak [L-H]<sup>+</sup> at m/z 370,48.

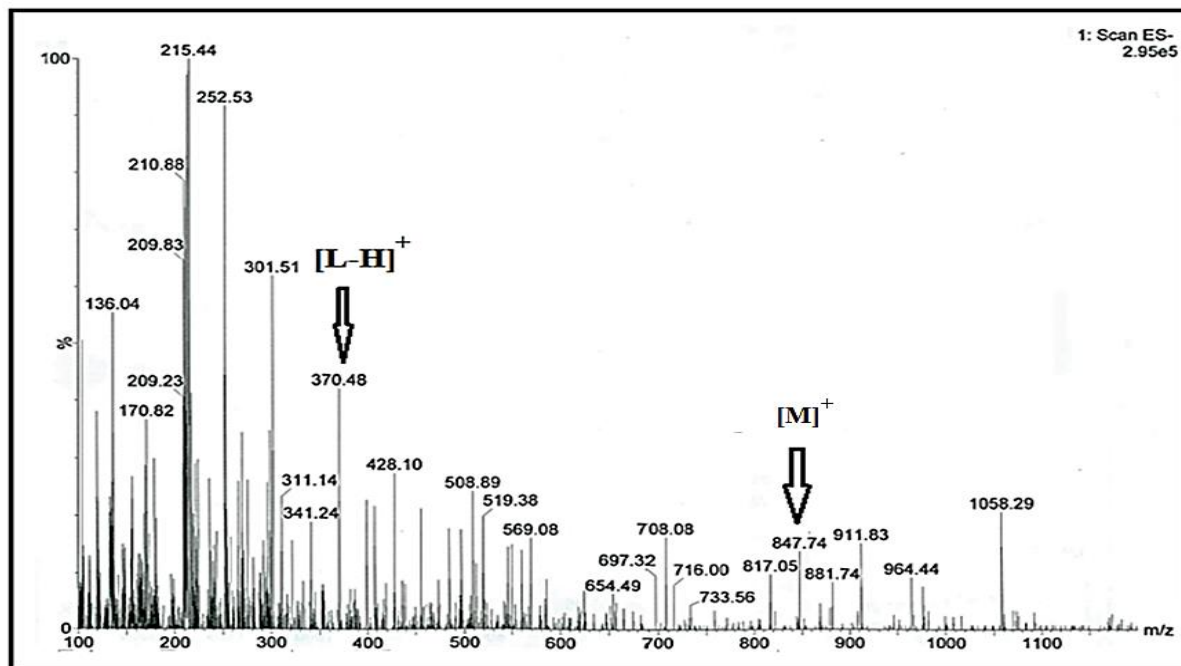


Figure 5. LC-MS spectrum of the Pd(5MS-S1)<sub>2</sub> complex

### 3.1. Frontier molecular orbital analysis

The frontier molecular orbital distributions and energy levels of the HOMO and LUMO, which computed at B3LYP/6-311++G(d,p) level of studied compounds were shown in Fig. 6. The frontier molecular orbitals (FMOs) help for physicists and chemists for the main orbital taking part in chemical reaction. While the HOMO is directly related to the ionization potential, the LUMO is directly related to the electron affinity. The molecules with a larger  $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$  band gap should be less reactive than one having a smaller gap (Kurtaran et al., 2007).

The calculated values of HOMO and LUMO energies and  $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$  band gaps of studied compounds presented in Fig.6. The difference between HOMO and LUMO energy levels of S1, 5MS-S1 and Pd(5MS-S1)<sub>2</sub> were found to be 5.40, 8.23 and 2.91 eV at B3LYP/6-311++G(d,p) in gasphase.

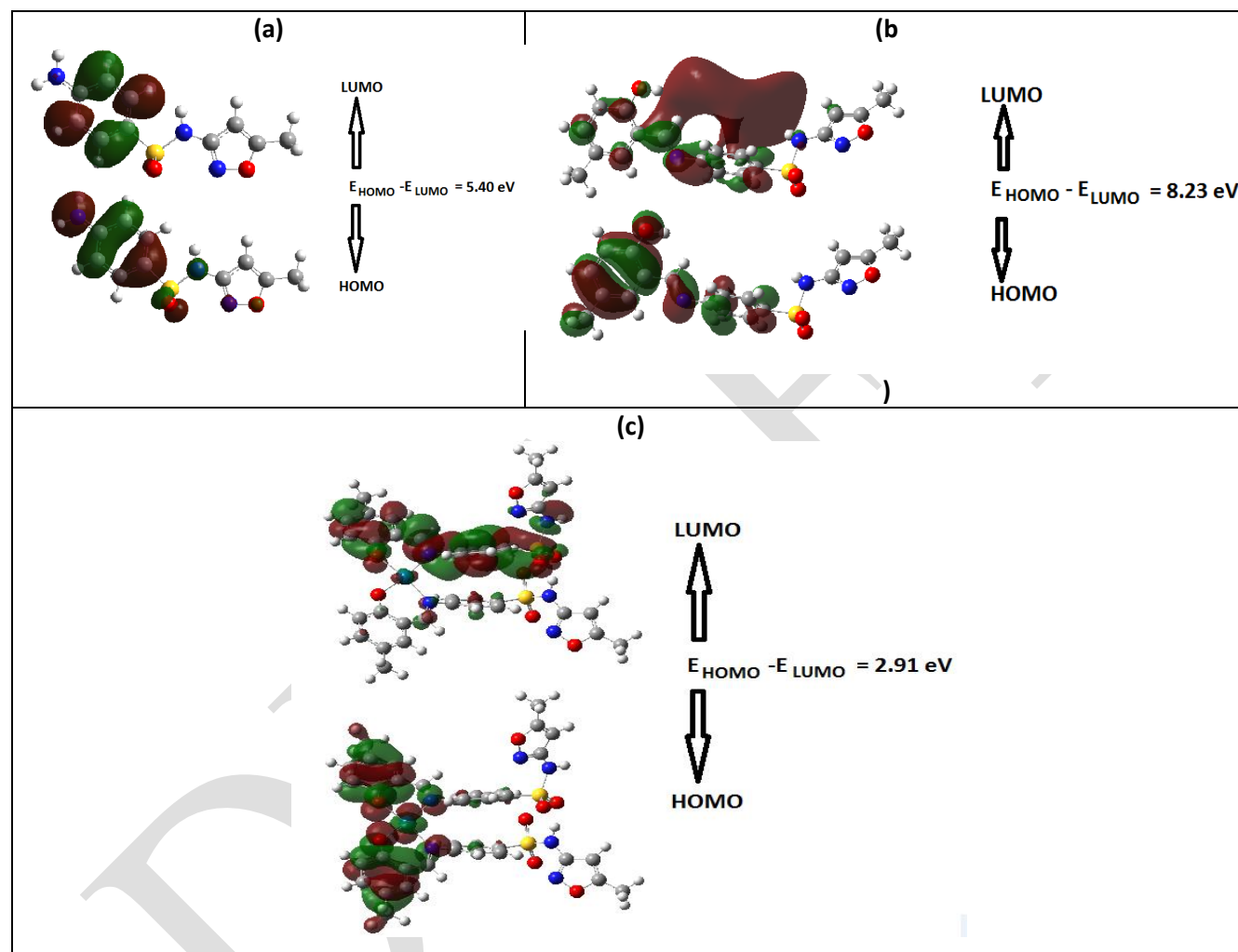
### 3.2. Nonlinear optical (NLO) properties

Investigation of the nonlinear optical properties of the materials is so important due to the keyfunctions of frequency shifting, optical modulation, optical switching, optical logic and optical memory for the emerging technologies in areas such as in telecommunications, information storage, optical switching signal processing (Andraud et al., 1994) and THz wave generation (Krishnakumar and Nagalakshmi, 2008).

The THz region, which lies in between microwaves and infrared region of the electromagnetic spectrum, offers diverse applications such as wireless communications, inspection of drugs, spectroscopy and imaging (Ramaclaus

et al., 2014). Due to measures in the field of technology, there is an increasing interest in designing new organic materials with desired nonlinear optical properties.

The dipole moment ( $\mu$ ), the static polarizability ( $\alpha_0$ ) and first static hyperpolarizability ( $\beta_{tot}$ ) are related directly to the nonlinear optical (NLO) activity of structures. The calculated values of the polarizabilities and the hyperpolarizabilities from Gaussian 09 output were converted from atomic units into electrostatic units ( $\alpha$ : 1 a.u. =  $0.1482 \times 10^{-24}$  esu;  $\beta$ : 1 a.u. =  $8.6393 \times 10^{-33}$  esu) (Sundaraganesan et al., 2009).



**Figure 6.** The molecular orbitals and energies; (a), S1; (b), (5MS-S1); (c), Pd(5MS-S1)<sub>2</sub>

The total static dipole moment,  $\mu$  is defined as;  $\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2}$ . The calculations of static polarizability ( $\alpha_{ave}$ ) and first static hyperpolarizability ( $\beta_{tot}$ ) from the Gaussian output have been stated in detail previously (Alyar et al., 2007) as follows:

$$\langle \alpha \rangle = 1/3 (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz})$$

$$\beta_{tot} = [(\beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz})^2 + (\beta_{yyy} + \beta_{yzz} + \beta_{yxx})^2 + (\beta_{zzz} + \beta_{zxx} + \beta_{zyy})^2]^{1/2}$$

The first static hyperpolarizability ( $\beta_{\text{tot}}$ ), mean polarizability ( $\langle\alpha\rangle$ ) and the ground state dipole moment ( $\mu$ ) of studied compounds were calculated by B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory and results presented at Table 1. First static hyperpolarizability of S1, 5MS1 and 5MS1 PD were computed to be  $3.924 \times 10^{-30}$ ,  $11.113 \times 10^{-30}$ , and  $43.112 \times 10^{-30}$  esu, respectively. It found that, the first static hyperpolarizability of S1, 5MS1 and 5MS1 PD is 10.52, 29.81 and 115.64 times larger than that of urea ( $0.3728 \times 10^{-30}$  esu). These compounds present large nonlinear optical activity. For these reason S1, 5MS-S1 and Pd(5MS-S1)<sub>2</sub> compounds can be used for nonlinear optical application.

**Table 1.** The electric dipole moment  $\mu$  (D), the mean polarizability  $\langle\alpha\rangle$  ( $\times 10^{-24}$  esu) and the first hyperpolarizability  $\beta_{\text{tot}}$  ( $\times 10^{-33}$  esu) of compounds DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method

Parameter	S1	5MS1	Pd(5MS-S1) <sub>2</sub>	Parameter	S1	5MS1	Pd(5MS-S1) <sub>2</sub>
$\mu_x$	-10.3412	-5.8424	2.5777	$\beta_{xxx}$	-1114.12	13561.37	36534.47
$\mu_y$	-1.9961	7.1197	8.1169	$\beta_{xxy}$	1285.79	-1623.32	2405.79
$\mu_z$	0.2554	-4.5263	4.5138	$\beta_{xyy}$	3026.69	-1139.09	1321.64
M	10.5352	10.2621	9.6386	$\beta_{yyy}$	2615.29	-100.39	-3604.32
$\alpha_{xx}$	25.02	58.90	110.49	$\beta_{xxz}$	0.69	257.77	4452.00
$\alpha_{xy}$	4.67	-1.90	-4.32	$\beta_{xyz}$	0.90	68.08	-1923.19
$\alpha_{yy}$	35.77	31.62	82.43	$\beta_{yyz}$	-0.89	70.84	393.52
$\alpha_{xz}$	0.00	0.66	-1.82	$\beta_{zzz}$	-819.62	-1417.10	5055.72
$\alpha_{yz}$	0.00	2.00	-16.69	$\beta_{yzz}$	-132.61	271.10	839.83
$\alpha_{zz}$	14.88	26.15	74.08	$\beta_{zzz}$	0.00	-847.69	-710.41
$\langle\alpha\rangle$	25.22	38.89	89.00	$\beta_{\text{tot}}$	3923.76	11112.76	43112.10

$\alpha$ : 1 a.u =  $0.1482 \times 10^{-24}$  esu

$\beta$ : 1 a.u =  $8.6393 \times 10^{-33}$  esu

## CONCLUSION

In the present study, new Schiff base 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde sulfamethoxazole (5MS-S1), and its Pd (II) complex was synthesized for the first time. The structures of compounds were characterized by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, LC-MS, magnetic susceptibility, conductivity measurements. The complex having general composition of [ML<sub>2</sub>] was found. The results of elemental analysis showed 1:2 (metal/ligand) stoichiometry for the complex. Magnetic and spectral data indicate a square planar geometry for Pd (II) complex. Energy band gap between HOMO and LUMO energy levels were found to be 5.40, 8.23 and 2.91 eV for S1, 5MS-S1 and Pd(5MS-S1)<sub>2</sub>, respectively. Nonlinear optical study presented that these compounds have very large nonlinear optical activity. For these reason these compounds can be use for nonlinear optical applications.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the **TUBITAK Foundation (No: TBAG 107 Z 749)** for the financial support of this project.

## REFERENCES

- Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R, 2013. Bioorg. Insights towards sulfonamide drug specificity in  $\alpha$ -carbonic anhydrases. Med. Chem. 21: 1526-1533.
- Alterio V, Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G, 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? Chem. Rev. 112 : 4421-4468.
- Alyar S, Adem S, 2014. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and carbonic anhydrase enzyme inhibitor effects of salicylaldehyde-N-methyl p-toluenesulfonylhydrazide and its Palladium (II), Cobalt (II) complexes. Spectrochim. Acta Part A: 131: 294-302.
- Alyar S, Özbek N, İskeleli NO, Karacan N, 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper(II) complexes with N,N'-propanediyl-bisbenzenesulfonamide and N,N'-ethanediyl-bis-2-methylbenzenesulfonamide. Med. Chem. Research. 22: 2051-2060.

- Alyar H, Kantarci Z, Bahat M, Kasap E, 2007. *J. Mol. Struct.* 834-836: 516-520.
- Andraud C, Brotin T, Garcia C, Pelle F, Goldner P, Bigot B, Collet A, 1994. *J. Am. Chem. Soc.* 116:2094–2102.
- Angeli A, Carta F, Bartolucci G, Supuran CT, 2017. Synthesis of novel acyl selenoureido benzenesulfonamides as carbonic anhydrase I, II, VII and IX inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem.* 25: 3567–3573
- Arechederra RL, Waheed A, Sly WS, Supuran CT, Minter SD, 2013. Effect of sulfonamides as carbonic anhydrase VA and VB inhibitors on mitochondrial metabolic energy conversion. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 1544-1548.
- Blanco F, Alkorta I, Elguero J, 2007. Statistical analysis of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts from GIAO/B3LYP/6-311++G\*\*calculated absolute shieldings. *Magn. Reson. Chem.* 45: 797-800.
- Boyd AE, 1988. Sulfonamide Receptors, Ion Channels and Fruit Flies. *Diabetes.* 37: 847-850.
- Chohan ZH, Shad HA, Youssoufi MH, Hadda TB, 2010. Some new biologically active metal-based sulphonamide. *Eur. J. Med. Chem.* 45: 2893-2901.
- Capasso C, Supuran CT, 2013. Anti-infective carbonic anhydrase inhibitors: a patent and literature review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 23: 693-704.
- Carta F, Supuran CT, 2013. Expert opinion on therapeutic patents, *Expert. Opin. Ther. Pat.* 23: 681-691.
- Domagk G, 1935. Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionem, *Deut. Med. Wochenschr.* 61: 250–258.
- Gilmour KM, 2010. Perspectives on carbonic anhydrase. *Comparative Biochem and Physiology- A Mol. and Integrative Physiology* 157: 193-202.
- Gündüzalp AB, Özmen ÜÖ, Çevrimli BS, Mamaş S, Çete S, 2014. Synthesis, Physico-Chemical Characterization, and Stability Constants of Metal Complexes of Pyridine-2-carbaldehyde Thiosemicarbazone, *Med. Chem. Research.* 23: 3255-3268.
- Krishnakumar V, Nagalakshmi R, 2008. *Physica B* 403:1863–1869.
- Kurtaran R, Odabasoglu S, Azizoğlu A, Kara H, Atakol O, 2007. *Polyhedron*, 26 :5069-5074.
- Masini E, Carta F, Scozzafava A, Supuran CT, 2013. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 23: 705-716.
- Owa T, Nagasu T, 2000. Novel sulphonamide derivatives for the treatment of cancer. *Exp. Opin. Ther. Pat.* 10: 1725-1740.
- Özbek N, Alyar S, Memmi BK, Gündüzalp AB, Bahçeci Z, Alyar H, 2017. Synthesis, characterization, computational studies, antimicrobial activities and carbonic anhydrase inhibitor effects of 2-hydroxy acetophenone-N-methyl p-toluenesulfonylhydrazone and its Co(II), Pd(II), Pt(II) complexes. *J. Mol. Struct.* 1127:437-448.
- Özbek N, Alyar S, Karacan N, 2009. Experimental and theoretical studies on methanesulfonic acid 1-methylhydrazide: antimicrobial activities of its sulfonyl hydrazone derivatives. *J. Mol. Struct.* 938: 48–53.
- Ramaclaus JV, Thomas T, Ramesh S, Sagayaraj P, EA, 2014. *Cryst. Eng. Comm.* 16:6889-6895.
- Silva AMS, Sousa RMS, Jimeno ML, Blanco F, Alkorta I, Elguero J, 2008. Experimental measurements and theoretical calculations of the chemical shifts and coupling constants of three azines (benzalazine, acetophenoneazine and cinnamaldazine). *Magn. Reson. Chem.* 46:859-864.
- Sundaraganesan N, Kavitha E, Sebastian S, Cornard JP, Martel M, 2009. *Spectrochimica Acta Part A* 74 :788–797.
- Supuran CT, 2012. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 27:759-772.
- Supuran CT, 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Rev. Drug. Discov.* 7: 168-181.
- Thiry A, Dogne JM, Masereel B, Supuran CT, 2006. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 566-573.
- Thornber CW, 1979. Isosterism and molecular modification in drug design, *Chem. Soc. Rev.* 8: 563-580.

## Synthesis, characterization, spectroscopic and electronic properties of sulfa drugs

Saliha Alyar<sup>1\*</sup>, Hamit Alyar<sup>2</sup>, Ümmühan Özdemir Özmen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Çankırı, Turkey.

<sup>2</sup>Çankırı Karatekin University, Faculty of Science, Department of Physics, Çankırı, Turkey.

<sup>3</sup>Gazi University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Ankara, Turkey.

\* Corresponding author e-mail: saliha@karatekin.edu.tr

### Abstract

New Schiff base was synthesized 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde sulfisoxazole (**5MS-S2**) derived from sulfisoxazole and substituted salicylaldehyde. The synthesized compound was characterized by FT-IR, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR, LC-MS. 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde sulfisoxazole has also been characterized by single crystal X-ray diffraction. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C shielding tensors for crystal structure were calculated with GIAO/DFT/B3LYP/6-311++ G(d,p) methods in DMSO. The nonlinear optical (NLO) properties and frontier molecular orbitals have been investigated by B3LYP/6-311 ++ G(d,p) and B3LYP/ level of theory.

**Keywords:** Sulfisoxazole, DFT, NMR, NLO, HOMO-LUMO

### 1. INTRODUCTION

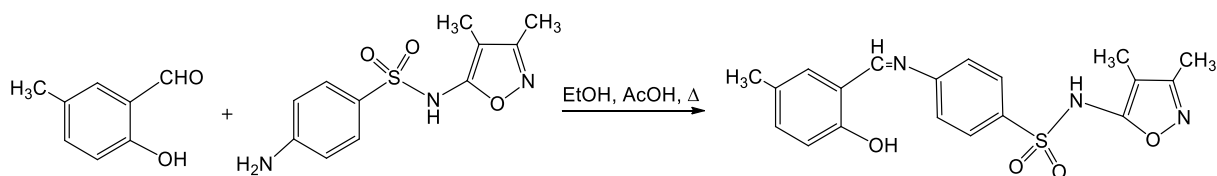
Sulfonamides together with various pharmacological agents with antibacterial (Bilge et al., 2019; Muhammad et al., 2019), insulin-releasing (Nafila et al., 2015; Maren, 1976), carbonic anhydrase inhibitory (Supuran, 1998), anti-inflammatory (Govindharasu et al., 2018), antidiabetic (Paul et al., 2016) and antitumor (Lianqi et al., 2017) activities is an important class of drugs. With advancing technology and work, many important effects of sulfonamides in metabolism have been explained. Considering the multifunctional chemistry of the sulfonamide derivatives, it appears that continuous efforts have been made to synthesize the Schiff base ligands of the substituted sulfonamides. Due to the great biological importance of sulfonyl derivatives, we planned the evaluation of the hybrid derivatives of this group and the various enzyme inhibition potentials. In our previous studies, we synthesized different sulfonamides and tested their antimicrobial activity (Ozbek et al., 2007; Özdemir et al., 2013; Alyar et al., 2013). Spectroscopic properties and carbonyl complexes of methanesulfonic acid hydrazide (Ozdemir et al., 2004), methanesulfonic acid 1-methylhydrazide (Ozbek et al., 2009) and some ethanesulfonylhydrazone derivatives were also studied (Gündüzalp et al., 2014). In addition, different aromatic/heteroaromatic sulfonylhydrazone derivatives and their transition metal complexes have been investigated for their inhibitory effects on carbonic anhydrase II (hCA II) isoenzyme (Alyar et al., 2014).

In the present study, New Schiff base (2-hydroxy-5-methylbenzaldehyde sulfisoxazole (**5MS-S2**)) has been synthesized. Synthesized compound has been characterized by using elemental analyses, spectrometric methods (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR, FT-IR and LC-MS) magnetic susceptibility, conductivity measurements. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR calculations for **5MS-S2** performed with GIAO/DFT/B3LYP/6-311++G(d,p) methods in DMSO. The nonlinear optical (NLO) activity and frontier molecular orbitals (FMOs) have been investigated by B3LYP/6-311++G(d,p) and B3LYP/LanL2DZ level of theory.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Synthesis

General synthesis method of the Schiff base was depicted schematically in **Fig. 1**. 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde sulfisoxazole (**5MS-S2**), To 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (0.15 g, 0.98 mmol) in 20 mL super dry ethanol sulfisoxazole (0.263 g, 0.98 mmol) was added and was stirred at room temperature for 15 min followed by reflux for 24 h. Yellow-orange precipitate appeared and was filtered and washed with ethanol (3x15 mL). The product was dried and crystallized from ethanol at. Yield 72%; mp: 218-220 °C. Molecular Weight: 384,45 g/mol; Elemental analysis results (%) for C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S: (Calcd) C, 62.48; H, 5.24; N, 7.29; S, 8.34 (Found): C, 62.55; H, 5.70; N, 7.25; S, 8.80. Exact Mass: m/z: 384.11 (100.0%), 385.12 (22.0%), 386.11 (4.7%)



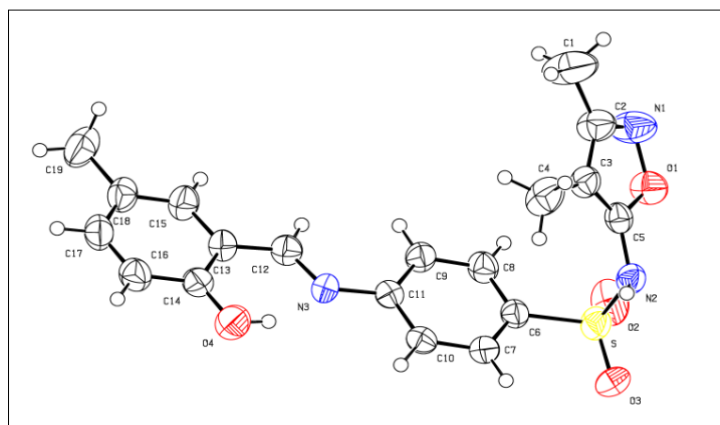
**Figure 38.** Synthesis method of the **5MS-S2**

## 2.2. Theoretical Calculations

The quantum chemical calculations of studied compounds were performed with Gaussian 09 program package using density functional theory (Frisch et al., 2009). The geometries of the compounds were fully optimized without any constraint with the help of an analytical gradient procedure implemented with the Becke-3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) functional and 6-311++G(d,p) basis set (Lee et al., 1988; Becke et al., 1988). Optimized geometry of **5MS-S2** presented at **Fig. 2**. The Gauss view software package was used to visualize the computed structures including HOMO, LUMO and Molecular electrostatic potential (MEP) representations.

## 3. RESULTS and DISCUSSION

In this work, **5MS-S2** was synthesized. Furthermore, X-Ray structure of **5MS-S2** was obtained. Molecular structure with the atom-numbering scheme of compound was given in **Fig. 2**.



**Figure 2.** The orthep diagram of **5MS-S2**

### 3.1. NMR Studies

The NMR spectra (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) of **5MS-S2** was measured and interpreted in DMSO. Theoretical NMR calculations were performed with B3LYP/6-311G++(d, p) level of theory in DMSO phase. Isotropic shielding tensors of <sup>13</sup>C were changed into chemical shifts by using a linear relationship suggested by Blanco et al. (Blanco et al., 2007). A similar relationship proposed by Silva et al. (Silva et al., 2008) was used to obtain chemical shifts for <sup>1</sup>H. The computed chemical shift values fit well with experimental values. The experimental and calculated chemical shift values are shown in **Table 1**. The <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR spectrums of the Schiff bases in DMSO are given in **Fig. 3**

In the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **5MS-S2**; H1, H4, CH=N and Ar-CH<sub>3</sub> protons appeared at 1.69 ppm, 2.10 ppm, 8.91 ppm and 2.31 ppm were calculated at 1.70 ppm, 2.07 ppm, 8.95 ppm and 2.87 ppm. A signal were also observed at δ = 11.10 ppm of the N-H- group (calculated at 11.28 ppm) and at δ = 12.20 ppm of the O-H- group (calculated at 12.80 ppm). Signals in the range of δ 6.60-7.80 ppm region belong to aromatic Ar-H protons. In <sup>13</sup>C-NMR spectra of **5MS-S2**; C1, C4, CH=N and Ar-CH<sub>3</sub> carbon signals are assigned at 6.27 ppm, 12.51 ppm, 191.75 ppm and 20.36 ppm (calculated 6.08 ppm, 12.48 ppm, 192.00 ppm and 20.45 ppm) respectively. Signals in the range of δ 95.88-170.86 ppm region belong to aromatic Ar-C carbons.

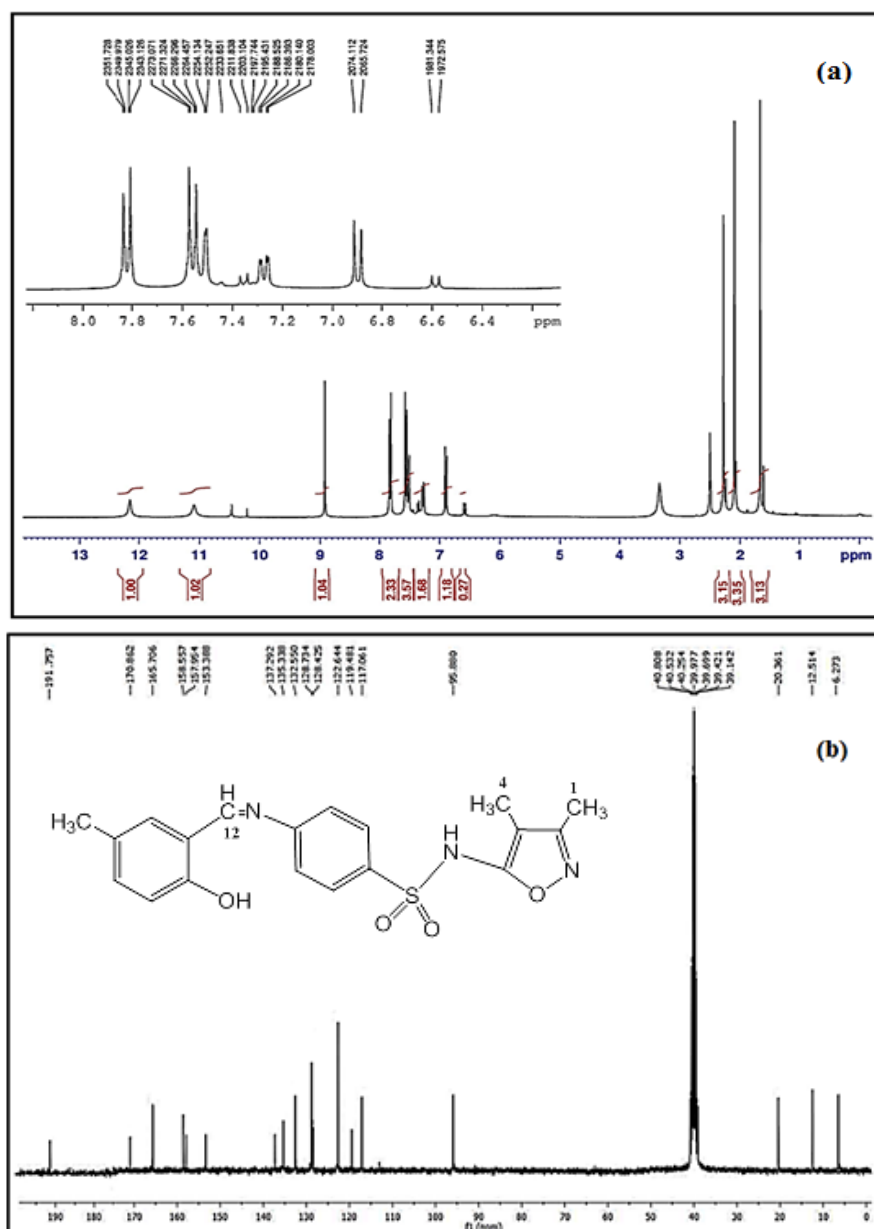


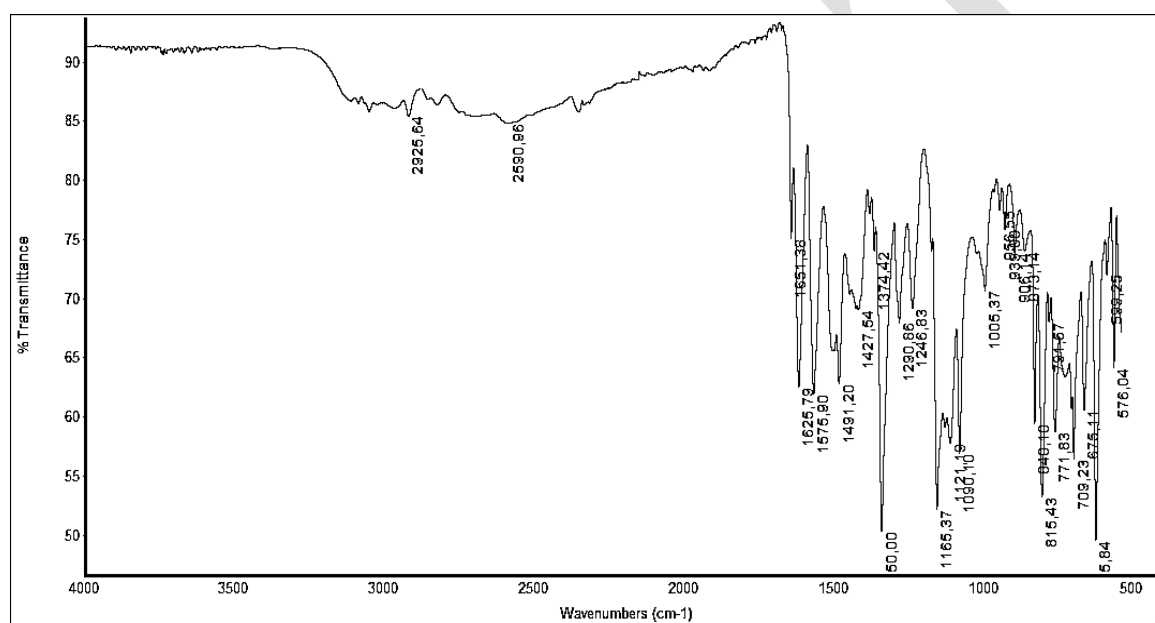
Figure 3.(a) <sup>1</sup>H NMR of the Schiff base; (b) <sup>13</sup>C NMR of the 5MS-S2

### 3.2. FT-IR spectra

The IR spectrum of the prepared compounds exhibits the characteristic bands of the expected functional groups. The IR spectrum of free Schiff base ligand (5MS-S2) shows a strong bond at 1625 cm<sup>-1</sup> (Fig. 4), which refers to the stretching vibration of azomethine as the main characteristic band and obviously confirms the formation of the Schiff base. In the IR spectra of ligands vibrational band observed at 1374 cm<sup>-1</sup> and 1165 cm<sup>-1</sup> are assigned to asymmetric and symmetric SO<sub>2</sub> stretching modes, respectively. The presence of single and strong NH band at ~3192 cm<sup>-1</sup> confirms the presence of secondary amine group in compounds.

**Table 1.** The experimental and theoretical <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts δ(ppm) for **5MS-S2**

Assignment	δ(exp.)	δ(calc.)
<b>C1</b>	6.27	6.08
<b>C4</b>	12.51	12.48
<b>C12</b>	191.75	192.00
Ar-CH <sub>3</sub>	20.36	21.45
Ar-C	95.88-170.86	95.00-172.75
<b>H1</b>	1.69	1.70
<b>H4</b>	2.10	2.07
Ar-CH <sub>3</sub>	2.31	2.87
CH=N	8.91	8.95
<b>Ar-H</b>	6.60-7.80	6.62-7.92
<b>NH</b>	11.10	11.28
<b>OH</b>	12.20	12.80



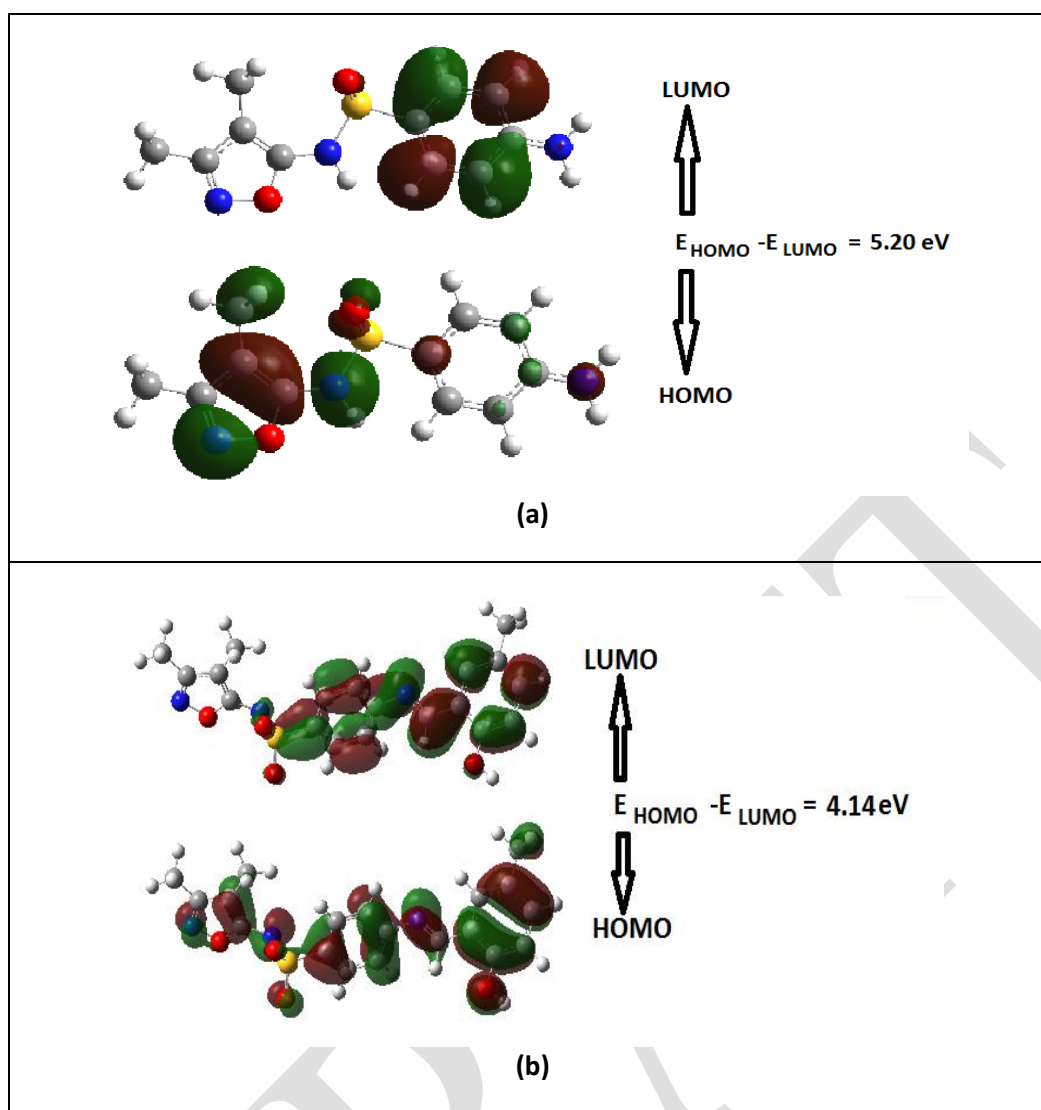
**Figure 4.** IR spectrum of the **5MS-S2**

### 3.3. Frontier molecular orbital analysis

The frontier molecular orbital distributions and energy levels of the HOMO and LUMO, which computed at B3LYP/6-311++G(d,p) level of studied compounds were shown in **Fig. 5**. The frontier molecular orbitals (FMOs) help for physicists and chemists for the main orbital taking part in chemical reaction. While the HOMO is directly related to the ionization potential, the LUMO is directly related to the electron affinity. The molecules with a larger  $\Delta E_{HOMO-LUMO}$  band gap should be less reactive than one having a smaller gap (Kurtaran et al., 2007).

The calculated values of HOMO and LUMO energies and  $\Delta E_{HOMO-LUMO}$  band gaps of studied compounds presented in **Fig. 5**. The difference between HOMO and LUMO energy levels of **S2**, and **5MS-S2** were found to be 5.20 and 4.14 at B3LYP/6-311++ G (d,p) in gasphase.





**Figure 5.** The molecular orbitals and energies; (a), S2; (b), SMS-S2

### 3.4. Nonlinear optical (NLO) properties

Investigation of the nonlinear optical properties of the materials is so important due to the keyfunctions of frequency shifting, optical modulation, optical switching, optical logic and optical memory for the emerging technologies in areas such as in telecommunications, information storage, optical switching signal processing (Andraud et al., 1994) and THz wave generation (Krishnakumar and Nagalakshmi, 2008).

The THz region, which lies in between microwaves and infrared region of the electromagnetic spectrum, offers diverse applications such as wireless communications, inspection of drugs, spectroscopy and imaging (Ramaclaus et al., 2014). Due to measures in the field of technology, there is an increasing interest in designing new organic materials with desired nonlinear optical properties.

The dipole moment ( $\mu$ ), the static polarizability ( $\alpha_0$ ) and first static hyperpolarizability ( $\beta_{tot}$ ) are related directly to the nonlinear optical (NLO) activity of structures. The calculated values of the polarizabilities and the hyperpolarizabilities from Gaussian 09 output were converted from atomic units into electrostatic units ( $\alpha$ : 1 a.u. =  $0.1482 \times 10^{-24}$  esu;  $\beta$ : 1 a.u. =  $8.6393 \times 10^{-33}$  esu) (Sundaraganesan et al., 2009).

The total static dipole momen,  $\mu$  is defined as;  $\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2}$ . The calculations of static polarizability ( $\alpha_{ave}$ ) and first static hyperpolarizability ( $\beta_{tot}$ ) from the Gaussian output have been stated in detail previously (Alyar et al., 2007) as follows:

$$\langle \alpha \rangle = 1/3 (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz})$$

$$\beta_{\text{tot}} = [(\beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz})^2 + (\beta_{yyy} + \beta_{yzz} + \beta_{yxx})^2 + (\beta_{zzz} + \beta_{zxx} + \beta_{zyy})^2]^{1/2}$$

The first static hyperpolarizability ( $\beta_{\text{tot}}$ ), mean polarizability ( $\langle \alpha \rangle$ ) and the ground state dipole moment ( $\mu$ ) of studied compounds were calculated by B3LYP/6-311++G(d,p) level of theory and results presented at **Table 2**. First static hyperpolarizability of S2 and 5MS-S2 were computed to be  $3.339 \times 10^{-30}$  and  $12.66 \times 10^{-30}$  esu, respectively. It found that, the first static hyperpolarizability of S2 and 5MS2 is 8.86 and 33.96 times larger than that of urea ( $0.3728 \times 10^{-30}$  esu). These compounds present large nonlinear optical activity. For these reason S2 and 5MS-S2 compounds are candidate systems for nonlinear optical applications.

**Table 2.** The electric dipole moment  $\mu$  (D), the mean polarizability  $\langle \alpha \rangle$  ( $\times 10^{-24}$  esu) and the first hyperpolarizability  $\beta_{\text{tot}}$  ( $\times 10^{-33}$  esu) of compounds by DFT B3LYP/6-311++G(d,p) method

Parameter	S2	5MS2	Parameter	S2	5MS2
$\mu_x$	0.7256	9.3531	$\beta_{xxx}$	582.81	-14102.2
$\mu_y$	8.3772	3.9414	$\beta_{xxy}$	243.89	-2943.15
$\mu_z$	0.2713	0.3836	$\beta_{xyy}$	-191.27	758.21
M	8.4129	10.1569	$\beta_{yyy}$	-3897.41	1681.12
$\alpha_{xx}$	24.93	74.42	$\beta_{xxz}$	-1.21	1040.69
$\alpha_{xy}$	0.25	0.08	$\beta_{xyz}$	-0.38	380.13
$\alpha_{yy}$	40.27	39.50	$\beta_{yyz}$	0.00	-54.08
$\alpha_{xz}$	0.00	-1.46	$\beta_{xzz}$	64.79	764.40
$\alpha_{yz}$	0.00	2.27	$\beta_{yzz}$	345.83	274.82
$\alpha_{zz}$	15.82	27.14	$\beta_{zzz}$	0.00	41.64
$\langle \alpha \rangle$	27.00	47.02	$\beta_{\text{tot}}$	3339.43	12660.09

$\alpha$ : 1 a.u =  $0.1482 \times 10^{-24}$  esu

$\beta$ : 1 a.u =  $8.6393 \times 10^{-33}$  esu

#### 4. Conclusion

As a result of this study, the following decisions were obtained;

New Schiff base compound 5MS-S2 was synthesized and its structure was elucidated using spectroscopic methods. Estimated structures of synthesized compound was drawn in 3D and optimization was performed. Based on optimized structure, theoretical vibrational modes,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and NLO calculations were done. The all calculated parameters were compared with the experimental ones and the structure of the compound has clarified. The first order hyperpolarizabilities of L1 is 8.86 and 33.96 times larger than that of urea ( $0.3728 \times 10^{-30}$  esu). The compound present large nonlinear optical activity.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the **TUBITAK Foundation (No: TBAG 107 Z 749)** for the financial support of this project.

#### REFERENCES

- Alyar S, Adem S, 2014. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and carbonic anhydrase enzyme inhibitor effects of salicylaldehyde-N-methyl p-toluenesulfonylhydrazide and its Palladium(II), Cobalt(II) complexes. Spectrochim. Acta Part A: 131: 294-302.
- Alyar S, Özbek N, Ocak İskeleli N, Karacan N, 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper(II) complexes with N,N'-propanediyl-bisbenzenesulfonamide and N,N'-ethanediyl-bis-2-methylbenzenesulfonamide. Med. Chem. Research 22: 2051-2060.
- Becke AD, 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. Phys. Rev. A 38: 3098-3100.
- Bilge E, Arslan Ü, Fadime ÖK, 2019. Combined experimental and theoretical studies on the chemical and spectroscopic properties of an antimicrobial N-(Phenyl)dimethyldisulfonimide. J. Mol. Struct. 1175:542-550.

- Blanco F, Alkorta I, Elguero J, 2007. Statistical analysis of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shifts from GIAO/B3LYP/6-311++G\*\*calculated absolute shieldings. *Magn. Reson. Chem.* 45: 797-800.
- Frisch MJ, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishi7V87621da, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J.A. Pople, Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2009.
- Govindharasu B, Rajendran S, VEDIAPPEN P, 2018. Synthesis and characterization of curcumin-sulfonamide hybrids: Biological evaluation and molecular docking studies. *J. Mol. Struct.* 1155: 90-100.
- Gündüzalp AB, Özmen ÜÖ, Çevrimli BS, Mamaş S, Çete S, 2014. Synthesis, characterization, electrochemical behavior, and antimicrobial activities of aromatic/heteroaromatic sulfonylhydrazone derivatives. *Med. Chem. Research* 23: 3255-3268.
- Jekaterina I, Agnese B, Raivis Z, Janis L, Andris Daniela K, Vullo KT, Supuran CT, 2017. 5-Substituted-benzylsulfanyl-thiophene-2-sulfonamides with effective carbonic anhydrase inhibitory activity: Solution and crystallographic investigations. *Bioorgan. Med. Chem.* 25: 857-863.
- Lee C, Yang W, Parr RG, 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* 37: 785-789.
- Maren TH, 1976. Relations Between Structure and Biological Activity of Sulfonamides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 16: 309-327.
- Muhammad D, Ayesha B, Khola G, Muhammad AR, Muhammad A, Muhammad NA, Abdullah MA, Khurshid A, 2019. Antiradical, antimicrobial and enzyme inhibition evaluation of sulfonamide derived esters; synthesis, X-Ray analysis and DFT studies. *J.Mol. Struct.* 1175: 379-388.
- Nafila B, Wassim F, Zeinab G, Marjorie B, Kamel H, Xavier F, Bernard P, Philippe L, Gilles F, Smail K, 2015. Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide: Study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release. *Bioorgan. Med. Chem.* 23: 1735-1746.
- Lianqi S, Yanbin W, Yonghua L, Xiaofang C, Laixing H, 2017. Novel carbazole sulfonamide derivatives of antitumor agent: Synthesis, antiproliferative activity and aqueous solubility. *Bioorgan. Med. Chem.Lett.* 27: 261-265.
- Ozbek N, Katircioglu H, Karacan N, Baykal T, 2007. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. *Bioorg Med Chem* 15: 5105-5109.
- Ozbek N, Alyar S, Karacan N, 2009. Experimental and theoretical studies on methanesulfonic acid 1-methylhydrazone: Antimicrobial activities of its sulfonyl hydrazone derivatives. *J. Mol. Struct.* 938: 48-53
- Ozdemir U, Karacan N, Senturk OS, S, Sert, 2004. Synthesis and Characterization of Metal Carbonyl Complexes of M(CO)<sub>6</sub> (M = Cr, Mo, and W), Re(CO)<sub>5</sub>Br, and Mn(CO)<sub>3</sub>Cp with Acetonemethanesulfonylhydrazone (amsh) and Methanesulfonylhydrazone (msh). *Synth. React. Inorgan. Metal-Org. Chem.* 34: 1057-1067.
- Özdemir ÜÖ, Akkaya N, Özbek N, 2013. New Ni (II), Pd (II), Pt (II) complexes with aromatic methanesulfonylhydrazone based ligands. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro antibacterial evaluation. *Inorganica Chim. Acta* 400: 13-19.

- Paul SH, Ross B, John K, Eric M, Kerry M, Timothy P, Travis RER, Tod S, Eric DT, Zhi-Liang W, Erik W, 2016. Carbazole-containing sulfonamides and sulfamides: Discovery of cryptochrome modulators as antidiabetic agents. *Bioorgan. Med. Chem.Lett.* 26: 757-760.
- Silva AMS, Sousa RMS, Jimeno ML, Blanco F, Alkorta I, Elguero J, 2008. Experimental measurements and theoretical calculations of the chemical shifts and coupling constants of three azines (benzalazine, acetophenoneazine and cinnamaldazine). *Magn. Reson. Chem.* 46:859-864.
- Supuran CT, Scozzafava A, Jurca BC, Iies MA, 1998. Carbonic anhydrase inhibitors-part 49: Synthesis of substituted ureido and thioureido derivatives of aromatic heterocyclic sulfonamides with increased affinities of isozyme I. *Eur. J. Med. Chem.* 33: 83-93.

DRAFT

## Optimization of encapsulation parameters by experimental design method in alginate-chitosan membrane capsules

Seda ÖZGEN\*<sup>1</sup>, DENİZ BAŞ<sup>2</sup>

\*1.2 Çankırı Karatekin University Faculty of Engineering Food Engineering Department, TURKEY  
sozgen@karatekin.edu.tr

### Abstract

Recent developments in food and nutrition science show that the foods meet the needs of Daily nutrient intake, regulate various bodily functions and prevent/ treat certain diseases effectively. These caused an increasing interest in functional components of foods.

Studies have shown that carotenoids, phenolic compounds and vitamins have many useful features in terms of human health. Because of these physiological effects, purified carotenoids, which are offered to consumers as concentrate, dust, capsule or preparation form.

In the study, pumpkin, which is a good carotenoid source, was dried and the carotenoid extract was obtained, the extract was encapsulated and the capsules were characterized.

The extracts from the dried and powdered pumpkin used to determine the extraction yield, size distribution and core leakage. At a later stage, the carotenoid extract obtained under optimal extraction conditions was encapsulated to be more stable. Ionic gelation encapsulation process method was used. Carotenoids dissolved in the oil phase were encapsulated by dropping the gelling agent into the sodium alginate and calcium chloride solution. Dripping was performed using a syringe pump.

The aim is to obtain micro capsules that have higher stabilization, perfectly spherical shape, good coating quality by assaying various parameters for the encapsulation process. Encapsulation conditions in the study were optimized using three factor-three level response surface method.

These parameters are the alginate gel concentration, chitosan ratio and the emulsion flow rate from the syringe pump. Afterward, the effects of these parameters on size, shape and stability of microcapsules were analyzed. Encapsulation conditions optimized using response surface methodology.

Capsules were freeze-dried. Optical microscopy and scanning electron microscopy images were reviewed the images are processed to calculate size distributions.

As a consequence, an encapsulated carotenoid extract which is resistant to food processes; stable during shelf life; heat, light and oxygen stable, will be produced from pumpkin pulp waste used as animal feed. The obtained project outputs will be used as a functional food additive and as a natural colorant.

**Keywords:** Encapsulation, carotenoids, response surface method, pumpkin

### INTRODUCTION

Carotenoids are fat-soluble natural compounds found in a variety of foods. Although there are more than 600 compounds in the carotenoid group, the most known are  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, lutein and zeaxanthin.

All carotenoids can bind free radicals, which are due to their reaction with in Coupled Oxygen or radicals and repressing them. For this reason, among the antioxidant components found in fruits and vegetables, carotenoids are in the first place (Shi et al., 2004; Bohn, 2008) and it is stated that the amount of carotenoid taken in diet is important due to the inability of human and animals to synthesize carotenoid.

Pumpkin fruit in the *Cucurbitaceae* family, it is located in the edible vegetable group. Fruits in human nutrition, food and cosmetics industry, seeds can be used as a snack.

Pumpkin is rich in minerals such as fiber, calcium, potassium, phytosterols, polyunsaturated fatty acids, antioxidant vitamins such as carotenoid and tocopherol, and trace elements such as zinc and its sodium content is very low (Xanthopoulou et. Al. 2009). At the same time, the total solids content varies between 7-10% (Gözükara 2013). 100 g pumpkin has been reported to contain approximately 3500-4000 mcg  $\beta$ -carotene. Its bioactive components and chemical structure are very suitable for functional food production.

Today more and more active food ingredients are being used in new food products and methods are being sought to integrate and maintain these ingredients in the products (Ivanova et.al, 2005). In line with the reasons listed above, encapsulation technology has been used for the protection, controlled release and prolongation of shelf life of active lipophilic food components used in functional foods Encapsulation is the process of trapping this material in a membrane by forming a thin coating around a solid fraction, liquid droplet or gas.

Carotenoids are insoluble in water, very sensitive to environmental factors such as light, temperature and oxygen, limiting their addition to foods and beverages. It has been shown in various studies that emulsion systems increase the solubility, stability and bioavailability of lipophilic compounds. It is noted that the oil in water emulsion system may be used to encapsulate carotenoids and may be added to a water-based food. Qian et al. (2012) investigated the chemical and physical stability of  $\beta$ -carotene nanoemulsions with different pH, temperature and emulsifiers. They found that the color of encapsulated  $\beta$ -carotene changed as the storage time and temperature increased, especially the color loss around pH 3 was greatest. In the literature, there are also encapsulation studies performed by spray dryer using modified starch, gum arabic, maltodextrin, gelatin, sucrose, soy protein isolate. It is stated that the stability of lycopene increases with these emulsifying agents (Rocha et al., 2012). Proteins, whey protein, gum arabic, guar gum, carrageenan, pectin are generally used to improve emulsion stability of oil in water emulsions. Options such as sunflower oil, triglycerides, corn oil can be used to increase the emulsion stability of carotenoids.

Dropping or ionic gelation method is a practical and economical method and it is preferred in laboratory applications since it is not suitable for producing large quantities of products. In this method, the active ingredient with the polymer solution is homogenized and dropped into the dispersing phase (such as  $\text{CaCl}_2$ ) to obtain spherical gel particles by syringe. The dropping method is the method used to obtain calcium-alginate particles, and cross-linking is based on the principle of substitution of calcium in the  $\text{CaCl}_2$  molecule and sodium in the sodium alginate molecule (Matalanis et al., 2011).

The electrical attraction between positively charged chitosan molecules and negatively charged alginate molecules is used to form the chitosan-alginate ionic complex.

Özgen (2014) encapsulated lycopene using the ionic gelation method using sodium alginate in his doctoral study. He used the obtained microcapsules in the cake and determined that lycopene stability and antioxidant activity were preserved.

There are several studies in the literature on the encapsulation of color pigments. In one study, the lycopene extract was microencapsulated with emulsion system as 4.5% gelatin, 10% polyglutamic acid and 4.8% lycopene extract (Chiu, 2007). In a study conducted in 2013, mulberry anthocyanins were encapsulated with ionic gelation technique using alginate and chitosan, and process conditions were optimized using the response surface method.

Mulberry leaf extract by complex investigators (Peanparkdee et al., 2016), ginger extract (Simon-Brown et al., 2016), olive pomace (Paini et al., 2015), propolis (Paini et al., 2015) Spinelli et al., 2015), blueberry (Flores et al., 2014; Jiménez-Aguilar et al., 2011) and grape pulp extract (Spigno et al., 2013) by spray drying method, blackberry and raspberry freeze-drying method (Rosa et al., 2014), and encapsulation methods, conditions and bioactivities of active ingredients were studied.

## **MATERIALS AND METHODS**

In the research, fresh pumpkin obtained from the local market in Turkey as raw material source. The reagents and solvents used were of analytical purity and were obtained from Merck, Sigma and Carlo Erba.

### **Extraction**

A lyophilizer (Labconco Freezone 2.5, USA) was used to dry the samples. The shredded and dehydrated samples were placed in drying chambers and the samples were dried under vacuum at  $-52\text{ }^\circ\text{C}$ .

The dried pumpkin pulps were pulverized in laboratory type grinder (Waring Blender) to perform extraction operations and stored in dark conditions under refrigerator conditions until analyzed.

The extraction was carried out in a temperature-controlled shaking water bath (Memmert, WNB 14, Germany). Acetone: ethyl acetate in a 1:1 ratio, was used as a solvent. Solvents were removed in a rotary evaporator. This carotenoid extract was then used as an active ingredient in the microencapsulation.

### **Microencapsulation of Pumpkin Extract**

The aim in this part of the study is to obtain capsules loaded with pumpkin extract by encapsulation technology. Extract-loaded calcium alginate capsules were produced by ionic cross-linking method. Capsules also coated with chitosan to reduce extract loss. In the meantime, optimization studies were performed under encapsulation conditions.

Box-Behnken design based on response surface method was used to optimize the encapsulation conditions. With this optimization, the pumpkin extract is encapsulated under suitable encapsulation conditions to make it more stable.

## Production of Alginate-Chitosan Membrane Carotenoid Core Microcapsules by Inverse Gelling Method

Based on the literature review, various parameters have been tried to determine the optimum encapsulation conditions. The most important factors in the encapsulation process are how much of the component desired to be encapsulated within the capsule, the size, stability and encapsulation efficiency of the capsules.

### Emulsion solution

Commercial corn oil was used as oil in the preparation of the emulsion medium. 0.3 g of extract was dissolved in 3 mL of corn oil. The oily extract was dispersed in sodium alginate solution to form the emulsion. The solution was stirred for 2 min at 12000 rpm with an ultra-turrax stirrer to provide a stable emulsion.

### Gelation solution

1% calcium chloride solution was used as crosslinker in the preparation of alginate capsules.

Chitosan solution was prepared in 1 g/L glacial acetic acid solution (pH=3.25). As the gelling solution, calcium chloride solution mixed with a chitosan solution in different ratios was used.

In order to optimize the production of alginate-chitosan microcapsules, the alginate gel concentration (0.5, 1 and 1.5%) was changed by changing the flow rate of the emulsion from the syringe pump (0.5, 1 and 1.5 mL / min) and the chitosan concentration (0.1, 0.2 and 0.3%) in the dropping solution. procedures were repeated.

**Table 1.** Experimental Design Variables

Independent Variables	RSM LEVELS		
	-1	0	1
Alginate gel concentration (%)	0.5	1	1.5
Chitosan Ratio (%)	0.1	0.2	0.3
Flow rate of emulsion from syringe pump (mL/min)	0.5	1	1.5

The effects of these parameters on the size, shape and stability of alginate microcapsules were evaluated. In the evaluation of these effects; The design of the response surface experiment which was created for the encapsulation process was applied and the model is given in Table 1 and Table 2.

**Table 2.** Three Factor-Three Level Box-Behnken Response Surface Trial Pattern Generated for the Encapsulation Stage

Trial Points	Coded Values			Real Values		
	Alginate Gel Concent. (%)	Chitosan Ratio (%)	Flow Rate (mL/min)	Alginate Gel Concent. (%)	Chitosan Ratio (%)	Flow Rate (mL/dk)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0	-1	-1	1.5	0.5	1.0
2	0	1	1	1.5	1.5	2.0
3	-1	1	0	1	1.5	1.5
4	0	0	0	1.5	1	1.5
5	-1	0	1	1	1	2.0
6	-1	-1	0	1	0.5	1.5
7	0	1	-1	1.5	1.5	1.0
8	1	1	0	2	1.5	1.5
9	0	0	0	1.5	1	1.5
10	1	0	-1	2	1	1.0
11	0	0	0	1.5	1	1.5
12	1	-1	0	2	0.5	1.5
13	0	-1	1	1.5	0.5	2.0
14	1	0	1	2	1	2.0
15	-1	0	-1	1	1	1.0

The experiment was performed at room conditions and the carotenoid-alginate emulsion was dripped with a programmable syringe pump. The dropping solution, CaCl<sub>2</sub> solution (containing 0.5%, 1%, 1.5% chitosan) was continuously stirred at 500 rpm with a magnetic stirrer.

After the encapsulation was complete and the gels formed, the capsules were filtered through a strainer and stored at +4 ° C in CaCl<sub>2</sub> solution until dried.

### Encapsulation Efficiency

The yield of the capsules was determined gravimetrically.

### Optical Analysis of Capsules and Average Diameter

Optical analysis of the lyophilized and wet capsules produced was carried out by processing the images taken with the Leica EC3 digital camera optical microscope camera in the LAS EZ software program.

### Core Leakage of Capsules

Capsules were freeze-dried for 24 hours for core leakage measurement. In this part of the study, capsule core leakage measurement was performed by making modifications in the method used by Lopez *et al.* The capsules were first kept in the oven at 40 ° C for 1 hour, then at 50 ° C for 1 hour and at 60 ° C for the last 1 hour.

The gravimetric reduction in capsule weight in the measurements taken gives the amount of capsule core leakage.

## RESULTS and DISCUSSION

The results of the model obtained according to the experimental design with the response surface method which revealed the effect of alginate concentration, flow rate and chitosan concentration on encapsulation efficiency, capsule diameter and seed leakage in pumpkin extract loaded alginate-chitosan capsules are given in the figures and tables.

### Encapsulation Efficiency

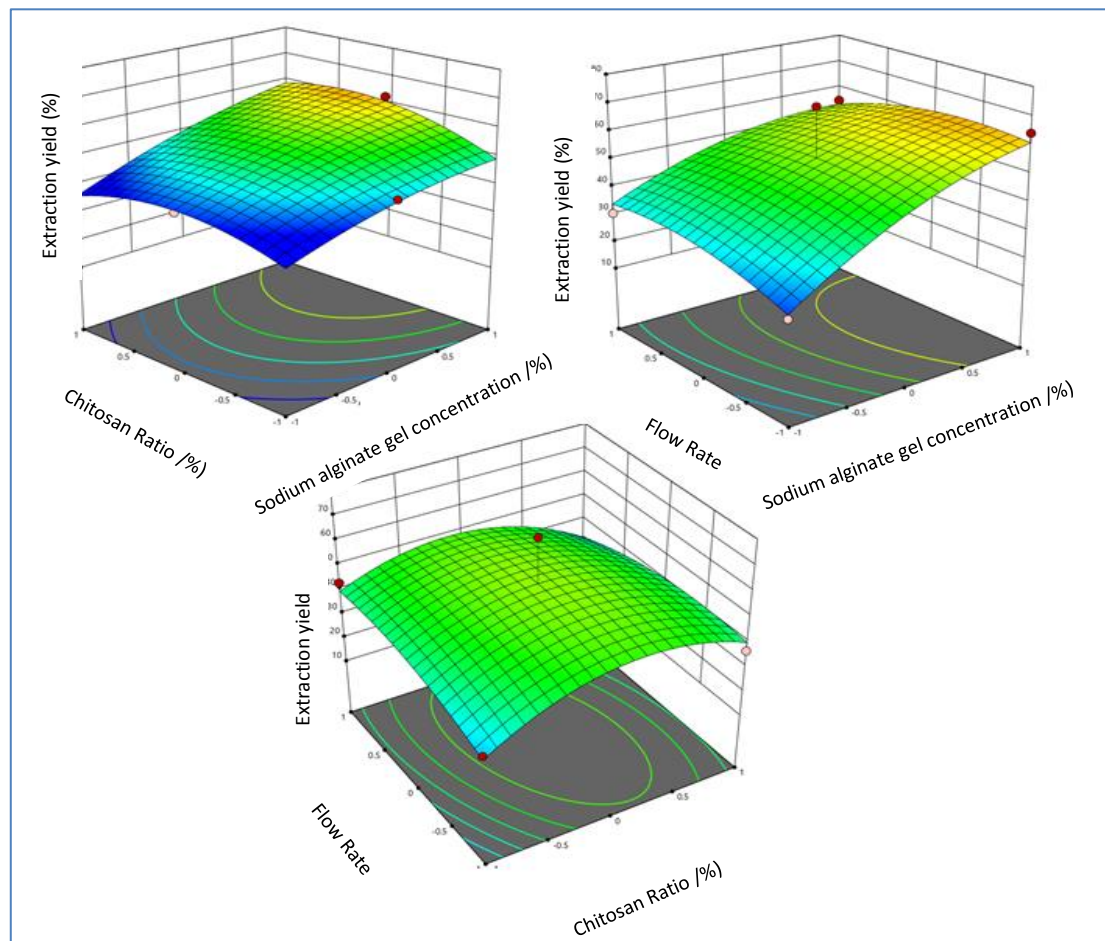
**Table 3.** Results of Variance Analysis of the Effect of Process Variables on the Change in Encapsulation Efficiency

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-value Prob
Model	2532,07	9	281,34	2,40	0,1736
A-Sodium-Alginate Gel cons. (%)	1564,13	1	1564,13	13,36	0,0147
B-Chitosan Ratio (%)	4,40	1	4,40	0,0376	0,8539
C-Flow Rate (mL/min)	1,64	1	1,64	0,0140	0,9103
AB	83,12	1	83,12	0,7097	0,4380
AC	68,34	1	68,34	0,5835	0,4794
BC	73,27	1	73,27	0,6256	0,4648
A <sup>2</sup>	112,77	1	112,77	0,9629	0,3715
B <sup>2</sup>	626,31	1	626,31	5,35	0,0687
C <sup>2</sup>	70,78	1	70,78	0,6044	0,4721
Residual	585,58	5	117,12		
Lack of Fit	104,63	3	34,88	0,1450	0,9245
Pure Error	480,95	2	240,47		
Cor Total	3117,64	14			

Y=+53,06+13,98A+0,74 B+0,45C+4,55AB-4,13AC-4,27BC-5,52 A<sup>2</sup>-13,024B<sup>2</sup>-4,37C<sup>2</sup>  
R<sup>2</sup> = 0,8122

As seen in Table 3, the linear effect of the sodium-alginate ratio level and quadratic effect (p <0.01) was found to be significant. Encapsulation efficiency increased with an increasing sodium-alginate ratio. It was concluded that the effect of chitosan ratio and flow rate on encapsulation efficiency was not significant.





**Figure 1.** Three-Dimensional Surface Graphs of The Change in Extraction Efficiency

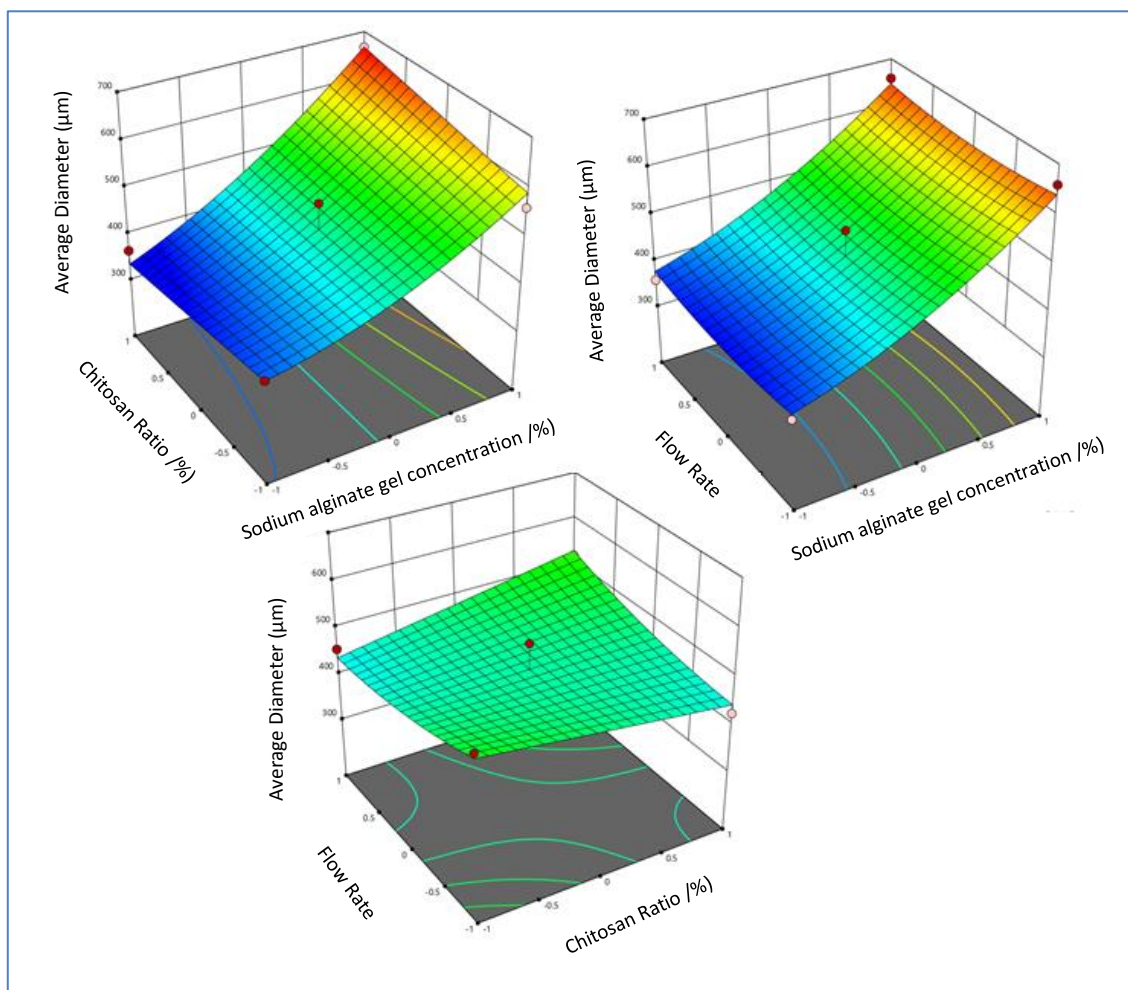
### Average Diameter of Capsules

When the results of variance analysis of the effect of process variables on the change in diameter of capsules were examined (Table 4 and Figure 2), the linear effect of sodium-alginate ratio level and the quadratic effect was found to be very important ( $p < 0.01$ ). The effect of the general model was also found to be statistically significant. The coefficient of determination of the model was found to be 0.9452.

**Table 4.** Results of Variance Analysis of the Effect of Process Variables on the Change in Average Diameter

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-value Prob
Model	1,595E+05	9	17723,34	9,58	0,0114
A-Sodium-Alginate Gel cons.(%)	1,446E+05	1	1,446E+05	78,16	0,0003
B-Chitosan Ratio (%)	304,07	1	304,07	0,1644	0,7019
C-Flow Rate (mL/min)	78,42	1	78,42	0,0424	0,8450
AB	4208,81	1	4208,81	2,28	0,1918
AC	1,23	1	1,23	0,0007	0,9804
BC	6364,32	1	6364,32	3,44	0,1228
A <sup>2</sup>	3306,87	1	3306,87	1,79	0,2388
B <sup>2</sup>	0,4493	1	0,4493	0,0002	0,9882
C <sup>2</sup>	864,33	1	864,33	0,4672	0,5247
Residual	9249,87	5	1849,97		
Lack of Fit	3721,95	3	1240,65	0,4489	0,7448
Pure Error	5527,92	2	2763,96		
Cor Total	1,688E+05	14			

$Y = +464,14 + 134,44A + 6,17B + 3,13C + 32,44AB + 0,5551AC + 39,89BC + 29,93A^2 - 0,3488B^2 - 15,30C^2$   
 $R^2 = 0,9452$



**Figure 2.** Three-Dimensional Surface Graphs of The Change in Average Diameter

### Core Leakage of Capsules

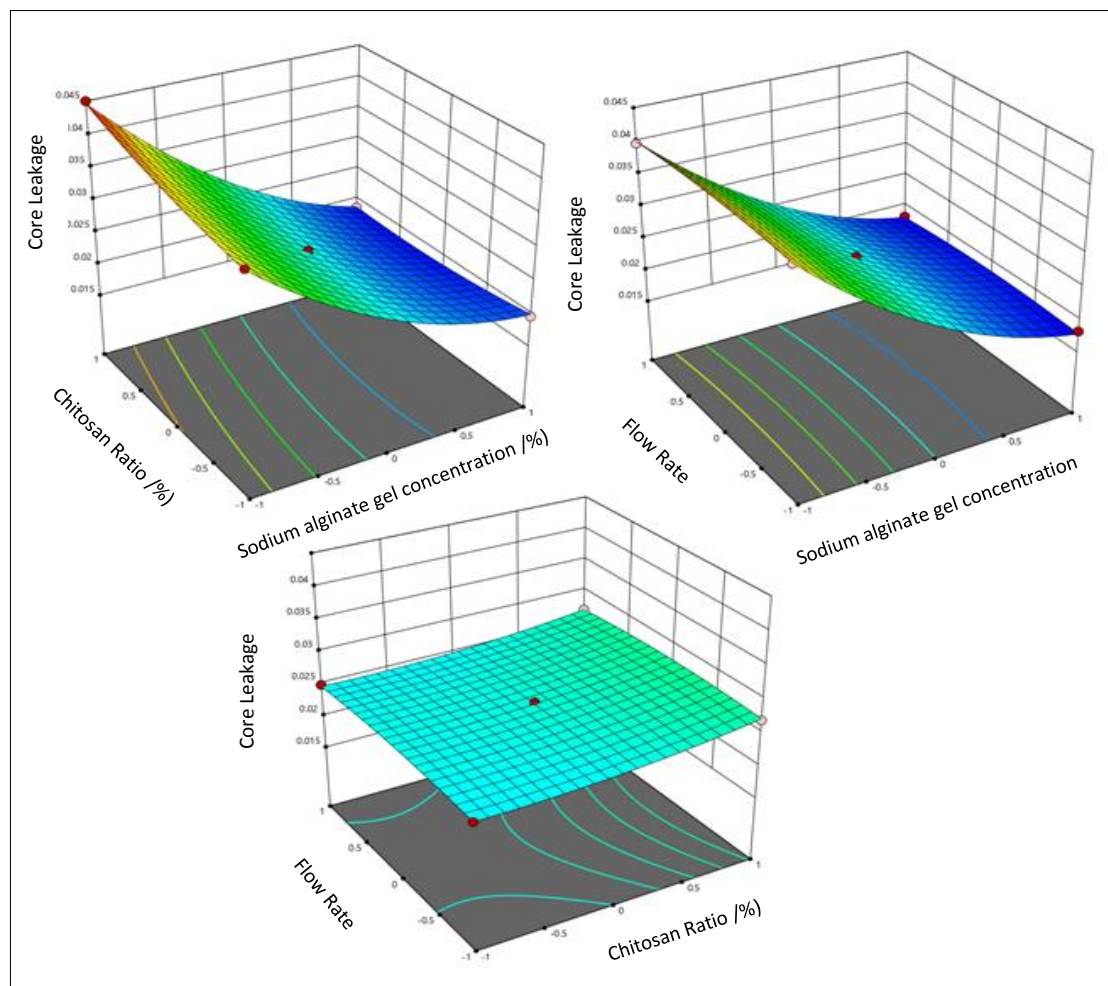
Matrix leaking from the nucleus was detected at a significant concentration of 0.5% sodium alginate. This is due to the weakness and porous structure of the membrane. However, 1%, 1.5% of the alginate-Ca-chitosan gel structure of the membrane at the applied temperature values of the content of the core is quite well and is seen.

**Table 4.** Results of Variance Analysis of the Effect of Process Variables on the Change in Core Leakage

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-value Prob
Model	0,0011	9	0,0001	696,71	< 0,0001
A-Sodium-Alginate Gel cons.(%)	0,0010	1	0,0010	5760,36	< 0,0001
B-Chitosan Ratio (%)	0,0000	1	0,0000	70,00	0,0004
C-Flow Rate (mL/min)	1,250E-09	1	1,250E-09	0,0073	0,9353
AB	0,0000	1	0,0000	84,20	0,0003
AC	2,500E-09	1	2,500E-09	0,0146	0,9086
BC	9,000E-08	1	9,000E-08	0,5248	0,5013
A <sup>2</sup>	0,0001	1	0,0001	329,57	< 0,0001
B <sup>2</sup>	2,290E-06	1	2,290E-06	13,35	0,0147
C <sup>2</sup>	1,501E-06	1	1,501E-06	8,75	0,0316
Residual	8,575E-07	5	1,715E-07		
Lack of Fit	6,775E-07	3	2,258E-07	2,51	0,2977
Pure Error	1,800E-07	2	9,000E-08		
Cor Total	0,0011	14			

Y=+0,0257-0,0111A+0,0012B-0,0000C-0,0019AB++0,0000AC-0,0002BC+0,0039A<sup>2</sup>+0,0008B<sup>2</sup>-0,0006C<sup>2</sup>  
R<sup>2</sup> = 0,9992

According to the model data obtained, the most effective process parameter of the sodium alginate concentration on the leakage of the core is observed ( $p < 0.01$ ). The effect of chitosan ratio on extract trapping performance in the core matrix was found to be statistically significant. The flow rate was not an effective parameter on core leakage ((Table 5 and Figure 3).



**Figure 3.** Three-Dimensional Surface Graphs of The Change in Core Leakage

## CONCLUSION

In ionic gelation method, microcapsules with high efficiency, liquid core, spherical shape and narrow distribution graph can be formed. This method is applicable in room conditions, does not require the use of organic solvents, particle size control does not require pH or temperature control is one of the most important advantages of food applicability (Rao and McClements, 2011; Gazori et al., 2009). In this study, sodium alginate and chitosan were used as coating material and they are very suitable substance for encapsulation applications in foods (Günay, 2010).

Findings; Within the scope of the study, the applied methods, the developed optimization method and the encapsulation strategy have successfully achieved the main objective of the study.

In this study, similar results were obtained with the literature. Encapsulation is a good method of protecting the active ingredient.

When all the results were examined, it was found that the most effective parameter on encapsulation efficiency, capsule diameter and core leakage was coating material concentration.

## REFERENCES

- Bohn, T., 2008. Bioavailability of non-provitamin A carotenoids. *Current Nutrition & Food Science*, (4) 4: 240-258.
- D.J. McClements, J. Rao Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. 2011. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51 (4), pp. 285-330
- Gazori, T., Khoshayand, M. R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., Haririan, I., 2009. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as an antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, 77; 599–606.
- Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T et al. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 95: 145-150, 2005
- Lopez, M. D., Pascual-Villalobos, M. J. and Poncelet, D. 2010. Controlled-release of linalool through calcium alginate capsules. XVIII International Conference on Bioencapsulation, 1-2, Porto, Portugal
- Matalanis, A., Jones, O.G., McClements, D.J., 2011. Structured biopolymer based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25, 1865-1880.
- Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A. 2015. Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying; A study of operative parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 62 (1); 177-186.
- Peaparkdee, M., Iwamoto, S., Borompichaichartkul, C., Duangmal, K., Yamauchi, R. 2016. Microencapsulation of bioactive compounds from mulberry (*Morus alba* L.) leaf extracts by protein-polysaccharide interactions. *International Journal of Food Science & Technology*, 51 (3); 649-655.
- Qian, C, Decker, EA, Xiao, H, McClements, DJ. 2012. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on  $\beta$ -carotene bioaccessibility. *Food Chem* 135( 3): 1440– 7.
- Rocha, G.A., Favaro-Trindade, C.S., Raimundo, C., Grossoa F., 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioproducts Processing*, (9): 37–42.
- Rosa, C.G., Borges, C.D., Zambiasi, R.C. . Rutz, J.K Luz, S.R. Krumreich, F.D. M.R. Nunes, 2014. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*) *LWT – Food Science and Technology*, 58, 527-533
- Shi J., Qu Q., LeMaguer M., Kakuda Y., Yeung D., Jiang Y., 2004. Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. *Critical Research of Food Science and Nutrition*, 44, 7-8: 559-573 s.
- Simon-Brown, K., Solval, K. M., Chotiko, A., Alfaro, L., Reyes, V., Liu, C., Dzandu, B., Kyereh, E., Barnaby, A. G., Thompson, I., Xu, Z., Sathivel, S. 2016. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology. *LWT-Food Science and Technology*, 70; 119-125.
- Y.T. Chiu, C.P. Chiu, J.T. Chien, G.H. Ho, J. Yang, B.H.Chen Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly( $\gamma$ -glutamic acid) as carrier 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 13, 5123-5130.
- Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E, Antonopoulou S 2009. Antioxidant and lipoxygenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts. *Food Res. Int.*, 42: 641–646.

## Acid blue 29 adsorption on the effect of pH and poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub>

Gözde Onat, Şahin Özel, Ali Kara

Department of Chemistry, University of Bursa Uludağ, Bursa Turkey

### Abstract

AZO dyestuffs are synthetic organic compounds which can be synthesized from 1862, which contain azo groups in their compounds (-N = N-) used in textile industry. There are approximately 3500 azo dyes in the world and constitute 65% of the dyestuffs in the world.

As a result of scientific studies on the damages of products produced with the use of azo dyes, it has been observed that these products can be absorbed into the body through direct contact and prolonged use through the skin. Allergenic, carcinogenic and mutagenic effects occur over time. Reactive dyestuffs 10-50% cannot react with textile fibers during dyeing of textile product and hydrolyzed into the waste water into the ecosystem. These dyestuffs with a complex aromatic structure are toxic and carcinogenic molecules. Its colorful release of wastes to the environment, aesthetic pollution in addition to water eutrophication and perturbation create problems such as. For creatures living in seas, lakes and rivers show mutagenic effects. In addition, dyestuff molecules in the wastewater phase hazardous side by reaction with oxidation, hydrolysis or other chemicals create products.

In this study, the poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub> addition method was used for the removal of aqueous solutions containing an azo dye, Acid Blue 29.

**Keywords:** Acid blue 29, adsorption, poly(DVB-Vpirid)-TiO<sub>2</sub>, azo dyes

**1. INTRODUCTION:** Synthetic dyes are extensively used in many industries, such as textiles, printing, paper, leather, rubber, food, cosmetics, plastics, pharmaceuticals, and photography. Large quantities of industrial wastewater containing synthetic dyes are directly discharged into water bodies without treatment, which has caused serious pollution problems in many areas and has been a cause of concern because of the potential health hazards of dyes. Dye-colored wastewater also affects aesthetics and water transparency, as well as the natural equilibrium of aquatic systems resulting from reduced oxygenation of the water bodies, and low photosynthetic activity and viability of aquatic plants due to water coloration. Therefore, the removal of synthetic dyes from contaminated water and wastewater is presently recognized to be essential to protecting aquatic and terrestrial environments and public health and well-being. However, dye-polluted wastewater is among the most difficult industrial wastewater types to treat because most of the synthetic dyes are recalcitrant organic molecules that are highly resistant to microbial degradation, extremely soluble in water, and resistant to heat, light, and oxidizing agents. Effluent generated from textile effluent is highly coloured because of the residual dye in it which does not attach to the fabric. 10 - 15 % of dye utilized for the process remains in effluent because of the non attachment to the fabric [1].

Different techniques have been used to remove dye from wastewater like physical methods (adsorption by various adsorbents, membrane filtration, ion exchange, irradiation and electro-kinetic coagulation), chemical methods (oxidative process like advance oxidation process, sodium hypochloride and electrochemical) and biological methods (anaerobic bacteria culture, white rot fungi). Adsorption method has been proved as one of the best treatment technology for dye removal [2 - 6]. Many researchers have integrated two or more techniques to obtain better result [1, 6]. In this study, adsorption method was used to investigate AB 29 dye removal.

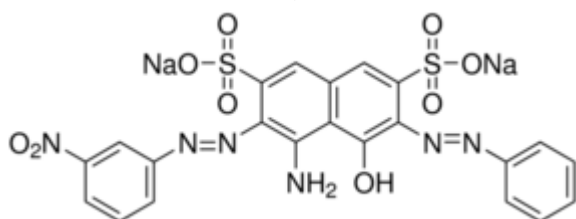


Fig. 1. Structure of Acid Blue 29

## 2. EXPERIMENTAL METHODS

### 2.1 Dyestuffs:

Acid blue 29 commercial available textile dyestuffs were used in this study. The characteristics and chemical structures of the dyestuffs are listed in Table I and Figure 1, respectively.

TABLE I. The Physical and Chemical Characteristics of the Dyes

Dye(C. I Name)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Purity(%)	Molecular Weight(g/mol)	Chemical Structure
Acid Blue 29	602nm	40	616.49	AB29

Different concentration of dye solution were prepared from a stock of 5,10,15,20,30,40,50 mg/L solution. The various concentrations were prepared from the stock solution, pH of the solutions was adjusted using 0.1 M HCl and 1 M NaOH.

### 2.2. Prepare of the solution

50 ppm stock solution for Acid Blue 29 dyestuff used in the experiment it was prepared. To determine the optimum pH, solutions were prepared at different pH and optimum pH = 3.7 and 11 were determined. UV-vis spectrophotometer in the range of 200-800 nm absorbance maximum by wavelength scanning,  $\lambda_{\max}$  = 602 nm it was measured. All spectroscopic studies were performed at this wavelength. Stock dilutions from the solution (5-10-15-20-30-40-50 ppm) at concentrations The solutions were prepared and the calibration graph was prepared and the regression value was calculated. Dilutions were made with the solvent at the pH of each solution.

### 2.3. Calibration of AB29 dyestuff

The pH of the dyestuff can be studied by measuring for each pH at pH 3-11 and the concentration range was determined. At pH = 3.7 and 11,  $R^2$  values were close to 1 and studies were performed in this range.

### Effect of pH on dye

In the case of acid dyeing, a low pH helps to form the hydrogen bonds that attach acid dyes to protein fibers, such as silk and wool, as well as nylon. Acid dyes do not work on cellulose fibers such as cotton. Optimal pHs vary according to the specific type of acid dye. Some require only a very mild acid; others a more significantly low pH. Silk can be dyed at low pH (acidic) or high pH as with cellulose fibers; wool can only be dyed at low pH because it is damage by high pHs. Cellulose fibers, such as cotton, linen, rayon, etc., cannot be dyed at all at low pHs. Effect of initial pH of solution for a selection in the pH adsorption composition, solutions were prepared at different pH values. It ranges from 3.0 to 11.0. Removal of the acid dye AB29 decreased monotonously as the pH increased. Optimized pH 3 is accepted for acid blue.

## 3. Result and Discussion

### 3.1. pH Effect on Adsorption of AB29 Dyestuff

pH is one of the most important parameters in dye removal. Changes of solution pH can change the chemical behaviour of surface functional group, surface charge of sorbent, and the degree of ionization of adsorbate. At low pH, the functional groups on the adsorbent surface are protonated. The decrease of pH causes a decrease in the surface charges, and likely more interactions due to electrostatic attraction between negatively charge dye anions and positively charged adsorption sites.

#### 4. Conclusion

pH is very important factor affecting the adsorption process. In this study, the linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in detail in pH (3-11). To determine the optimum pH and pH was changed in the range of (3-11). The maximum adsorption pH was calculated. The maximum adsorption amount was found to be at pH 3,7 and 11. For Acid Blue 29 (AB29), the amount of adsorbent on which the dyestuff and polymer [DVB-Vpirid] -TiO<sub>2</sub> interact with other was calculated to be 50 mg.

#### References

1. Kyzioł-Komosiński, J., Rosik-Dulewska, C., Pajak, M., Krzyżewska, I., Dzieniszewska, A. (2014). Adsorption of anionic dyes onto natural, thermally and chemically modified smectite clays. Polish Journal of Chemical Technology, 16, 4, 33-40, 10.2478./pjt-2014-0066
2. Özcan, Safa A., Erdem, B., Özcan, A., (2005). Adsorption of Acid Blue 193 from aqueous solutions onto BTMA-bentonite. Science Direct, 266; 73-81
3. Markandeya, S.P. Shukla and D. Mohan., (2017). Toxicity of Disperse Dyes and its Removal from Wastewater Using Various Adsorbents:A Review. Research Journal of Environmental Toxicology
4. J.Shore "Colorant and Auxiliaries. Organic Chemistry and Application Properties", wyd. Society of Dyes and Colourists 1999, t.I, str.196
5. Boumediene, M., Benaïssa, B., George, B., St. Molina, Merlin, A., (2018). Effects of pH and ionic strength on methylene blue removal from synthetic aqueous solutions by sorption onto orange peel and desorption study. Journal of Materials and Environmental Sciences, Volume 9, Issue 6, Page1700-1711
6. Ahmadi, M., Ardakani, Hamed M., Zinatizadeh, Akbar Z., (2015). Optimization and kinetic evaluation of acid blue 193 degradation by UV/peroxydisulfate oxidation using response surface methodology. Advances in Environmental Technology 2 ,page 59-68
7. B.E. Kaplan, A. Kara and H.A. Eren, (2019). Linear regression analysis of pH effects on reactive black 5 adsorption of poly(divinylbenzene-N-vinyl imidazol) microbeads. International conference on applied analysis and mathematical modeling proceedings book, page 97-103.
- (8) Özel, Ş. and A. Kara, Manyetik özelliğe sahip fonksiyonel polimerlerle Sentetik Asit Red 114 boyasının sulu çözeltilerden uzaklaştırılması ve fizikokimyasal parametrelerin incelenmesi, in 4. Uluslararası Lif ve Polimer Araştırmaları Sempozyumu. 2018: Bursa. Türkiye.

## Hydrothermal Fructose Conversion over Sulfated Zeolite: Effect of Acid Concentration

Emir Zafer Hoşgün<sup>1</sup>, Halit L. Hoşgün<sup>2</sup>, Berrin Bozan<sup>1</sup>

1 Eskişehir Technical University, Engineering Faculty, Chemical Engineering Department, Eskişehir, Turkey.

2 Faculty of Natural Sciences, Architecture and Engineering, Department of Chemical Engineering, Bursa Technical University, Bursa, Turkey.

Corresponding author e-mail: ezhosgun@eskisehir.edu.tr

### Abstract

In this study, the influence of acid concentration on synthesis of zeolite catalysts for dehydration reaction of fructose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) was surveyed. 1M, 2M and 3M sulphuric acid treated zeolite was synthesized and used as an efficient catalyst for this reaction. All catalyst synthesis treatments were conducted at 40 °C for 1 hour. Catalysts were characterized by textural properties, X-ray fluorescence (XRF) and X-ray powder diffraction (XRD) technique. Synthesized catalysts were used in the hydrothermal conversion of fructose. Catalytic hydrolysis were carried out in a high temperature-high pressure stainless steel reactor (Parr, USA) at 180°C. Samples were taken at time intervals of 30-60-90-120-150-180 minutes. Compositions of liquid products were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC). Maximum HMF yield was obtained as 24.43% with 2M sulphuric acid treated zeolite for 30 minutes conversion time. Yield for HMF production under these conditions was 24.43%. Due to HMF was not stable at high temperatures, it was converted to Levulinic acid (LA) and Formic acid (FA). Highest LA yield (36.33%) was obtained with 3M sulphuric acid treated zeolite for 150 minutes reaction time. Yield for FA production at these conditions was 42.94%.

**Keywords:** Zeolite, Hydrothermal Conversion, Fructose, HMF, Solid acid catalyst

### 1. INTRODUCTION

The decrease of fossil fuel reserves and the deterioration of the environment are driving people to seek sustainable resources. Increase in energy demand forces people to find alternative and sustainable resources to produce fuels and chemicals because of the rising world population, decreasing fossil fuel sources, and CO<sub>2</sub> emission problems. Biomass is a renewable raw material that is one of the most important alternatives to crude oil on the earth; include vegetable oils, starches and sugars from plants. Production of valuable chemicals from biomass is alternative and environmentally process compared to petroleum-based process (Wang et al 2019).

Biomass have equivalent worth with petroleum about production of fuel and chemicals (Teimouri et al 2015). Lignocellulose consists of hemicellulose, cellulose and lignin. Lignocelluloses are organic compounds that are commonly found in biomass and can be found easily. So, they are very cheap, but production of energy and chemical production from lignocellulosic raw materials are not economically (Kazi et al 2011)

These molecules include sugar molecules as fructose and glucose, furans as furfural and HMF, acids as levulinic and formic. Converting from cellulose to monosaccharides which is glucose, fructose and galactose is the most sufficient way for the production of valuable chemicals (Thapa et al 2017).

Fructose is a monosaccharide. Fructose bonded with glucose, another monosaccharide, forms sucrose, or table sugar. Fructose also occurs naturally in fruits. Fructose is absorbed from the small intestinal as the free monosaccharide. (Mester 1955). Fructose dehydration is also reported as 40 times faster than glucose dehydration (Osatiashiani et al 2015).

Clinoptilolite is a zeolite as a heulandite. Both zeolites show similar properties as tetrahedral, aluminosilicate framework while differ in the Si/Al ratio and the alkali dominant composition. Clinoptilolite is the most common zeolite occurring in nature which is a mineral discovered already in 1890 in the USA (Dziedzicka et al 2016).

The aim of this study was to investigate the hydrothermal conversion of fructose in the presence of clinoptilolite modified at different sulphuric acid concentrations. Sulphuric acid modified zeolite samples were characterized by XRF, XRD and BET techniques.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Materials

All chemicals used were standard analytical grades. The standard reagents of fructose, HMF, Formic acid, Levulinic acid were purchased from Sigma-Aldrich. The Aminex HPX 87H column was purchased from Bio-Rad Laboratories (California, USA).

### 2.2 Catalyst preparation and characterization

Clinoptilolite samples taken from Gördes, Manisa-TURKEY. Before the experiments, the raw zeolite was ground and sieved and then washed with distilled water. The chemical composition of clinoptilolite was listed in Table 1.

**Table 1.** Chemical composition of Natural Zeolites

SiO <sub>2</sub> %	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> %	TiO <sub>2</sub> %	CaO %	MgO %	Na <sub>2</sub> O %	K <sub>2</sub> O %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	SO <sub>3</sub> %	LOI* %
68.00	11.60	2.00	0.12	3.27	1.07	0.84	5.68	0.03	0.18	7.21

\* Loss of ignition

Modification of clinoptilolite with different sulfuric acid concentrations (1, 2, 3M) was carried out under 323 K and 1 hour conditions. In a typical procedure, 2 g of the clinoptilolite was dispersed in a magnetically stirred 50 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in a round-bottom flask with reflux condenser. After the desired modification time, the product filtered off, washed with water and then dried.

Crystal structure of sulphuric acid modified zeolites were analyzed by X-ray powder diffraction (XRD) on a Bruker D8 Advance in scanning range of 2–50 (2θ) at a scan speed of 0.5 °/min. textural properties such as surface area, pore volume and pore size of samples were determined by using Micromeritics Tristar 3020 at 77 K temperature. Before measurement, all samples were degassed at 363 K for 1 hr and then at 573 K for 24 hr under vacuum. Chemical composition of sulphuric acid modified clinoptilolite samples were recorded by Rigaku - Supermini 200 X-ray fluorescence spectroscopy (XRF).

### 2.3 Catalytic conversion process

The catalytic conversion processes were carried out in stainless steel (PARR, USA) reactor that has resistant to high temperature and high pressure. The fructose conversion was conducted under water media. Solvent was kept liquid under 10 bars of nitrogen pressure. The experiments realized by adjusting to the reactors 180°C and this temperature was considered the starting point of the reaction. Liquid samples were taken at 15-30-60-90-120-150-180 minutes. The heater was turned off after the last sample was taken. When the temperature of the reactor decreased to 60 °C, the reactor was opened and the solid-liquid was removed.

### 2.4 Analytical methods

Fructose, HMF, levulinic acid, formic acid amounts were determined from the filtrate of liquid samples by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Agilent 1100). The HPLC system was mainly equipped with a Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm), and a refractive index detector. The analytical column was operated at 60°C with 0.2 μm filtered 0.005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution as the mobile phase. The mobile phase flow rate was 0.6 ml/min. Calculations were done by using the following equations:

$$\text{Fructose Conversion (\%)} = \frac{\text{amount of reacted fructose (mol)}}{\text{initial fructose amount (mol)}} \times 100 \quad (1)$$

$$5 - \text{HMF Yield (\%)} = \frac{\text{Produced 5-HMF (mol)}}{\text{initial fructose amount (mol)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Formic Acid Yield (\%)} = \frac{\text{Produced Formic Acid (mol)}}{\text{initial fructose amount (mol)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Levulinic Acid Yield (\%)} = \frac{\text{Produced Levulinic Acid (mol)}}{\text{initial fructose amount (mol)}} \times 100 \quad (4)$$

### 3. RESULTS and DISCUSSION

#### 3.1 Textural Properties

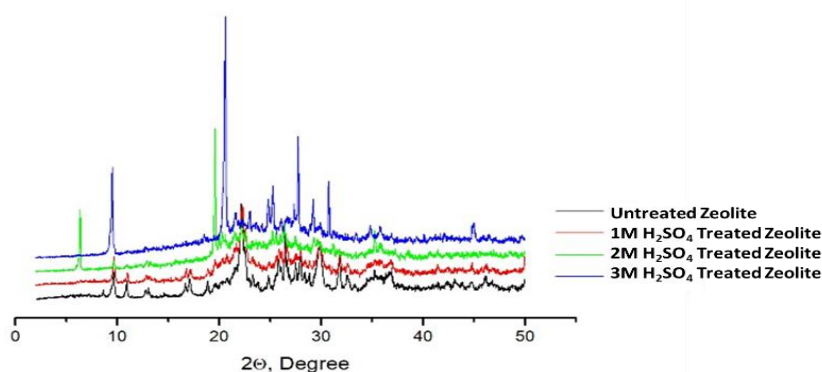
Surface area, pore volume and pore size values of raw and modified clinoptilolite samples with different concentrations of sulfuric acid are listed in Table 2. The surface areas of the samples modified at concentrations of 1, 2 and 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> decreased to 25.21, 4.14 and 0.64 m<sup>2</sup>/g, respectively. Similarly, pore volumes were also decreased from 0.061 to 0.007 cm<sup>3</sup>/g. Pore size of clinoptilolite samples increased by increasing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration.

**Table 2.** Textural Properties of untreated and acid treated zeolites

Sample	BET Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	BJH Pore Volume (cm <sup>3</sup> /g)	BJH Pore Size (Å)
Untreated Zeolite	43.21	0.093	142.45
1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	25.21	0.061	173.76
2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	4.14	0.028	394.14
3M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	0.64	0.007	886.81

#### 3.2 XRD Analysis

XRD patterns of raw and sulphuric acid treated samples are shown in Fig. 1. It is observed that the raw zeolite with characteristic peaks of 2θ = 9.8 (020), 11.7 (200), 23.6 (400), 27.5 (011) and 30.5 (440) maintains its crystal structure after modified sulfuric acid at different concentrations despite increasing sulfuric acid concentration.



**Fig. 1.** XRD diffraction patterns of zeolite samples

### 3.3. XRF Analysis

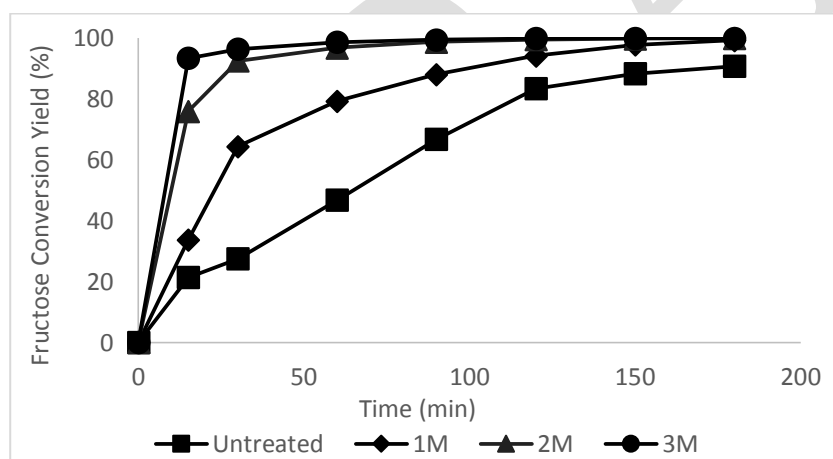
According to XRF results listed in Table 3, when the acid concentration is increased, the amounts of SiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> decrease because they dissolve. In contrast, the SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ratio is increasing. The amount of SO<sub>3</sub> permeating the structure increases with increasing concentration.

**Table 3.** XRF results of the samples

Sample	SiO <sub>2</sub> (%)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SO <sub>3</sub> (%)
Untreated Zeolite	73.10	13.2	5.54	0.285
1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	71.00	9.43	7.53	8.600
2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	51.80	6.55	7.91	34.40
3M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Treated Zeolite	45.50	3.27	13.9	36.00

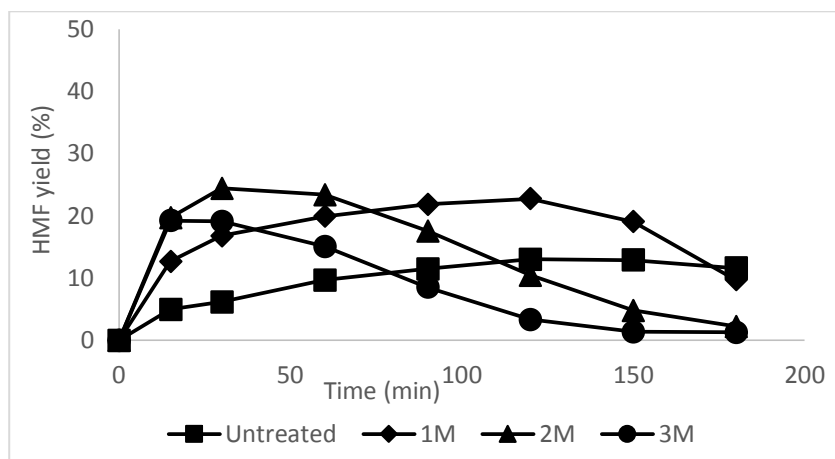
### 3.4. Catalytic Activity

The results of fructose conversion, HMF, formic acid and levulinic acid yields in fructose conversion reactions with zeolite samples treated with different sulphuric acid concentrations are shown in Fig. 2-5, respectively. According to Fig. 2, treatment with sulphuric acid increases fructose conversion. Fructose conversion reached approximately 100% at 90 minutes in experiments with 2 and 3 M sulphuric acid treated samples. In the experiments with raw zeolite and 1M sulphuric acid modified zeolite, these values are 88% and 67% respectively.



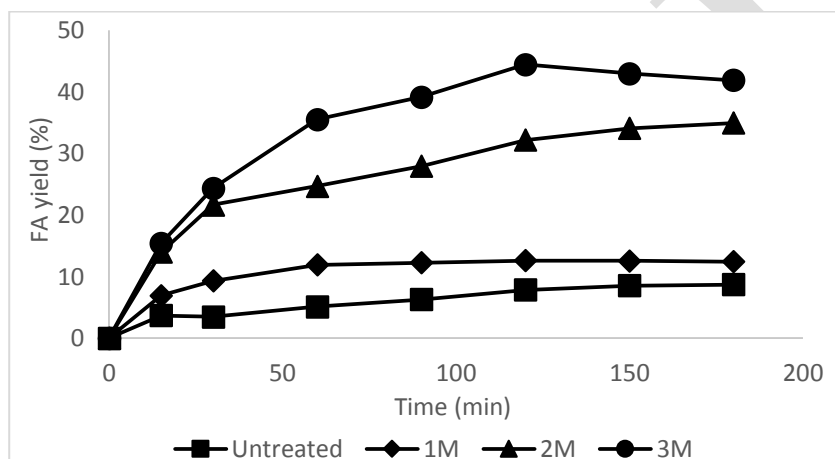
**Fig. 2.** Fructose conversion yield over H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treated zeolite

When HMF yield results versus time in Fig. 3 are evaluated, it is seen that HMF yield increases for a while and then decreases. This can be explained by the conversion of HMF to levulinic and formic acid. Highest 5-HMF yield (24.43%) was achieved by 2 M sulphuric acid treated zeolite after 30 minutes.

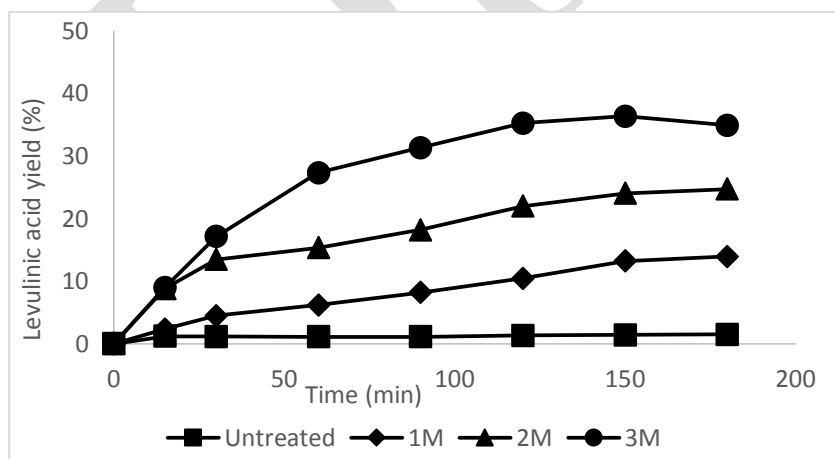


**Fig. 3.** HMF yield from fructose over H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treated zeolite

Formic and levulinic acid yields are shown in Fig. 4 and Fig. 5, respectively. It is clear that the yield of formic and levulinic acid increases when the sulphuric acid concentration is increased. The highest levulinic acid yield was 36.33% at 150 min in the experiment using 3M sulphuric acid modified catalyst, while the yield of formic acid was 44.43 at 120 min with the same catalyst.



**Fig. 4.** Formic acid yield from fructose over H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treated zeolite



**Fig. 5.** Levulinic acid yield from fructose over H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treated zeolite

## CONCLUSION

In this study, the influence of acid concentration on synthesis of zeolite catalysts for dehydration reaction of fructose was investigated. 1M, 2M and 3M sulphuric acid treated zeolite was synthesized and used as an efficient catalyst for this reaction. Sulphuric acid treatment of the zeolite catalysts led to increase in fructose conversion and HMF production. Under these conditions, almost 100% fructose conversion was achieved. Highest HMF yield was obtained as 24.43% with 2M sulphuric acid treated zeolite for 30 minutes reaction time. Further increasing the reaction time led to decrease in HMF yield due to the propagation of side reactions. HMF was not stable at high temperatures so it was converted to Levulinic acid (LA) and Formic acid (FA). Maximum LA yield (36.33%) was obtained with 3M sulphuric acid treated zeolite for 150 minutes reaction time. Yield for FA production at these conditions was 42.94%. On the other hand, after 120 minutes, the highest FA yield value was 44.43%.

## REFERENCES

- Dziedzicka A, Sulikowski B, Ruggiero-Mikołajczyk M 2016. Catalytic and physicochemical properties of modified natural clinoptilolite. *Catalysis Today*, 259: 50-58.
- Kazi FK, Patel AD, Serrano-Ruiz JC, Dumesic JA, Anex RP 2011. Techno-economic analysis of dimethylfuran (DMF) Hydroxymethylfurfural (HMF) production from pure fructose in catalytic process. *Chemical Engineering Journal*, 169(1-3): 329-338.
- Mester L. 1955. Structure of D-Glucose Phenyllosazone. *Journal of the American Chemical Society*, 77(16): 4301-4305.
- Osatiashiani A, Lee AF, Granollers M, Brown DR, Olivi L, Morales G, Wilson K 2015. Hydrothermally stable, conformal, sulfated zirconia monolayer catalysts for glucose conversion to 5-HMF. *ACS Catalysis*, 5(7): 4345-4352.
- Teimouri A, Mazaheri M, Chermahini AN, Salavati H, Momenbeik F, Fazel-Najafabadi M 2015. Catalytic conversion of glucose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) using nano-POM/nano-ZrO<sub>2</sub>/nano- $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 49: 40-50.
- Thapa I, Mullen B, Saleem A, Leibig C, Baker RT, Giorgi JB 2017. Efficient green catalysis for the conversion of fructose to levulinic acid. *Applied Catalysis A: General*, 539: 70-79.
- Wang L, Zhang L, Li H, Ma Y, Zhang R 2019. High selective production of 5-hydroxymethylfurfural from fructose by sulfonic acid functionalized SBA-15 catalyst. *Composites Part B: Engineering*, 156:88-94.

## A morphological study on aedeagus and spermatheca of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey

Fatih Atas<sup>1\*</sup>, Hüseyin Özdikmen<sup>1</sup>, Neslihan Bal<sup>1</sup>,  
Damla Amutkan Mutlu<sup>1</sup> and Zekiye Suludere<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: fatih.atas.0638@gmail.com

### Abstract

The paper presents morphological features of aedeagus and spermatheca of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 that is an Holarctic species (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey for the first time. Male genitalia are not diagnostic, spermathecae are partly diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Accordingly, detailed investigations of aedeagus and spermatheca are very important to obtain new diagnostic characters in the genus *Cassida*. Photos in stereo microscope are also given in the text.

**Keywords:** *Cassida fausti*, aedeagus, spermatheca, morphology, Turkey.

### INTRODUCTION

The genus *Cassida* Linnaeus, 1758 includes a large number of species distributed whole world (Palearctic, Nearctic, Oriental, Afro-tropical, Madagascar and Australian Regions). The genus is divided into 15 subgenera for the species distributed in Palearctic and Oriental Regions (Borowiec, 2007; Özdikmen and Bal, 2019).

The Cassidinae fauna of Turkey includes 51 species of 6 genera. The genus *Cassida* numbers 41 species of 11 subgenera (Ekiz et al., 2013; Özdikmen et al., 2014; Özdikmen and Kaya, 2014). However, a total of 5 species in 5 subgenera as *Cassida* (*Cassida*) *seladonia* Gyllenhal, 1827, *Cassida* (*Lordiconia*) *canaliculata* Laicharting, 1781, *Cassida* (*Mionycha*) *azurea* Fabricius, 1801, *Cassida* (*Mionychella*) *hemisphaerica* Herbst, 1799 and *Cassida* (*Tylocentra*) *persica* Spaeth, 1926 were reported by Kismalı & Sassi (1994), Warchalowski (2003, 2010) and Borowiec and Sekerka in öbl & Smetana (2010) from Turkey without any exact locality, but only as Asian Turkey (Anatolia). With this reason, the occurrence in Turkey of these species needs confirmation. Consequently, so it can say that the fauna of Turkish *Cassida* includes 36 species (except for 5 problematic species) of 9 subgenera on the base of exact localities in Turkey.

The nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*) Linnaeus, 1758 includes 46 species distributed whole World (45 Palearctic species including the type species *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 and one native species from North America). The nominotypical subgenus is represented by 21 species in Turkey. *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 is one of the species in the nominotypical subgenus.

According to Bordy and Doguet (1987), Borowiec and Świętojańska (2001) and Borowiec (2007), male genitalia are not diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Spermathecae are partly diagnostic.

Hitherto, we think that arrangement of the subgeneric classification in the genus *Cassida* on the base of aedeagal and especially spermathecal morphologies was overlooked due to this acceptance and approval. Whereas, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially. With this reason, detailed investigations of aedeagus and spermatheca of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 from Turkey were studied with stereo microscope. Obtaining observations are presented below.

The aim of this work, detailed morphologies observed by stereo microscope of aedeagus and spermatheca of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey is to reveal.

### MATERIALS AND METHODS

The available specimens (a total of 6 specimens) for the present work were collected from Ankara, Bolu, Kastamonu, Kayseri and Konya provinces in Turkey in 1997, 2003, 2018. The specimens are deposited at Gazi University (Turkey, Ankara).

The aedeagi and spermathecae were dissected from abdomen, remaining tissue were removed with fine tweezers. For microscopic examination after cleaning, the samples were placed 70% ethanol and examined with Olympus SZX7 stereo microscope.

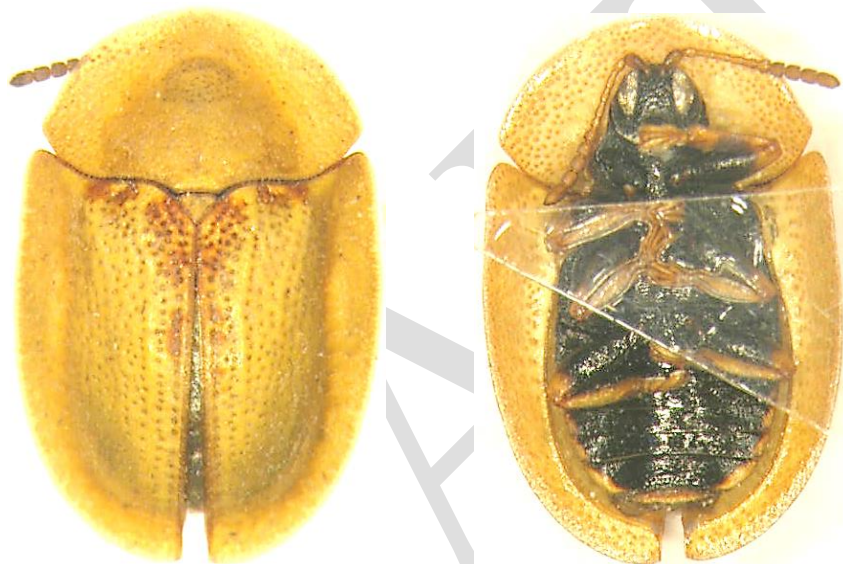
## RESULTS and DISCUSSION

### Species *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926 (Fig. 1)

*Cassida fausti* is an E-European species. Body length is 5.7-6.4 mm. It is distributed in Europe (Bulgaria, Macedonia, South European Territory of Russia, Ukraine), European Turkey (Thrace) and Asian Turkey (Anatolia) (Warchalowski, 2010; Borowiec and Sekerka in Löbl & Smetana (2010)).

The species is rather widely distributed in Turkey. It has been recorded from 14 provinces in 6 of 7 Turkish regions except for South-Eastern Anatolian region. It is reported from Adana, Afyon, Ankara, Bolu, Isparta, İzmir, Karabük, Karaman, Kastamonu, Konya, Nevşehir, Niğde and Samsun provinces in Asian Turkey and Edirne province in European Turkey (Ekiz et al., 2013; Özdikmen and Kaya, 2014).

**Material examined:** **Turkey, Ankara prov.:** Çubuk, 1 specimen; **Bolu prov.:** Bolu-Gerede road, return of Susuz-Kınık villages, exit of Bolu, 17.V.2003, 720 m, 1 specimen; **Kastamonu prov.:** Kastamonu- Araç road, Kastamonu police forest, exit of Kastamonu 1<sup>st</sup> km, 16.V.2003, 975 m, 1 specimen; **Kayseri prov.:** İncesu, Bahçelievler, 38°37'58'' N 35°11'48'' E, 08.V.2018, 1072 m, 2 specimens; **Konya prov.:** Kulu, Tavşanlı, 17.V.1997, 1000 m, 1 specimen.



**Figure 1.** *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926, dorsal view (left), ventral view (right).

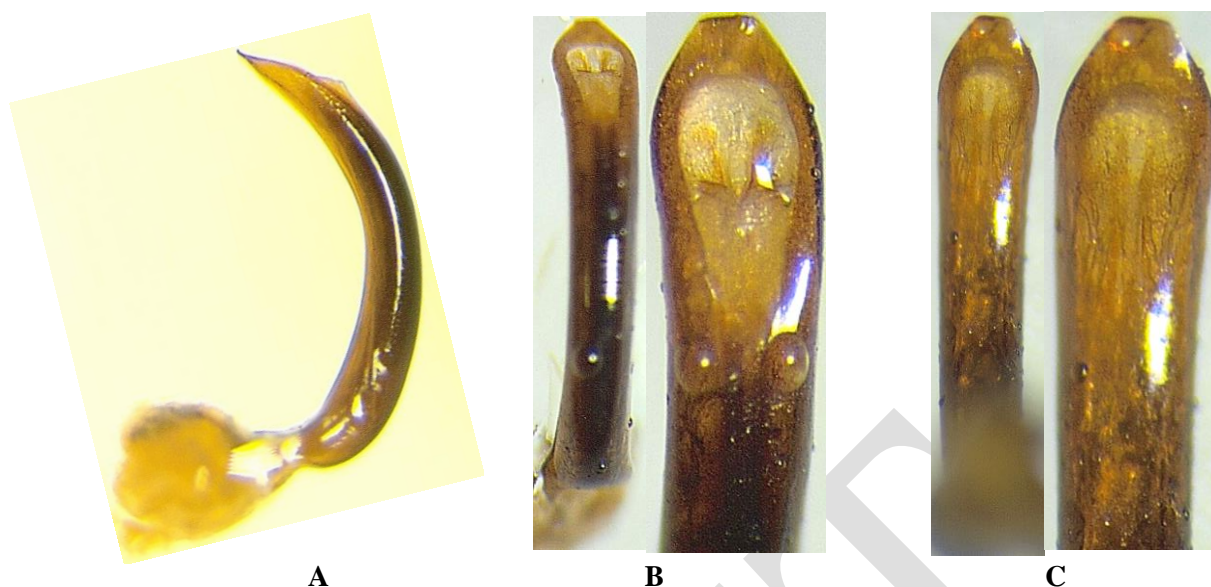
Aedeagus and spermatheca of *Cassida fausti* were studied with stereo microscope. Obtaining observations on detailed morphologies of them are presented as follows:

**Aedeagus (Fig. 2):** Median lobe dark brown to brown, dark brown in 3/4 of its length basally. Apical part (apical fourth) of median lobe clearly brown or light brown.

In lateral view, median lobe distinctly and almost regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe right and pointed.

In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts distinctly smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.

In ventral view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Ventral surface of median lobe from median foramen to near apex with a median flattened area that broadly and longitudinally.



**Figure 2.** Aedeagus of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926, A. Lateral view, B. Dorsal view, C. Ventral view.

**Spermatheca** (Fig. 3): General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Nodulus short, almost parallel, not swollen. Nodulus darkened on internal surface basally. Collum and ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted. These parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca. Last part (or last 2/3) of ductus spermatheca probably rather long, rather thick and regularly spiral. The diameter of last part larger than first part. But the diameter of spiral tube smaller than the proximal straight tube.



**Figure 3.** Spermatheca of *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926, lateral view.

As known *Cassida fausti* is in the nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*). According to results of the present work, aedeagal and especially spermathecal morphologies of *Cassida fausti* distinctly differ from *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 that is the type species of the genus and nominotypical subgenus.

**Diagnostic external morphological characters of adults for *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti*:**

-. Primary puncturation of elytra arranged in regular rows, without any punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less rounded. On elytra with numerous small black spots. Underside



completely black. Legs entirely yellow. Length 6.0-7.0 mm. An Asiatic-European species.... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

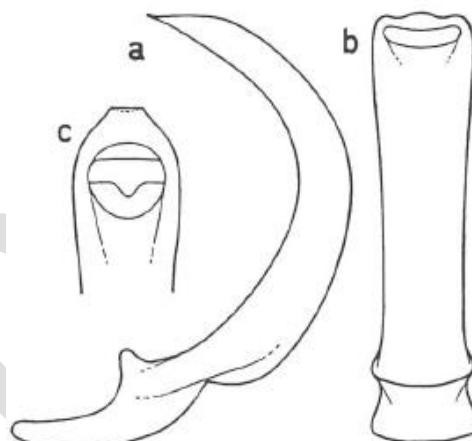
-. Elytra not regularly seriate-punctate, at least with some extra punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less narrowed. On elytra without numerous small black spots. Elytra with a triangular darkened area (not sharply limited) on sides and behind the scutellum basally. Underside mostly black, but borders of abdomen pale. Femora at least in basal half black. Length 5.7-6.4 mm. An E-European species..... *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926

At first view, aedeagal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti* are more or less similar in general. Even so, many characters in detail are different and diagnostic between *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti*. These diagnostic characters can see below.

**Aedeagus of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 (Fig. 4):** Median lobe completely brown.

In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed.

In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.



**Figure 4.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, a. lateral view, b. dorsal view, c. apex of median tube in dorsal view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of aedeagus for *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti*:**

-. Median lobe completely brown. In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed; projection of apex short and right. In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex..... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. Median lobe dark brown to brown, dark brown in 3/4 of its length basally, apical part (apical fourth) clearly brown or light brown. In lateral view, median lobe distinctly and almost regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe gradually narrowed and narrower and pointed; projection of apex longer and right. In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part..... *Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926

On the other hand, spermathecal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti* are clearly different. Many characters in detail are diagnostic. These diagnostic characters can see below.

**Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758** (Fig. 5, 6): General view of spermatheca in the form of opened hook or bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Collum invisible, very reduced. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.



**Figure 5.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

#### **Diagnostic characters of spermatheca for *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti*:**

-. General view of spermatheca in the form of opened hook or a bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Nodulus not darkened on any part. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.....*Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Nodulus short, almost parallel, not swollen. Nodulus darkened on internal surface basally. Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Cornu without any integument trace in front of the apex. Ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally because of ramus invisible. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted; these parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca; last part (or last 2/3) of ductus spermatheca probably rather long, rather thick and regularly spiral.....*Cassida fausti* Spaeth & Reitter, 1926

#### **CONCLUSION**

As mentioned above, 10 aedeagal characters for *Cassida nebulosa* that is the type species of the subgenus *Cassida* (*Cassida*), are determined. The type species is clearly distinguished from *Cassida fausti* by 4 determined aedeagal characters.

However, 9 spermathecal characters for *Cassida nebulosa* are determined. The type species clearly differs from *Cassida fausti* by almost all determined spermathecal characters. A single aberrant character is similar between both species (collum invisible, very reduced or absent).

Accordingly, it can say that the type species *Cassida nebulosa* and *Cassida fausti* are probably not congeneric.

According to results of the present work, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially.



**Figure 6.** Complete spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

#### REFERENCES

- Bordy B 2009. Coléoptères, Chrysomelidae: Hispinae et Cassidinae, Faune de France, volume 85, 260 pp.
- Bordy B, Doguet S 1987. Contribution à la connaissance des Cassidinae de France. Étude de leur spermatheque (Coleoptera, Chrysomelidae). Nouvelle Revue d'Entomologie (N.S.), 4: 161-176.
- Borowiec L 2007. Two new species of *Cassida* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Madagascar and notes on subgenera of the genus *Cassida*. Zootaxa, 1586: 47-58.
- Borowiec L, Sekerka L 2010. Cassidinae. Pp. 368-390. In Löbl, I. & Smetana A. (eds.). Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 6. Chrysomeloidea. Stenstrup: Apollo Books, 924 pp.
- Borowiec L, Świętojańska J 2001. Revision of *Cassida litigiosa* group from southern Africa (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Annales Zoologici Warszawa, 51: 153-184.
- Ekiz AN, Şen İ, Aslan EG, Gök A 2013. Checklist of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) of Turkey, excluding Bruchinae. Journal of Natural History, 47(33-34): 2213-2287.
- Kısmalı S, Sassi D 1994. Preliminary list of Chrysomelidae with notes on distribution and importance of species in Turkey. II. Subfamily Cassidinae Spaeth. Türk Entomol. Derg., 18(3): 141-156.
- Özdikmen H, Bal N 2019. On the subgenus *Alledoya* Hincks, 1950 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Munis Entomology & Zoology, 14(2): 350-357.

- Özdikmen H, Kaya G 2014. Chorotype identification for Turkish Chrysomeloidea (Coleoptera) Part I – Chrysomelidae: Hispinae and Cassidinae. *Munis Entomology & Zoology*, 9(1): 58-70.
- Özdikmen H, Mercan N, Cihan N, Kaya G, Topcu NN, Kavak M 2014. The importance of superfamily Chrysomeloidea for Turkish biodiversity (Coleoptera). *Munis Entomology & Zoology*, 9(1): 17-45.
- Warchalowski A 2003. Chrysomelidae: the leaf beetles of Europe and the mediterranean Area. Warszawa: Natura optima dux Foundation; 600 pp.
- Warchalowski A 2010. The Palaearctic Chrysomelidae. Identification keys. Vol. 1 & 2. Warszawa, 2010. 1212 pp.

DRAFT

## A morphological study on aedeagus and spermatheca of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey

Fatih Atas<sup>1\*</sup>, Hüseyin Özdikmen<sup>1</sup>, Neslihan Bal<sup>1</sup>,  
Damla Amutkan Mutlu<sup>1</sup> and Zekiye Suludere<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: fatih.atas.0638@gmail.com

### Abstract

The paper presents morphological features of aedeagus and spermatheca of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776 that is an Holarctic species (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey for the first time. Male genitalia are not diagnostic, spermathecae are partly diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Accordingly, detailed investigations of aedeagus and spermatheca are very important to obtain new diagnostic characters in the genus *Cassida*. Photos in stereo microscope are also given in the text.

**Keywords:** *Cassida rubiginosa*, aedeagus, spermatheca, morphology, Turkey.

### INTRODUCTION

The genus *Cassida* Linnaeus, 1758 includes a large number of species distributed whole world (Palearctic, Nearctic, Oriental, Afro-tropical, Madagascar and Australian Regions). The genus is divided into 15 subgenera for the species distributed in Palearctic and Oriental Regions (Borowiec, 2007; Özdikmen and Bal, 2019).

The Cassidinae fauna of Turkey includes 51 species of 6 genera. The genus *Cassida* numbers 41 species of 11 subgenera (Ekiz et al., 2013; Özdikmen et al., 2014; Özdikmen and Kaya, 2014). However, a total of 5 species in 5 subgenera as *Cassida* (*Cassida*) *seladonia* Gyllenhal, 1827, *Cassida* (*Lordiconia*) *canaliculata* Laicharting, 1781, *Cassida* (*Mionycha*) *azurea* Fabricius, 1801, *Cassida* (*Mionychella*) *hemisphaerica* Herbst, 1799 and *Cassida* (*Tylocentra*) *persica* Spaeth, 1926 were reported by Kismalı & Sassi (1994), Warchalowski (2003, 2010) and Borowiec and Sekerka in öbl & Smetana (2010) from Turkey without any exact locality, but only as Asian Turkey (Anatolia). With this reason, the occurrence in Turkey of these species needs confirmation. Consequently, so it can say that the fauna of Turkish *Cassida* includes 36 species (except for 5 problematic species) of 9 subgenera on the base of exact localities in Turkey.

The nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*) Linnaeus, 1758 includes 46 species distributed whole World (45 Palearctic species including the type species *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 and one native species from North America). The nominotypical subgenus is represented by 21 species in Turkey. *Cassida rubiginosa* Müller, 1776 is one of the species in the nominotypical subgenus.

According to Bordy and Doguet (1987), Borowiec and Świętojańska (2001) and Borowiec (2007), male genitalia are not diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Spermathecae are partly diagnostic.

Hitherto, we think that arrangement of the subgeneric classification in the genus *Cassida* on the base of aedeagal and especially spermathecal morphologies was overlooked due to this acceptance and approval. Whereas, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially. With this reason, detailed investigations of aedeagus and spermatheca of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776 from Turkey were studied with stereo microscope. Obtaining observations are presented below.

The aim of this work, detailed morphologies observed by stereo microscope of aedeagus and spermatheca of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey is to reveal.

### MATERIALS AND METHODS

The available specimens (a total of 79 specimens) for the present work were collected from Adana, Ankara, Bolu, İçel, Karabük, Kayseri, Konya, Nevşehir and Niğde provinces in Turkey in 1992, 1996, 1997, 2000, 2001, 2003, 2018. The specimens are deposited at Gazi University (Turkey, Ankara).

The aedeagi and spermathecae were dissected from abdomen, remaining tissue were removed with fine tweezers. For microscopic examination after cleaning, the samples were placed 70% ethanol and examined with Olympus SZX7 stereo microscope.

## RESULTS and DISCUSSION

### Species *Cassida rubiginosa* Müller, 1776

#### Subspecies *Cassida rubiginosa rubiginosa* Müller, 17760 (Fig. 1)

*Cassida rubiginosa* is a Holarctic species. Body length is 6.5-7.5 mm. It is distributed in almost all Europe, North Africa (Algeria, Morocco), Asia (China, Far East, Israel, Japan, Kazakhstan, Korea, Siberia), European Turkey (Thrace), Asian Turkey (Anatolia) and Nearctic region (Warchalowski, 2010; Borowiec and Sekerka in Löbl & Smetana (2010)).

The species has two subspecies. It is represented only by the nominotypical subspecies in Turkey. The other subspecies *Cassida rubiginosa rugosopunctata* Motschulsky, 1866 is distributed only in Japan and Taiwan. The species is widely distributed in Turkey. It has been recorded from 26 provinces in 6 of 7 Turkish regions except for South-Eastern Anatolian region. It is reported from Adana, Afyon, Ankara, Antalya, Balıkesir, Bolu, Bursa, Çorum, Erzurum, Eskişehir, Giresun, Isparta, İçel, İzmir, Karabük, Kastamonu, Konya, Kütahya, Manisa, Sakarya, Samsun, Sivas and Zonguldak provinces in Asian Turkey and Edirne, Kırklareli, Tekirdağ provinces in European Turkey (Ekiz et al., 2013; Özdikmen and Kaya, 2014).

**Material examined: Turkey, Adana prov.:** Pozantı, Tekir plateau, 23.VI.1997, 1300 m, 1 specimen; **Ankara prov.:** Kızılcahamam, Aköz village, 28.V.1997, 1150 m, 1 specimen; **Bolu prov.:** Yedigöller, Between Özbağı-Çıplaklar, Devrek (45 km to Yedigöller), 13.V.2003, 160 m, 1 specimen; **İçel prov.:** Sertavul pass, 26.VI.2001, 1410 m, 1 specimen; **Karabük prov.:** Üçevler, 14.VI.2003, 1000 m, 1 specimen; Safranbolu, Bulak village, Hazar district, 14.V.2003, 740 m, 1 specimen; **Kayseri prov.:** Sarız, Yedioluk, 38°33'27'' N 36°27'01'' E, 29.V.2018, 1770 m, 20 specimen; Melikgazi, Yeşilyurt, 04.VII.2018, 1090 m, 1 specimen; Sarız, Darıdere, 05.VII.2018, 1555 m, 1 specimen; Sarız, Yedioluk, 38°33'33'' N 36°27'16'' E, 05.V.2018, 1812 m, 6 specimens; Pınarbaşı, Kılıçkışla, 38°39'48'' N 36°12'37'' E, 05.VII.2018, 1433 m, 24 specimens; **Konya prov.:** Kulu, Tavşanlı, 31.V.1997, 1000 m, 2 specimens; **Nevşehir prov.:** Avanos, 20.VII.1992, 1000 m, 1 specimen; Göreme, 19.V.1997, 1260 m, 1 specimen; **Niğde prov.:** Azatlı Tepeköy road, 21.VIII.1996, 1 specimen; Kayaardı, Niğde vineyard, 17.VI.1997, 6 specimens; Bor, Derbent district, 06.VII.1997, 6 specimens; Tepeköy plateau, Altınhisar-Çiftlik road, 29.IV.1997, 4 specimens.



**Figure 1.** *Cassida rubiginosa* Müller, 1776, dorsal view (left), ventral view (right).

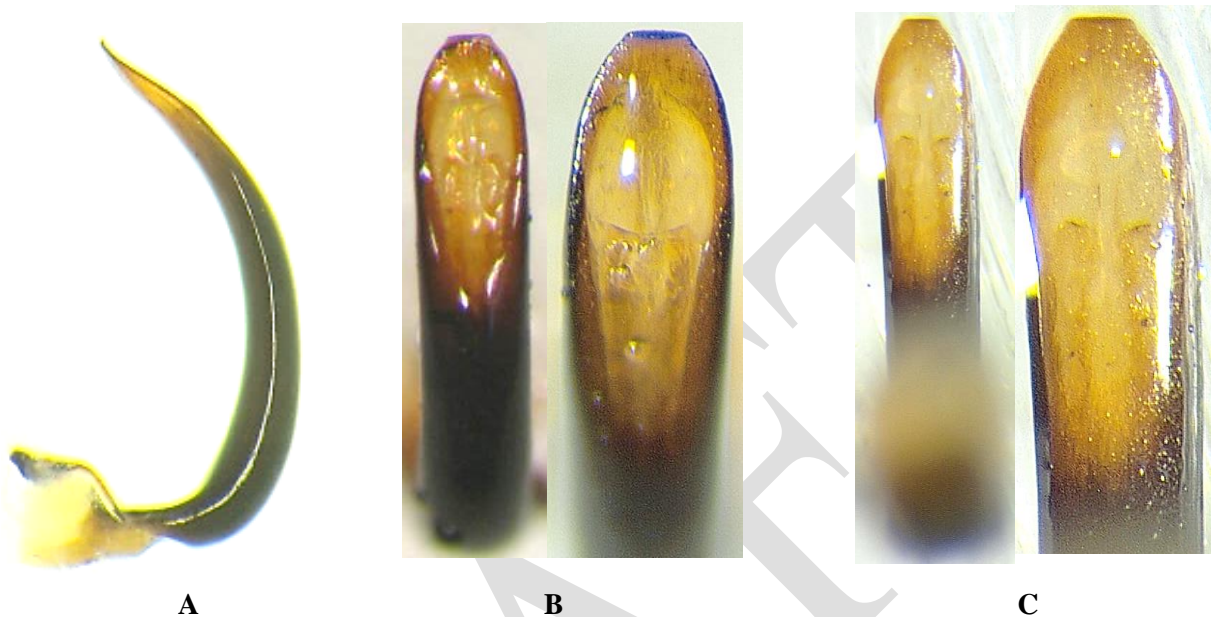
Aedeagus and spermatheca of *Cassida rubiginosa* were studied with stereo microscope. Obtaining observations on detailed morphologies of them are presented as follows:

**Aedeagus** (Fig. 2): Median lobe black in 3/4 of its length basally or at least at the end of black part blackish-dark brown. Apical part (apical fourth) of median lobe clearly brown.

In lateral view, median lobe distinctly curved median foramen to apex in general, but especially curved in its median part, almost right on the apical third. Median lobe gradually narrowed from the base to the apex, like a longitudinally cone-shaped. The apex of median lobe slightly upright and pointed.

In dorsal view, median lobe barely widened from the base to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts distinctly smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.

In ventral view, median lobe barely widened from the base to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Ventral surface of median lobe cylindrical.



**Figure 2.** Aedeagus of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776, A. Lateral view, B. Dorsal view, C. Ventral view.

**Spermatheca** (Fig. 3): General view of spermatheca boomerang-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Nodulus shorter, almost parallel, not swollen. Collum like a short peduncle. Collum thinner than the end of nodulus. Ramus swollen, outwardly offset and briefly tapered. Both collum to nodulus and ramus to collum joined rightly. Ductus spermatheca rather short and rather fine at the beginning of the ramus, regularly spiral almost along its length.



**Figure 3.** Spermatheca of *Cassida rubiginosa* Müller, 1776, lateral view.

As known *Cassida rubiginosa* is in the nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*). According to results of the present work, aedeagal and especially spermathecal morphologies of *Cassida rubiginosa* distinctly differ from *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 that is the type species of the genus and nominotypical subgenus.

**Diagnostic external morphological characters of adults for *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa*:**

-. Primary puncturation of elytra arranged in regular rows, without any punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less rounded. On elytra with numerous small black spots. Underside completely black. Legs entirely yellow. Length 6.0-7.0 mm. An Asiatic-European species.... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

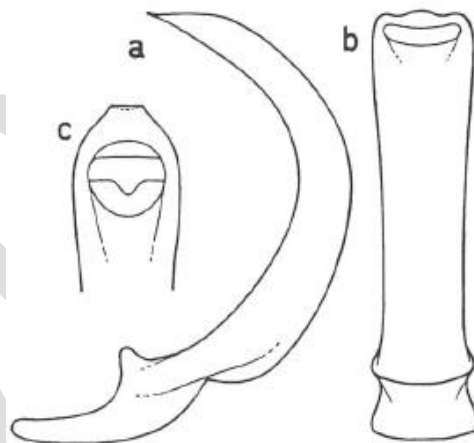
-. Elytra not regularly seriate-punctate, at least with some extra punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less narrowed. On elytra without numerous small black spots. Elytra with a dark dot behind the scutellum and a few darkened spots on both sides of scutellum. Underside mostly black, but borders of abdomen pale only apically. Femora mostly black, apical fourth yellow. Length 6.5-7.5 mm. An Holarctic species..... *Cassida rubiginosa* Müller, 1776

At first view, aedeagal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa* are more or less similar in general. Even so, many characters in detail are different and diagnostic between *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa*. These diagnostic characters can see below.

**Aedeagus of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 (Fig. 4):** Median lobe completely brown.

In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed.

In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.



**Figure 4.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, a. lateral view, b. dorsal view, c. apex of median tube in dorsal view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of aedeagus for *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa*:**

-. Median lobe completely brown. In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed; projection of apex short and right. In dorsal view, lateral thickenings in apical part of median lobe larger..... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. Median lobe black in 3/4 of its length basally and clearly brown in apical part (apical fourth). In lateral view, median lobe distinctly, but irregularly and less curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe gradually narrowed and narrower and pointed; projection of apex longer and slightly upright. In dorsal view, lateral thickenings in apical part of median lobe narrower..... *Cassida rubiginosa* Müller, 1776

On the other hand, spermathecal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa* are clearly different. Many characters in detail are diagnostic. These diagnostic characters can see below.



**Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758** (Fig. 5, 6): General view of spermatheca in the form of opened hook or bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Collum invisible, very reduced. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.



**Figure 5.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of spermatheca for *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa*:**

-. General view of spermatheca in the form of opened hook or bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Collum invisible, very reduced. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length..... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. General view of spermatheca boomerang-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Nodulus almost parallel, not swollen. Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Cornu without an integument trace in front of the apex. Collum visible, like a short peduncle. Ramus swollen, outwardly offset and briefly tapered. Ramus joined to collum and hereby nodulus rightly. Ductus spermatheca rather short and rather fine at the beginning of the ramus, regularly spiral almost along its length..... *Cassida rubiginosa* Müller, 1776



**Figure 6.** Complete spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

## CONCLUSION

As mentioned above, 10 aedeagal characters for *Cassida nebulosa* that is the type species of the subgenus *Cassida* (*Cassida*), are determined. The type species is clearly distinguished from *Cassida rubiginosa* by 5 determined aedeagal characters.

However, 9 spermathecal characters for *Cassida nebulosa* are determined. The type species clearly differs from *Cassida rubiginosa* by all determined spermathecal characters.

Accordingly, it can say that the type species *Cassida nebulosa* and *Cassida rubiginosa* are probably not congeneric.

According to results of the present work, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially.

## REFERENCES

- Bordy B 2009. Coléoptères, Chrysomelidae: Hispinae et Cassidinae, Faune de France, volume 85, 260 pp.
- Bordy B, Doguet S 1987. Contribution à la connaissance des Cassidinae de France. Étude de leur spermathèque (Coleoptera, Chrysomelidae). Nouvelle Revue d'Entomologie (N.S.), 4: 161-176.
- Borowiec L 2007. Two new species of *Cassida* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Madagascar and notes on subgenera of the genus *Cassida*. Zootaxa, 1586: 47-58.
- Borowiec L, Sekerka L 2010. Cassidinae. Pp. 368-390. In Löbl, I. & Smetana A. (eds.). Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 6. Chrysomeloidea. Stenstrup: Apollo Books, 924 pp.
- Borowiec L, Świętojańska J 2001. Revision of *Cassida litigiosa* group from southern Africa (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Annales Zoologici Warszawa, 51: 153-184.
- Ekiz AN, Şen İ, Aslan EG, Gök A 2013. Checklist of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) of Turkey, excluding Bruchinae. Journal of Natural History, 47(33-34): 2213-2287.
- Kısmalı S, Sassi D 1994. Preliminary list of Chrysomelidae with notes on distribution and importance of species in Turkey. II. Subfamily Cassidinae Spaeth. Türk Entomol. Derg., 18(3): 141-156.
- Özdikmen H, Bal N 2019. On the subgenus *Alledoya* Hincks, 1950 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Munis Entomology & Zoology, 14(2): 350-357.
- Özdikmen H, Kaya G 2014. Chorotype identification for Turkish Chrysomeloidea (Coleoptera) Part I – Chrysomelidae: Hispinae and Cassidinae. Munis Entomology & Zoology, 9(1): 58-70.
- Özdikmen H, Mercan N, Cihan N, Kaya G, Topcu NN, Kavak M 2014. The importance of superfamily Chrysomeloidea for Turkish biodiversity (Coleoptera). Munis Entomology & Zoology, 9(1): 17-45.
- Warchalowski A 2003. Chrysomelidae: the leaf beetles of Europe and the mediterranean Area. Warszawa: Natura optima dux Foundation; 600 pp.
- Warchalowski A 2010. The Palaearctic Chrysomelidae. Identification keys. Vol. 1 & 2. Warszawa, 2010. 1212 pp.

## A SEM study on aedeagus and spermatheca of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey

Neslihan Bal\*, Hüseyin Özdikmen, Fatih Ataş, Damla Amutkan Mutlu and Zekiye Suludere

Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: neslihansilkin@gmail.com

### Abstract

The paper presents ultrastructures observed by SEM of aedeagus and spermatheca of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 that is a Sibero-European species (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey for the first time. Male genitalia are not diagnostic, spermathecae are partly diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Accordingly, ultrastructural investigations of aedeagus and spermatheca are very important to obtain new diagnostic characters in the genus *Cassida*. Photos in SEM as well as photos in stereo microscope are also given in the text.

**Keywords:** *Cassida pannonica*, SEM, ultrastructures, aedeagus, spermatheca, Turkey.

### INTRODUCTION

The genus *Cassida* Linnaeus, 1758 includes a large number of species distributed whole world (Palearctic, Nearctic, Oriental, Afro-tropical, Madagascar and Australian Regions). The genus is divided into 15 subgenera for the species distributed in Palearctic and Oriental Regions (Borowiec, 2007; Özdikmen and Bal, 2019).

The Cassidinae fauna of Turkey includes 51 species of 6 genera. The genus *Cassida* numbers 41 species of 11 subgenera (Ekiz et al., 2013; Özdikmen et al., 2014; Özdikmen and Kaya, 2014). However, a total of 5 species in 5 subgenera as *Cassida* (*Cassida*) *seladonia* Gyllenhal, 1827, *Cassida* (*Lordiconia*) *canaliculata* Laicharting, 1781, *Cassida* (*Mionycha*) *azurea* Fabricius, 1801, *Cassida* (*Mionychella*) *hemisphaerica* Herbst, 1799 and *Cassida* (*Tylocentra*) *persica* Spaeth, 1926 were reported by Kismalı & Sassi (1994), Warchalowski (2003, 2010) and Borowiec and Sekerka in öbl & Smetana (2010) from Turkey without any exact locality, but only as Asian Turkey (Anatolia). With this reason, the occurrence in Turkey of these species needs confirmation. Consequently, so it can say that the fauna of Turkish *Cassida* includes 36 species (except for 5 problematic species) of 9 subgenera on the base of exact localities in Turkey.

The nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*) Linnaeus, 1758 includes 46 species distributed whole World (45 Palearctic species including the type species *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 and one native species from North America). The nominotypical subgenus is represented by 21 species in Turkey. *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 is one of the species in the nominotypical subgenus.

According to Bordy and Doguet (1987), Borowiec and Świętojańska (2001) and Borowiec (2007), male genitalia are not diagnostic within the genus *Cassida*. Spermathecae are partly diagnostic.

Hitherto, we think that arrangement of the subgeneric classification in the genus *Cassida* on the base of aedeagal and especially spermathecal morphologies was overlooked due to this acceptance and approval. Whereas, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially. With this reason, ultrastructural and detailed investigations of aedeagus and spermatheca of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 from Turkey were studied with SEM and stereo microscope. Obtaining observations are presented below.

The aim of this work, ultrastructures observed by SEM and stereo microscope of aedeagus and spermatheca of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey reveal for the first time.

### MATERIALS AND METHODS

The available specimens (a total of 30 specimens) for the present work were collected from Adana, Ankara, Bolu, Çankırı, Çorum, Karabük and Kayseri provinces in Turkey in 1997, 2001, 2003, 2014, 2015, 2018. The specimens are deposited at Gazi University (Turkey, Ankara).

The aedeagi and spermathecae were dissected from abdomen, remaining tissue were removed with fine tweezers. For microscopic examination after cleaning, the samples were placed 70% ethanol and examined with Olympus SZX7 stereomicroscope.

For scanning electron microscopy (SEM), cleaned samples were dehydrated using an ascending series of ethanol (70%, 80%, 90%, and 100%) and then air dried. After that the specimens were mounted onto SEM stubs using a double-sided adhesive tape, coated with gold using a Polaron SC 502 Sputter Coater, and examined with a JEOL JSM 6060 Scanning Electron Microscope (SEM) at 10 kV.

## RESULTS and DISCUSSION

### Species *Cassida pannonica* Suffrian, 1844 (Fig. 1)

*Cassida pannonica* is a Sibero-European species. Body length is 6.5-8.2 mm. It is distributed in Europe (Austria, Bosnia & Herzegovina, Bulgaria, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Latvia, Macedonia, Polonia, Romania, Slovakia, Ukraine, Yugoslavia) and Asia (China, Israel, Lebanon, Kazakhstan, Kirgizia, Syria, Turkey, Uzbekistan, West Siberia) (Warchalowski, 2010; Borowiec and Sekerka in Löbl & Smetana (2010)).

The species is widely distributed in Turkey. It has been recorded from 23 provinces in all Turkish regions. It is reported from Adana, Ankara, Antalya, Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çorum, Düzce, Gaziantep, Hakkari, Hatay, İçel, İzmir, Karabük, Kars, Kastamonu, Konya, Muğla, Muş, Niğde, Osmaniye, Samsun and Tunceli provinces in Asian Turkey (Ekiz et al., 2013; Özdikmen and Kaya, 2014).

**Material examined: Turkey, Adana prov.:** Return Pozantı-Mersin-Çamliyayla, 20<sup>th</sup> km, 30.V.2001, 285 m, 2 specimens; **Ankara prov.:** Kızılcahamam, Aköz village, 28.V.1997, 1150 m, 1 specimen; **Bolu prov.:** Düzce, Gavur pınarı (Between İğneler-Dibektaş), Yığılca, 1 specimen; **Çankırı prov.:** Kızılırmak, exit of Karamürsel village, Halimintepe, 40°24' N 34°02' E, 24.IV.2014, 550 m, 1 specimen; Kızılırmak, entry of Kemalli village, 40°18' N 34°02' E, 24.IV.2014, 686 m, 1 specimen; Kızılırmak, Between Bostancı-Hacılar villages, 40°19' N 33°51' E, 25.IV.2014, 565 m, 1 specimen; Centre, Salt cavern district, 40°31' N 33°45' E, 25.IV.2014, 699 m, 1 specimen; Centre, Between Pehlivanlı-Alaçatı villages, 40°34' N 33°52' E, 26.IV.2014, 925 m, 1 specimen; Centre, Aşağıçavuş-Yukarıçavuş return, 40°40' N 33°35' E, 09.V.2015, 837 m, 1 specimen; Centre, Balıbağı village, 40°34' N 33°46' E, 15.V.2015, 1037 m, 1 specimen; Centre, between Ovacık-Kuzuköy village, 40°32' N 33°53' E, 15.V.2015, 919 m, 1 specimen; Centre entry of Karadayı, 40°24' N 33°45' E, 16.V.2015, 856 m, 2 specimens; Kızılırmak, Yukarıalagöz village, 40°22' N 33°53' E, 16.V.2015, 642 m, 1 specimen; Kızılırmak, Kavaklı, 40°22' N 34°1' E, 16.V.2015, 542 m, 1 specimen; Yapraklı, Bugay village, 40°42' N 33°46' E, 25.V.2015, 897 m, 1 specimen; Yapraklı, entry of Çevrecik, 40°39' N 33°49' E, 25.V.2015, 953 m, 1 specimen; Yapraklı, Kirliakça village, 40°37' N 33°54' E, 26.V.2015, 914 m, 3 specimens; Ilgaz, entry of Yaylaören village, 40°52' N 33°30' E, 17.VI.2015, 914 m, 1 specimen; Ilgaz, entry of Şeyhyunus village, 40°50' N 33°31' E, 18.VI.2015, 1421 m, 1 specimen; Bayramören, Harmancık village road, 41°2' N 33°13' E, 21.VI.2015, 861 m, 1 specimen; Atkaracalar, Budak pınarı village, 40°51' N 33°8' E, 22.VI.2015, 1096 m, 1 specimen; Yapraklı, Entry of Kaymaz village, 40°43' N 33°54' E, 29.VI.2015, 1011 m, 1 specimen; Yapraklı, Yüklü-Çevrecik return, 40°40' N 33°45' E, 29.VI.2015, 926 m, 1 specimen; **Çorum prov.:** Göletdere, 5 miles to Karagöl village, 16.VI.2003, 1120 m, 1 specimen; **Karabük prov.:** Eflani, Yağlıca village, 15.V.2003, 975 m, 1 specimen; **Kayseri prov.:** Sarız, Çörekdere, 38°28'50'' N 36°27'29'' E, 6.V.2018, 1637 m, 1 specimen.



**Figure 1.** *Cassida pannonica* Suffrian, 1844, dorsal view (left), ventral view (right).

Aedeagus and spermatheca of *Cassida pannonica* were studied with SEM and stereo microscope. Obtaining observations on ultrastructural and detailed morphologies of them are presented as follows:

**Aedeagus: In stereo microscope (Fig. 2):** Median lobe completely brown.

In lateral view, median lobe distinctly and more or less regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe right and pointed.

In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less U-shaped.

In ventral view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Ventral surface of median lobe in apical part with a median, longitudinal furrow. Before (including apex) and after the furrow, median lobe regularly without any furrow.



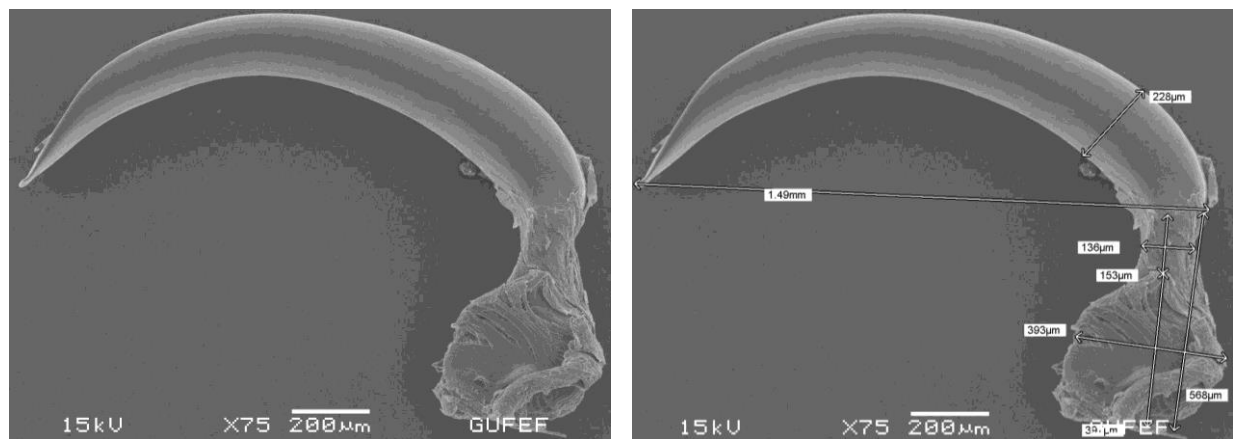
**Figure 2.** Aedeagus of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844, A. Lateral view, B. Dorsal view, C. Ventral view.

**In SEM (Scanning Electron Microscope) (Figs. 3-8):**

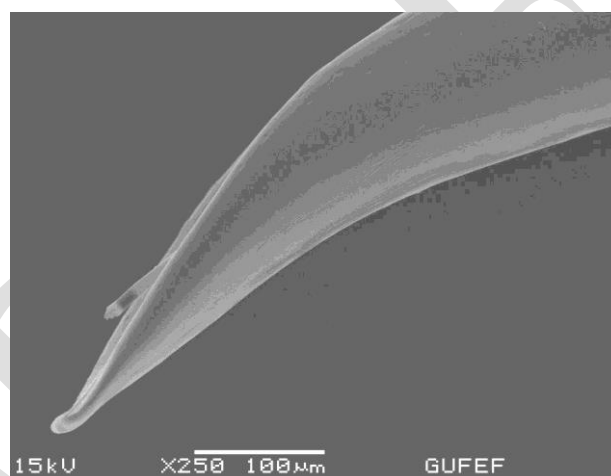
Similar to photos of stereo microscope in general. Only different characters in photos of SEM are presented below.

Median lobe especially in anterior half with scattered, irregular and sparsely ultrastructural pits. The pits on ventral parts of median lobe much more than on dorsal parts. The pits located only in lateral parts of terminal

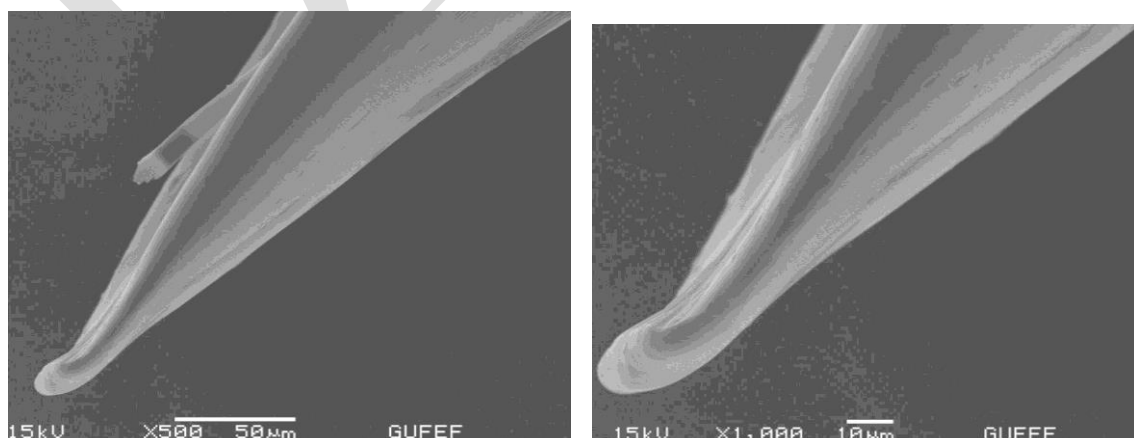
part of median lobe in dorsal view. Dorsal plate and flattened area behind it without ultrastructural pits in dorsal view. Also the terminal area from upper margin of orifice to aedeagal apex without ultrastructural pits in dorsal view. Apex of median lobe folded to dorsal surface and so appears like a truncated-shaped, but not cut. Apex of median lobe gradually narrowed, not additionally prolonged.



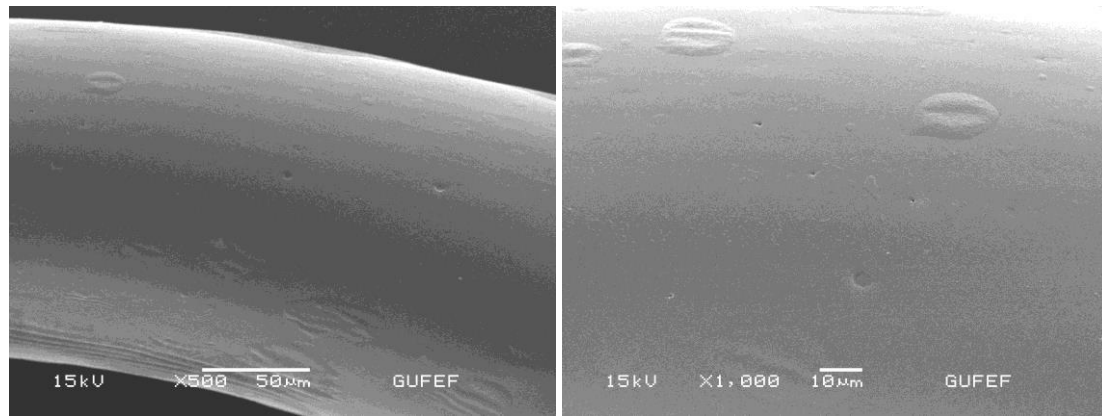
**Figure 3.** Aedeagus of *C. pannonica*, lateral view (SEM).



**Figure 4.** Aedeagus of *C. pannonica*, apical part of median tube in lateral view (SEM).



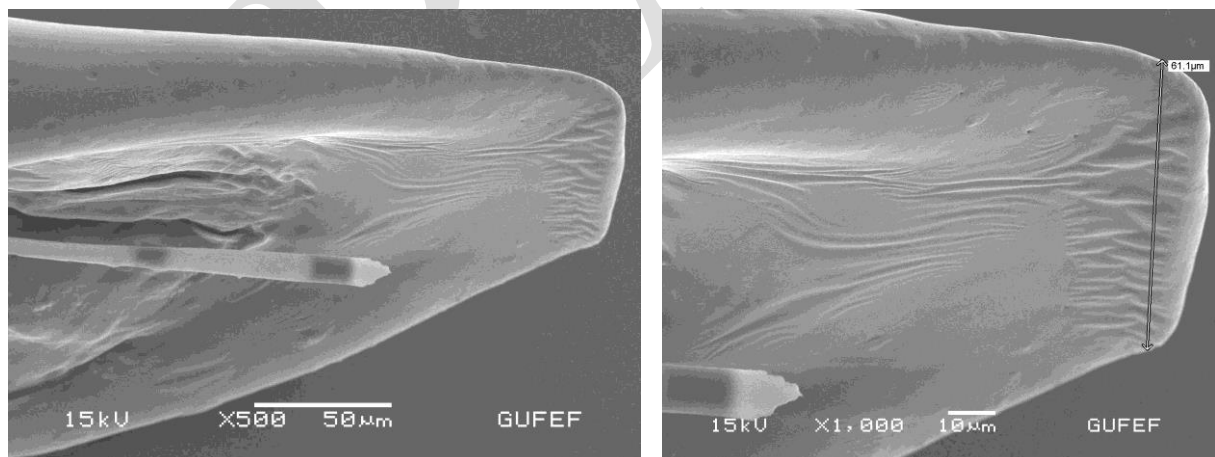
**Figure 5.** Aedeagus of *C. pannonica*, folded apex and pits on apical part of median tube in lateral view (SEM).



**Figure 6.** Aedeagus of *C. pannonica*, pits on median part of median tube in lateral view (SEM).



**Figure 7.** Aedeagus of *C. pannonica*, apical part of median tube in dorso-lateral view (SEM).



**Figure 8.** Aedeagus of *C. pannonica*, folded apex, pits on lateral tickening of apical part of median tube in dorso-lateral view (SEM).

**Spermatheca: In stereo microscope (Fig. 9):** General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Nodus short, almost parallel, not swollen. Nodus darkened on internal surface basally. Collum and ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted. These parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca. Last part (or last 2/3) of ductus spermatheca rather long, rather thick and



regularly spiral. The diameter of last part almost equal or slightly larger than first part. But the diameter of spiral tube smaller than the proximal straight tube.

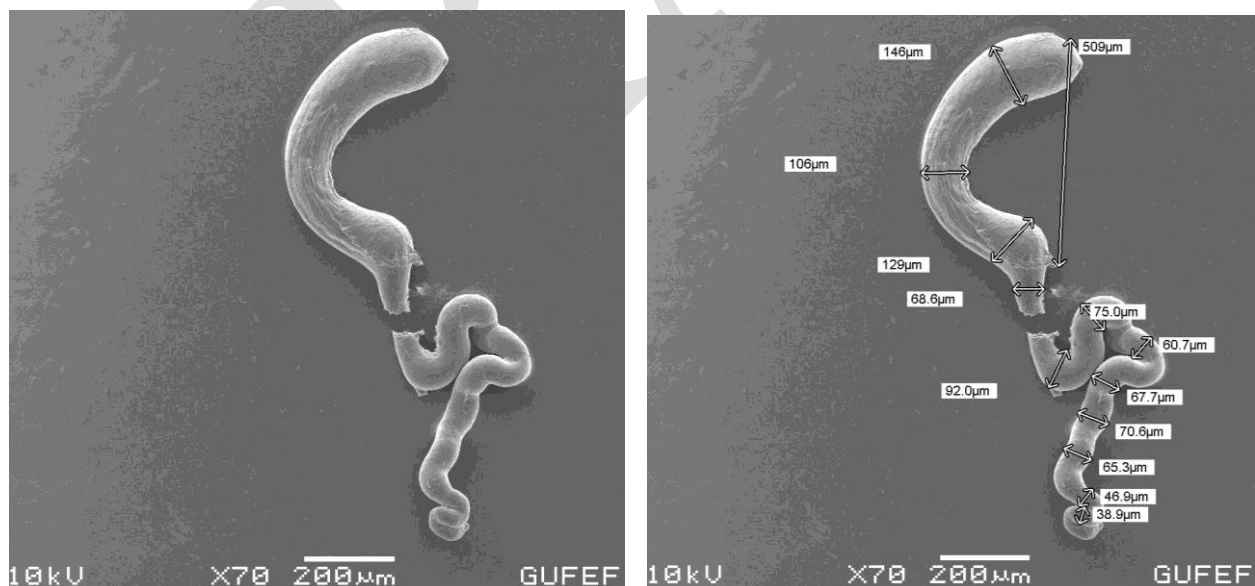


**Figure 9.** Spermatheca of *Cassida pannonica* Suffrian, 1844, lateral view (left), dorso-lateral view (right).

**In SEM (Scanning Electron Microscope) (Figs. 10-18):**

Similar to photos of stereo microscope in general. Only different characters in photos of SEM are presented below.

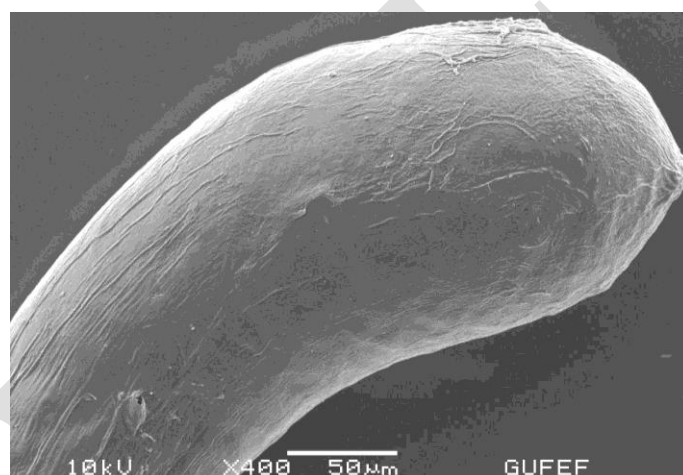
Cornu rounded proximally. Apex with a small bud-shaped process, but not pointed or clearly prolonged. Nodulus with a distinct integument on internal surface basally. The integument behind nodulus fringed that more or less corrugated. Spermathecal gland connected with proximal duct before its first curve. Nodulus, cornu, proximal tube of ductus spermatheca with scattered, irregular and sparsely ultrastructural pits.



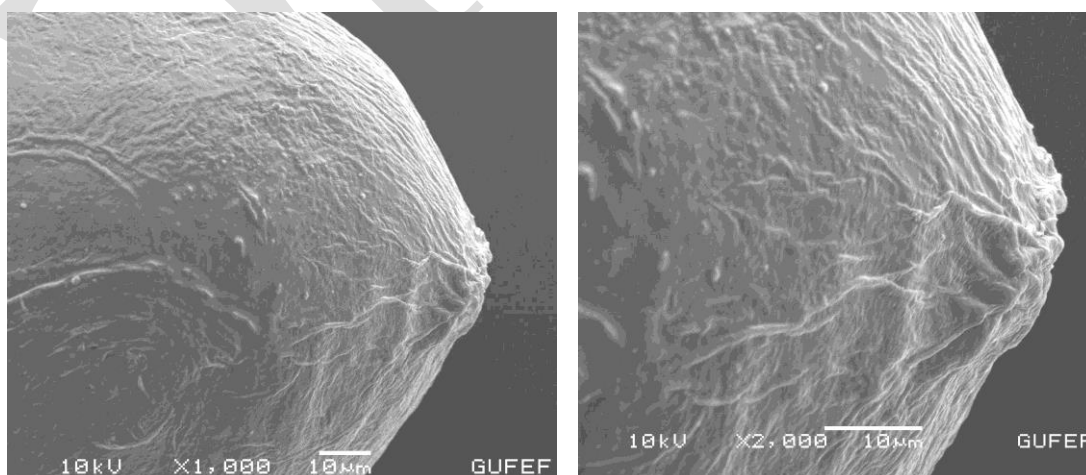
**Figure 10.** Spermatheca of *C. pannonica*, lateral view (SEM).



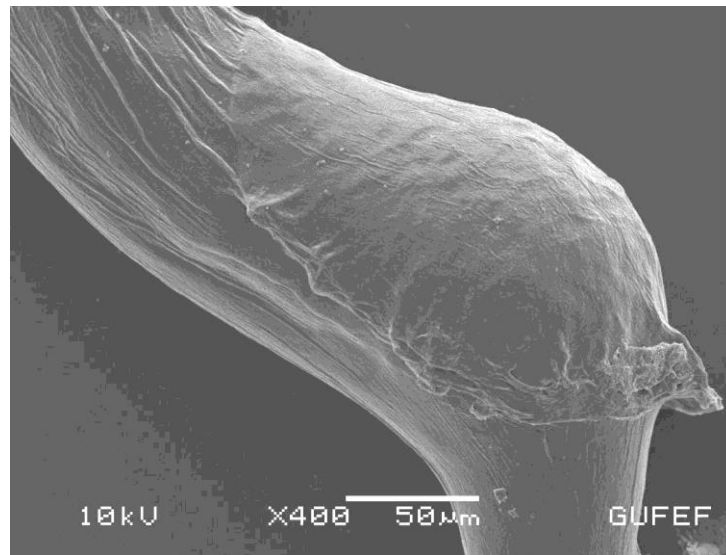
**Figure 11.** Spermatheca of *C. pannonica*, nodulus, cornu and proximal duct in lateral view (SEM).



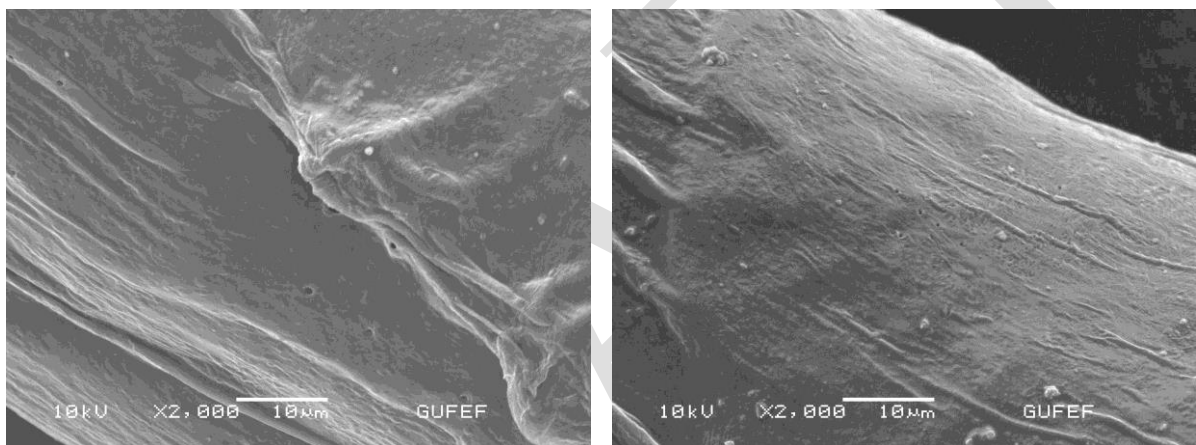
**Figure 12.** Spermatheca of *C. pannonica*, cornu in lateral view (SEM).



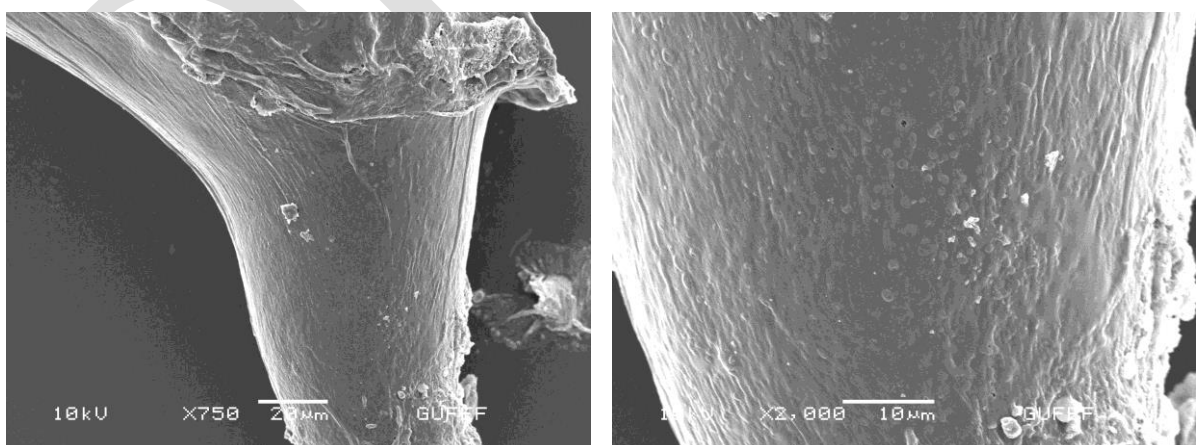
**Figure 13.** Spermatheca of *C. pannonica*, apex of cornu in lateral view (SEM).



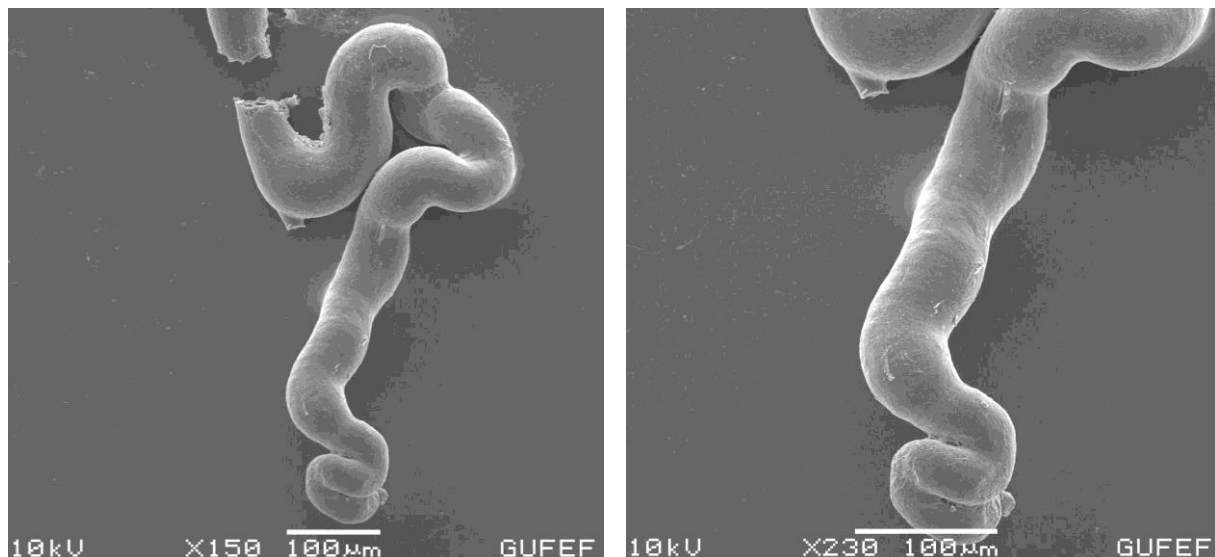
**Figure 14.** Spermatheca of *C. pannonica*, integument on internal surface of nodulus in lateral view (SEM).



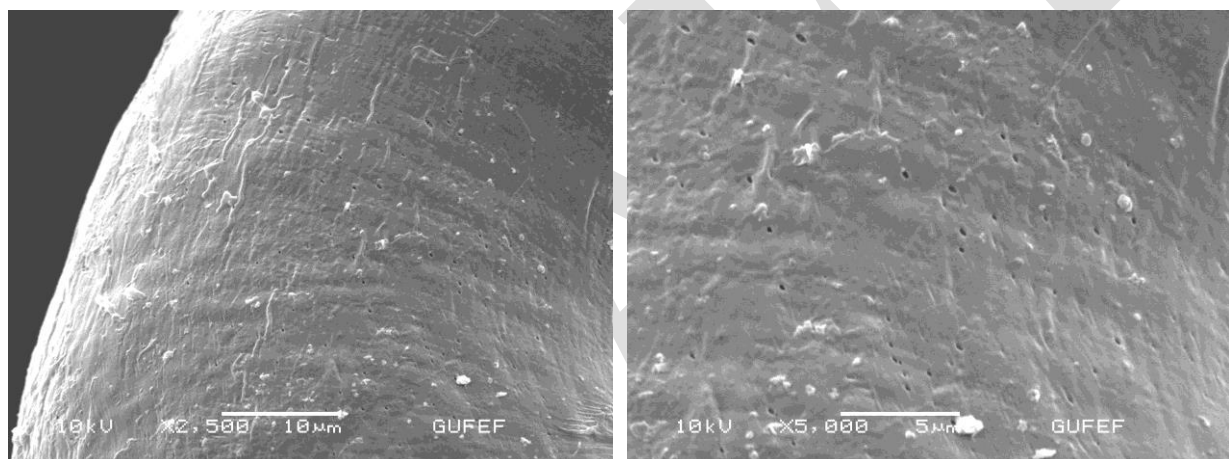
**Figure 15.** Spermatheca of *C. pannonica*, pits on integument of nodulus and nodulus in lateral view (SEM).



**Figure 16.** Spermatheca of *C. pannonica*, pits on proximal duct in lateral view (SEM).



**Figure 17.** Spermatheca of *C. pannonica*, connection of spermathecal gland on proximal duct in lateral view (SEM).



**Figure 18.** Spermatheca of *C. pannonica*, pits on proximal duct in lateral view (SEM).

As known *Cassida pannonica* is in the nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*). According to results of the present work, aedeagal and especially spermathecal morphologies of *Cassida pannonica* distinctly differ from *Cassida nebulosa* that is the type species of the genus and nominotypical subgenus.

**Diagnostic external morphological characters of adults for *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica*:**

-. Primary puncturation of elytra arranged in regular rows, without any punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less rounded. On elytra with numerous small black spots. Underside completely black. Legs entirely yellow. Length 6.0-7.0 mm. An Asiatic-European species....*Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

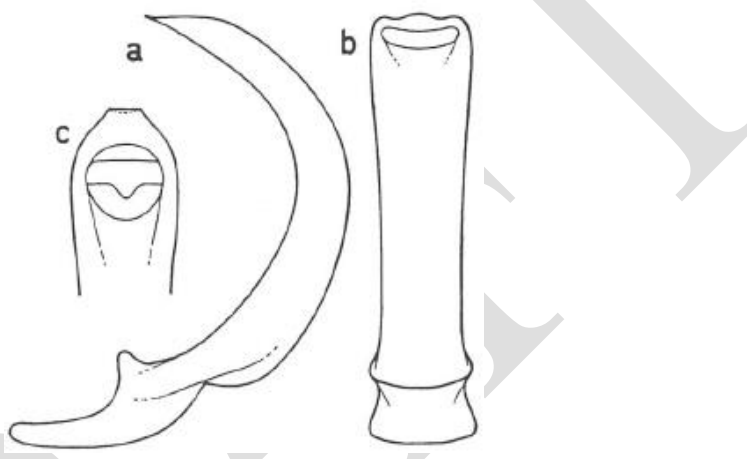
-. Elytra not regularly seriate-punctate, at least with some extra punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less narrowed. On elytra without numerous small black spots. Elytra with a great darkened area prolonged along the suture to apical area. Underside mostly black, but borders of abdomen pale. Femora not or feebly darkened. Length 6.5-8.2 mm. A Sibero-European species.....*Cassida pannonica* Suffrian, 1844

At first view, aedeagal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* are more or less similar in general. Even so, many characters in detail are different and diagnostic between *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica*. These diagnostic characters can see below.

**Aedeagus of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 in stereo microscope (Fig. 19):** Median lobe completely brown.

In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed.

In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.



**Figure 19.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, a. lateral view, b. dorsal view, c. apex of median tube in dorsal view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of aedeagus for *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* in stereo microscope:**

- . Median lobe completely brown. In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed; projection of apex short and right. In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex.....*Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

- . Median lobe dark brown to brown, dark brown in 3/4 of its length basally, apical part (apical fourth) clearly brown or light brown. In lateral view, median lobe distinctly and almost regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe gradually narrowed and narrower and pointed; projection of apex longer and right. In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part.....*Cassida pannonica* Suffrian, 1844

On the other hand, spermathecal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* are clearly different. Many characters in detail are diagnostic. These diagnostic characters can see below.

**Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 in stereo microscope (Fig. 20):** General view of spermatheca in the form of opened hook or bird beak-shaped, distinctly curved. Nodus distinctly swollen and bulbous. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Collum invisible, very reduced. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.



**Figure 20.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of spermatheca for *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* in stereo microscope:**

- . General view of spermatheca in the form of opened hook or a bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Nodulus not darkened on any part. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.....*Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

- . General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Nodulus short, almost parallel, not swollen. Nodulus darkened on internal surface basally. Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Cornu without any integument trace in front of the apex. Ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally because of ramus invisible. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted. These parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca. Last part (or last 2/3) of ductus spermatheca rather long, rather thick and regularly spiral.....*Cassida pannonica* Suffrian, 1844

**CONCLUSION**

As mentioned above, 10 aedeagal characters for *Cassida nebulosa* that is the type species of the subgenus *Cassida* (*Cassida*), are determined. The type species is clearly distinguished from *Cassida pannonica* by 4 determined aedeagal characters.

However, 9 spermathecal characters for *Cassida nebulosa* are determined. The type species clearly differs from *Cassida pannonica* by all determined spermathecal characters.

Accordingly, it can say that the type species *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* are probably not congeneric.

According to results of the present work, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially.

**REFERENCES**

Bordy B 2009. Coléoptères, Chrysomelidae: Hispinae et Cassidinae, Faune de France, volume 85, 260 pp.  
Bordy B, Doguet S 1987. Contribution à la connaissance des Cassidinae de France. Étude de leur spermatheque (Coleoptera, Chrysomelidae). Nouvelle Revue d'Entomologie (N.S.), 4: 161-176.  
Borowiec L 2007. Two new species of *Cassida* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Madagascar and notes on subgenera of the genus *Cassida*. Zootaxa, 1586: 47-58.  
Borowiec L, Sekerka L 2010. Cassidinae. Pp. 368-390. In Löbl, I. & Smetana A. (eds.). Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 6. Chrysomeloidea. Stenstrup: Apollo Books, 924 pp.  
Borowiec L, Świętojańska J 2001. Revision of *Cassida litigiosa* group from southern Africa (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Annales Zoologici Warszawa, 51: 153-184.

- Ekiz AN, Şen İ, Aslan EG, Gök A 2013. Checklist of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) of Turkey, excluding Bruchinae. *Journal of Natural History*, 47(33-34): 2213-2287.
- Kısmalı S, Sassi D 1994. Preliminary list of Chrysomelidae with notes on distribution and importance of species in Turkey. II. Subfamily Cassidinae Spaeth. *Türk Entomol. Derg.*, 18(3): 141-156.
- Özdikmen H, Bal N 2019. On the subgenus *Alledoya* Hincks, 1950 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). *Munis Entomology & Zoology*, 14(2): 350-357.
- Özdikmen H, Kaya G 2014. Chorotype identification for Turkish Chrysomeloidea (Coleoptera) Part I – Chrysomelidae: Hispinae and Cassidinae. *Munis Entomology & Zoology*, 9(1): 58-70.
- Özdikmen H, Mercan N, Cihan N, Kaya G, Topcu NN, Kavak M 2014. The importance of superfamily Chrysomeloidea for Turkish biodiversity (Coleoptera). *Munis Entomology & Zoology*, 9(1): 17-45.
- Warchałowski A 2003. Chrysomelidae: the leaf beetles of Europe and the mediterranean Area. Warszawa: Natura optima dux Foundation; 600 pp.
- Warchalowski A 2010. The Palaearctic Chrysomelidae. Identification keys. Vol. 1 & 2. Warszawa, 2010. 1212 pp.

## A SEM study on aedeagus and spermatheca of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey

Neslihan Bal\*, Hüseyin Özdikmen, Fatih Ataş, Damla Amutkan Mutlu and Zekiye Suludere

Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: neslihansilkin@gmail.com

### Abstract

The paper presents ultrastructures observed by SEM of aedeagus and spermatheca of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 that is an Asiatic-European species (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey for the first time. Male genitalia are not diagnostic, spermathecae are partly diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Accordingly, ultrastructural investigations of aedeagus and spermatheca are very important to obtain new diagnostic characters in the genus *Cassida*. Photos in SEM as well as photos in stereo microscope are also given in the text.

**Keywords:** *Cassida vibex*, SEM, ultrastructures, aedeagus, spermatheca, Turkey.

### INTRODUCTION

The genus *Cassida* Linnaeus, 1758 includes a large number of species distributed whole world (Palearctic, Nearctic, Oriental, Afro-tropical, Madagascar and Australian Regions). The genus is divided into 15 subgenera for the species distributed in Palearctic and Oriental Regions (Borowiec, 2007; Özdikmen and Bal, 2019).

The Cassidinae fauna of Turkey includes 51 species of 6 genera. The genus *Cassida* numbers 41 species of 11 subgenera (Ekiz et al., 2013; Özdikmen et al., 2014; Özdikmen and Kaya, 2014). However, a total of 5 species in 5 subgenera as *Cassida* (*Cassida*) *seladonia* Gyllenhal, 1827, *Cassida* (*Lordiconia*) *canaliculata* Laicharting, 1781, *Cassida* (*Mionycha*) *azurea* Fabricius, 1801, *Cassida* (*Mionychella*) *hemisphaerica* Herbst, 1799 and *Cassida* (*Tylocentra*) *persica* Spaeth, 1926 were reported by Kismalı & Sassi (1994), Warchalowski (2003, 2010) and Borowiec and Sekerka in öbl & Smetana (2010) from Turkey without any exact locality, but only as Asian Turkey (Anatolia). With this reason, the occurrence in Turkey of these species needs confirmation. Consequently, so it can say that the fauna of Turkish *Cassida* includes 36 species (except for 5 problematic species) of 9 subgenera on the base of exact localities in Turkey.

The nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*) Linnaeus, 1758 includes 46 species distributed whole World (45 Palearctic species including the type species *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 and one native species from North America). The nominotypical subgenus is represented by 21 species in Turkey. *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 is one of the species in the nominotypical subgenus.

According to Bordy and Doguet (1987), Borowiec and Świętojańska (2001) and Borowiec (2007), male genitalia are not diagnostic within the genus *Cassida* Linnaeus, 1758. Spermathecae are partly diagnostic.

Hitherto, we think that arrangement of the subgeneric classification in the genus *Cassida* on the base of aedeagal and especially spermathecal morphologies was overlooked due to this acceptance and approval. Whereas, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially. With this reason, ultrastructural and detailed investigations of aedeagus and spermatheca of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 from Turkey were studied with SEM and stereo microscope. Obtaining observations are presented below.

The aim of this work, ultrastructures observed by SEM and stereo microscope of aedeagus and spermatheca of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Turkey reveal for the first time.

### MATERIALS AND METHODS

The available specimens (a total of 39 specimens) for the present work were collected from Bolu, Çankırı, Çorum, İçel, Kastamonu, Kayseri and Niğde provinces in Turkey in 1997, 2001, 2003, 2015. The specimens are deposited at Gazi University (Turkey, Ankara).

The aedeagi and spermathecae were dissected from abdomen, remaining tissue were removed with fine tweezers. For microscopic examination after cleaning, the samples were placed 70% ethanol and examined with Olympus SZX7 stereomicroscope.



For scanning electron microscopy (SEM), cleaned samples were dehydrated using an ascending series of ethanol (70%, 80%, 90%, and 100%) and then air dried. After that the specimens were mounted onto SEM stubs using a double-sided adhesive tape, coated with gold using a Polaron SC 502 Sputter Coater, and examined with a JEOL JSM 6060 Scanning Electron Microscope (SEM) at 10 kV.

## RESULTS and DISCUSSION

### Species *Cassida vibex* Linnaeus, 1767 (Fig. 1)

*Cassida vibex* is an Asiatic-European species. Body length is 5.6-7.0 mm. It is distributed in almost all Europe, European Turkey (Thrace) and Asia (China, Kazakhstan, Mongolia, Turkey) (Warchalowski, 2010; Borowiec and Sekerka in Löbl & Smetana (2010)).

The species is rather widely distributed in Turkey. It has been recorded from 12 provinces in 5 of 7 Turkish regions (except for South-Eastern Anatolian Region and Eastern Anatolian Region). It is reported from Ankara, Antalya, Bartın, Bolu, Çorum, Isparta, İçel, İzmir, Kastamonu, Nevşehir, Niğde and Samsun provinces in Asian Turkey (Anatolia) and European Turkey (Thrace) without any province (Ekiz et al., 2013; Özdikmen and Kaya, 2014).

**Material examined: Turkey, Bolu prov.:** Entry of Mengen (Devrek-Mengen road), 18.VI.2003, 650 m, 1 specimen; **Çankırı prov.:** Atkaracalar, entry of Hüyük village, 40°51' N 33°3' E, 25.IV.2015, 1331 m, 1 specimen; Kızılırmak, between Küçükbahçeli-Büyükbahçeli villages, 40°23' N 33°58' E, 01.V.2015, 583 m, 1 specimen; Centre, Aşağıçavuş village, 40°41' N 33°36' E, 09.V.2015, 847 m, 2 specimens; Centre, Alanpınar-Başegmez villages return, 40°41' N 33°35' E, 09.V.2015, 822 m, 2 specimens; Kurşunlu, Dağören-Sünürlü villages return, 40°48' N 33°16' E, 10.V.2015, 996 m, 1 specimen; Eldivan, Oğlaklı village, 40°32' N 33°33' E, 13.V.2015, 1027 m, 2 specimens; Eldivan, entry of Elmacı village, 40°28' N 33°33' E, 13.V.2015, 937 m, 1 specimen; Eldivan, entry of Çiftlik village, 40°34' N 33°30' E, 14.V.2015, 844 m, 1 specimen; Centre, Tuzlu village- Yapraklı return, 40°35' N 33°40' E, 15.V.2015, 885 m, 1 specimen; Centre, Balıbağı village, 40°34' N 33°46' E, 15.V.2015, 1037 m, 1 specimen; Kızılırmak, Yukarıalagöz village, 40°22' N 33°53' E, 16.V.2015, 642 m, 2 specimens; Ilgaz, exit of Belören village, 40°51' N 33°30' E, 27.V.2015, 903 m, 6 specimens; Ilgaz, Belören village, 40°51' N 33°30' E, 18.VI.2015, 914 m, 4 specimens; Ilgaz, Sazak village, 40°56' N 33°43' E, 18.VI.2015, 1144 m, 1 specimen; Ilgaz, Kırkpınar Highland road, 41°00' N 33°41' E, 19.VI.2015, 1230 m, 1 specimen; Yapraklı, Yukarıöz village, 40°51' N 33°44' E, 25.VI.2015, 1380 m, 1 specimen; **Çorum prov.:** Tosya- Kargı road, 2 miles to Akçayazı (Zincirlikuyu env.), 16.VI.2003, 655 m, 1 specimen; Göletdere, 5 miles to Karagöl village, 16.VI. 2003, 1120 m, 1 specimen; **İçel prov.:** Fındıkpınarı, exit of Çağlayan, 25.VI.2001, 1070 m, 1 specimen; **Kastamonu prov.:** Exit of Kastamonu 6<sup>th</sup> km (between Kastamonu-Araç), 16.V.2003, 1000 m, 1 specimen; **Kayseri prov.:** Tomarza, Toklar, 10.VI.2015, 1425 m, 1 specimen; **Niğde prov.:** Between Niğde-Bor, Derbent district, 17.VI.1997, 2 specimens; Niğde Mountains, Karyagdı, 17.VI.1997, 1 specimen; Çamardı, Yelatan village, 23.VI.1997, 1280 m, 1 specimen; exit of Ulukışla, Bahçelik, 29.V.2001, 1445 m, 1 specimen.



**Figure 1.** *Cassida vibex* Linnaeus, 1767, dorsal view (left), ventral view (right).

Aedeagus and spermatheca of *Cassida vibex* were studied with SEM and stereo microscope. Obtaining observations on ultrastructural and detailed morphologies of them are presented as follows:

**Aedeagus: In stereo microscope (Figs. 2):** Median lobe almost completely brown or dark brown in 3/4 of its length basally and light brown in 1/4 of its length apically.

In lateral view, median lobe distinctly and more or less regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe right and pointed.

In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less U-shaped.

In ventral view, median lobe slightly widened only apical part and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Ventral surface of median lobe in apical part with a median flattened area that broadly and longitudinally.



A

B

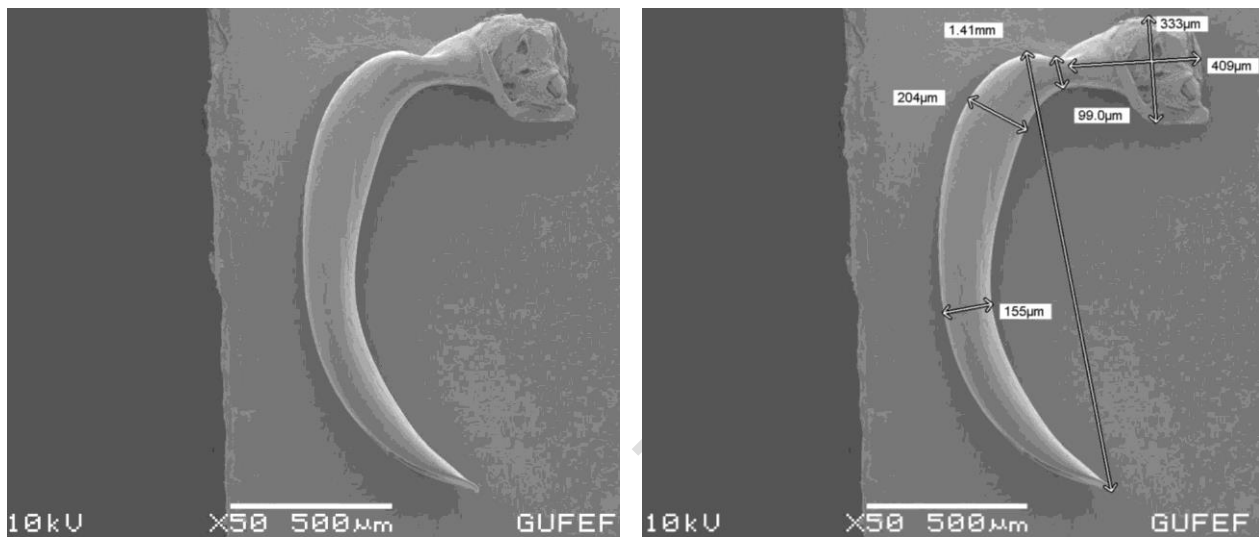
C

**Figure 2.** Aedeagus of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767, A. Lateral view, B. Dorsal view, C. Ventral view.

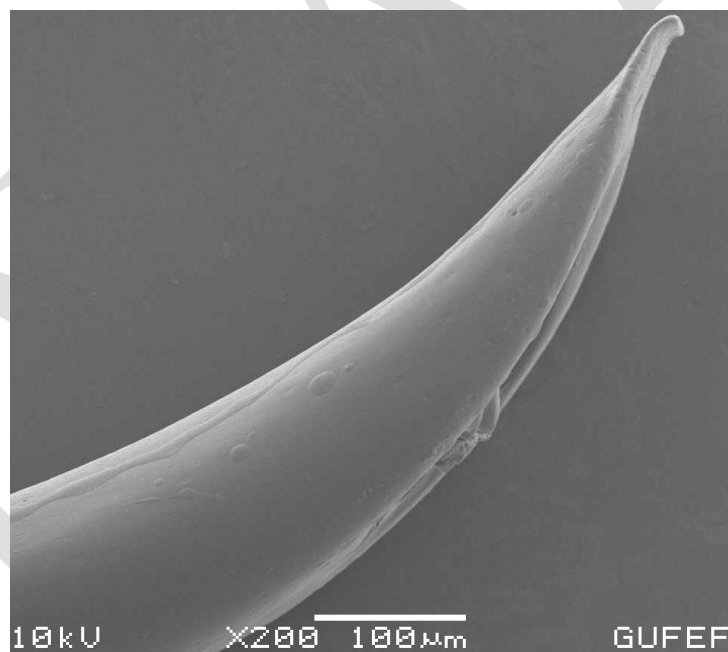
**In SEM (Scanning Electron Microscope) (Figs. 3-11):**

Similar to photos of stereo microscope in general. Only different characters in photos of SEM are presented below.

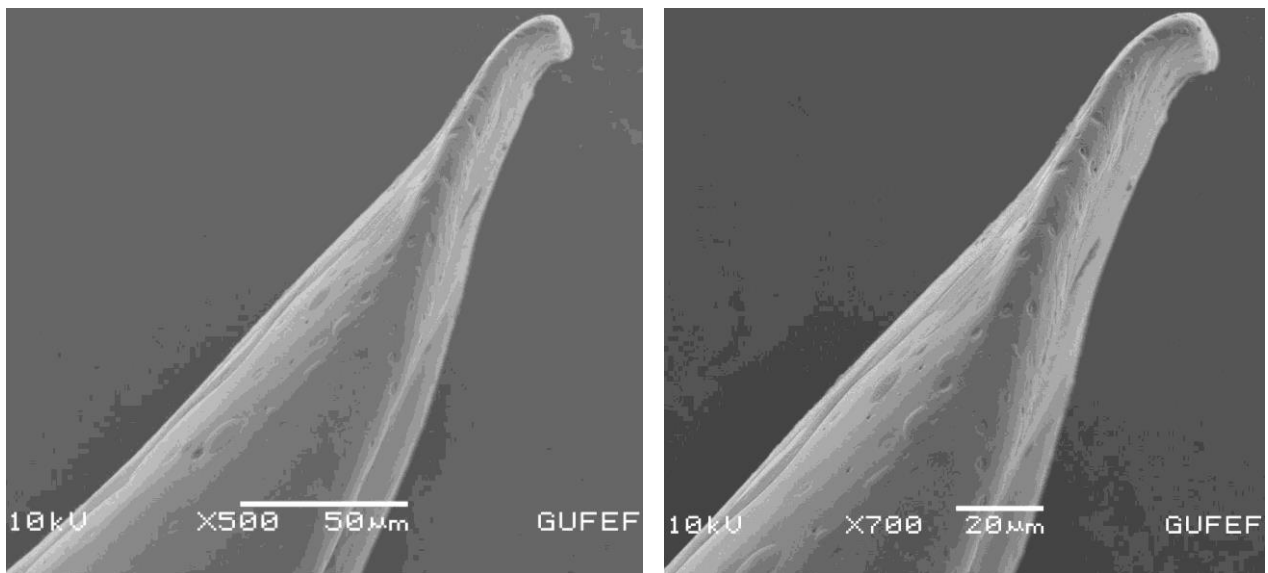
Median lobe especially in anterior half with scattered, irregular and sparsely ultrastructural pits. The pits on ventral parts of median lobe much more than on dorsal parts. The pits located only in lateral parts of terminal part of median lobe in dorsal view. Dorsal plate and flattened area behind it without ultrastructural pits in dorsal view. Also the terminal area from upper margin of orifice to aedeagal apex without ultrastructural pits in dorsal view. Apex of median lobe folded to dorsal surface and so appears like a truncated-shaped, but not cut. Apex of median lobe distinctly narrowed, additionally prolonged.



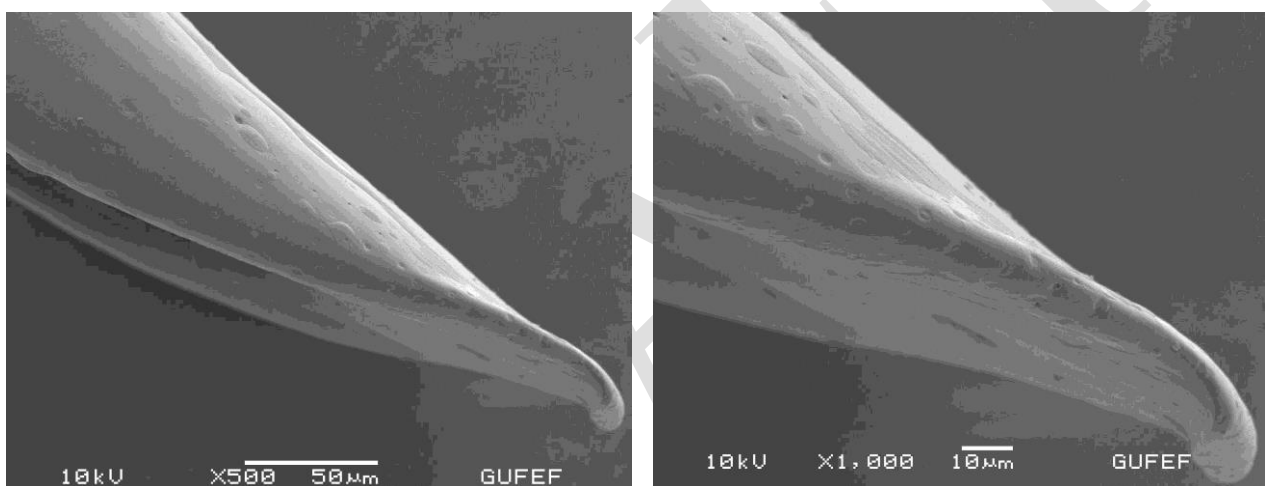
**Figure 3.** Aedeagus of *C. vibex*, lateral view (SEM).



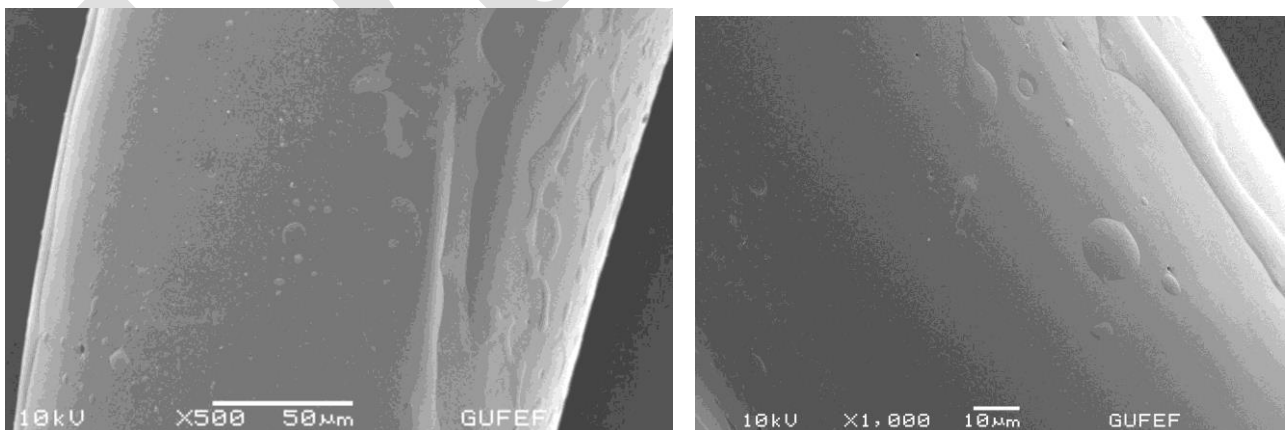
**Figure 4.** Aedeagus of *C. vibex*, apical part of median tube in lateral view (SEM).



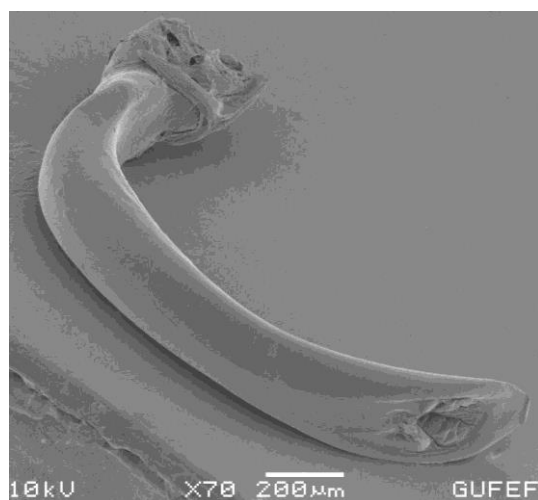
**Figure 5.** Aedeagus of *C. vibex*, folded apex and pits on apical part of median tube in lateral view (SEM).



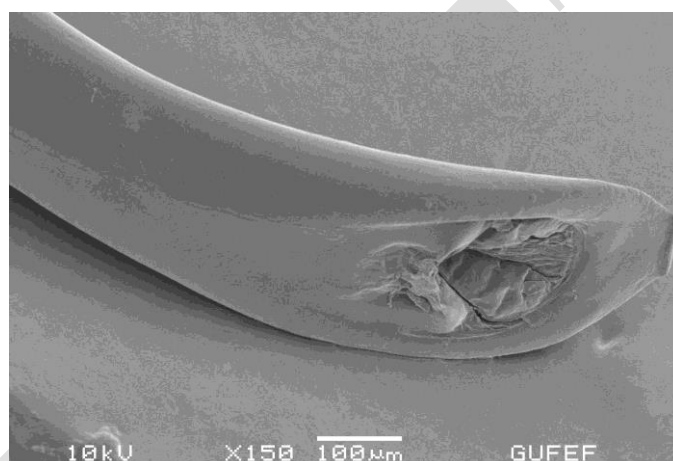
**Figure 6.** Aedeagus of *C. vibex*, folded apex and pits on apical part of median tube in lateral view (SEM).



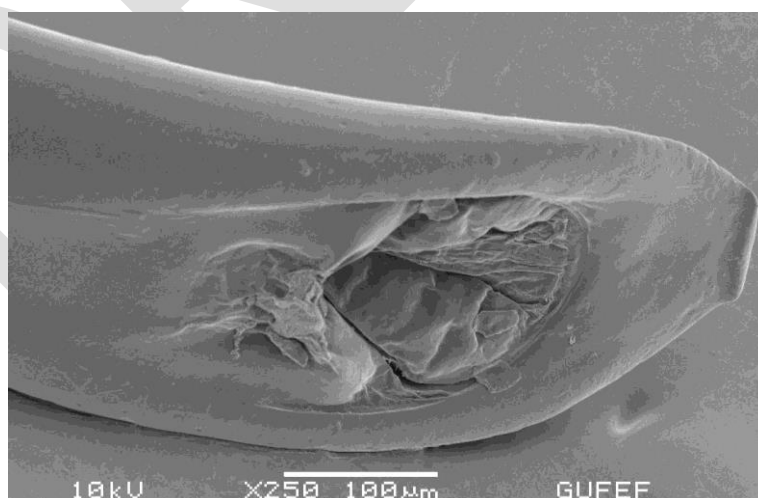
**Figure 7.** Aedeagus of *C. vibex*, pits on median part of median tube in lateral view (SEM).



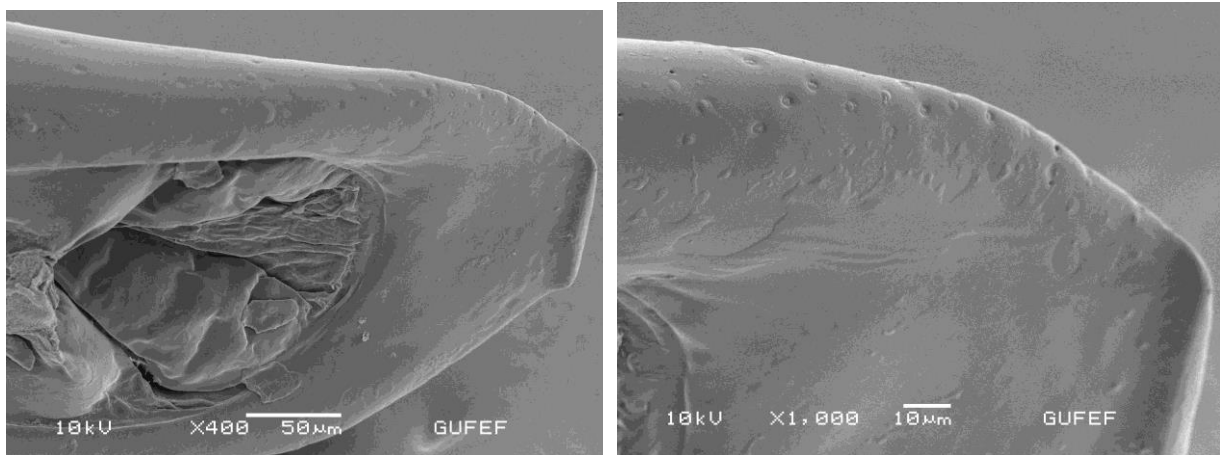
**Figure 8.** Aedeagus of *C. vibex*, dorso-lateral view (SEM).



**Figure 9.** Aedeagus of *C. vibex*, apical part of median tube in dorso-lateral view (SEM).



**Figure 10.** Aedeagus of *C. vibex*, folded apex, pits on lateral tickening of apical part of median tube in dorso-lateral view (SEM).



**Figure 11.** Aedeagus of *C. vibex*, folded apex, pits on lateral tickening of apical part of median tube in dorso-lateral view (SEM).

**Spermatheca: In stereo microscope (Fig. 12):** General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Nodulus short, almost parallel, not swollen. Nodulus darkened on internal surface basally. Collum and ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted. These parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca. Last part (or last 2/3) of ductus spermatheca probably rather long, rather thick and regularly spiral. The diameter of last part slightly larger than first part. But the diameter of spiral tube smaller than the proximal straight tube.

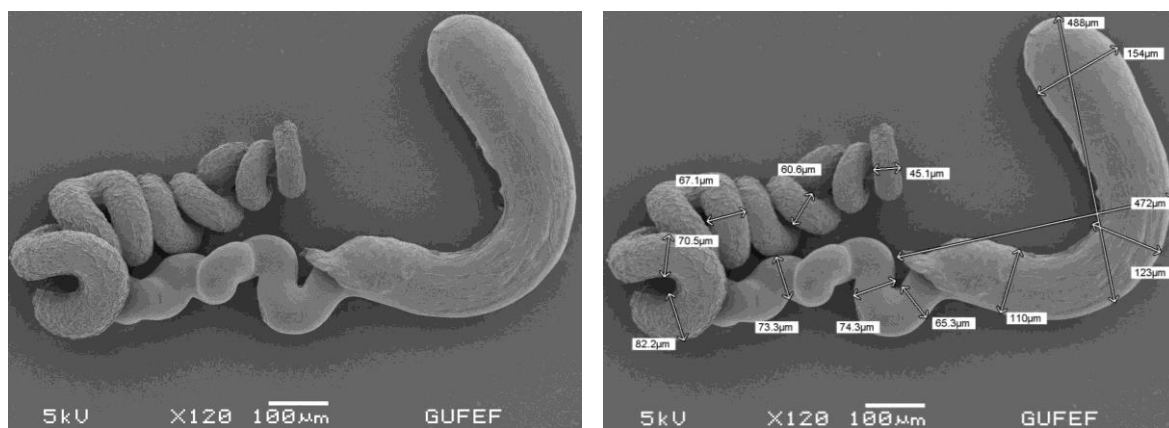


**Figure 12.** Spermatheca of *Cassida vibex* Linnaeus, 1767, lateral view.

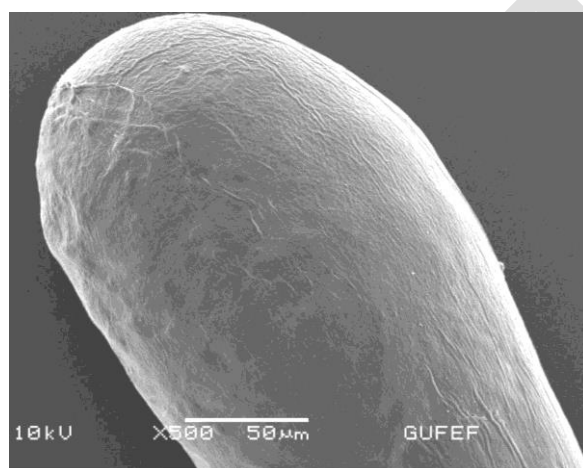
**In SEM (Scanning Electron Microscope) (Figs. 13-21):**

Similar to photos of stereo microscope in general. Only different characters in photos of SEM are presented below.

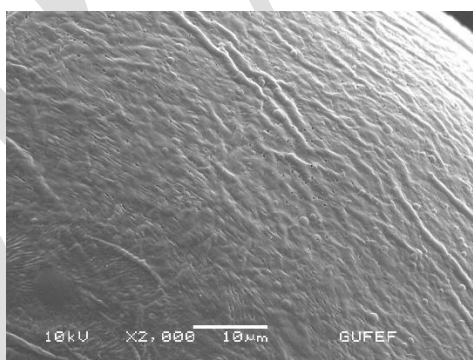
Apex of cornu rounded. Nodulus with a distinct integument on internal surface basally. The integument behind nodulus fringed that more or less corrugated. Spermathecal gland connected with proximal duct before its first curve. Nodulus, cornu, proximal tube of ductus spermatheca with scattered, irregular and sparsely ultrastructural pits.



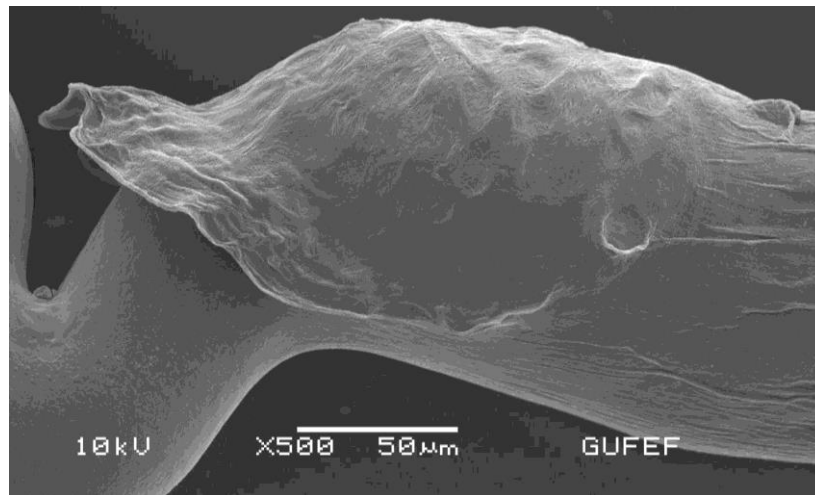
**Figure 13.** Spermatheca of *C. vibex*, lateral view (SEM).



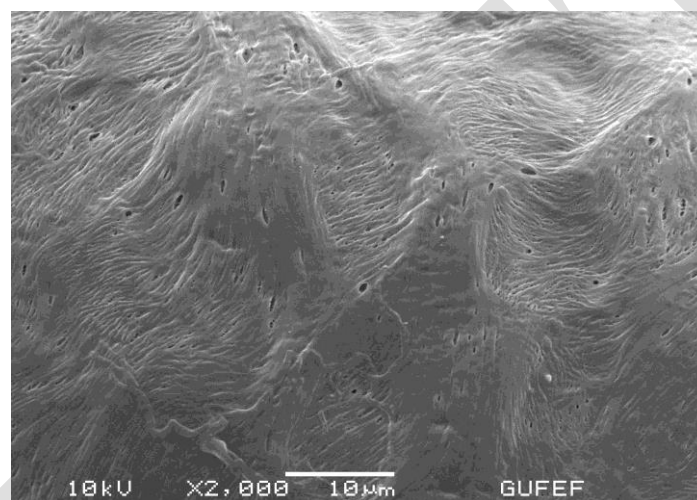
**Figure 14.** Spermatheca of *C. vibex*, apical part of cornu in lateral view (SEM).



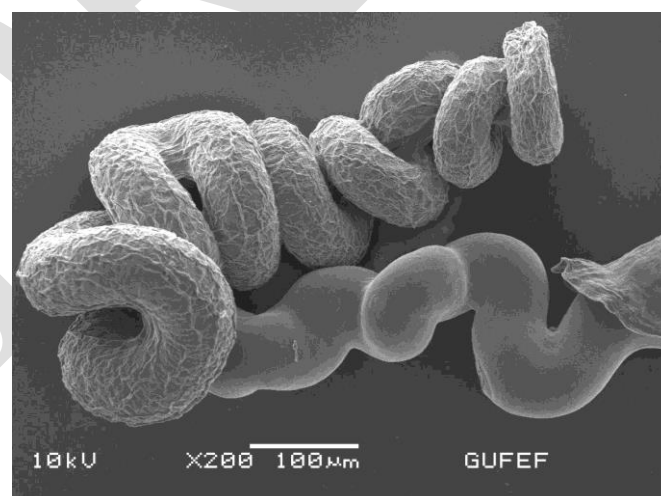
**Figure 15.** Spermatheca of *C. vibex*, pits on apical part of cornu in lateral view (SEM).



**Figure 16.** Spermatheca of *C. vibex*, integument on basal part of nodulus in lateral view (SEM).

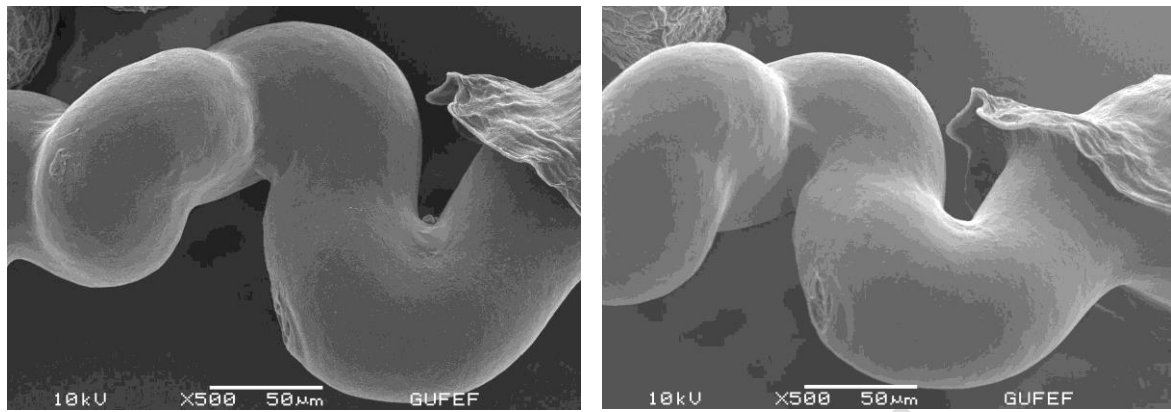


**Figure 17.** Spermatheca of *C. vibex*, pits on integument in basal part of nodulus in lateral view (SEM).

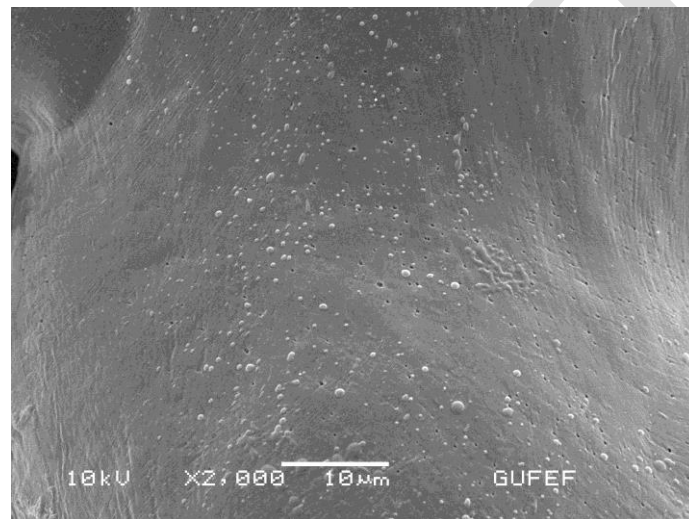


**Figure 18.** Spermatheca of *C. vibex*, ductus spermatheca in lateral view (SEM).

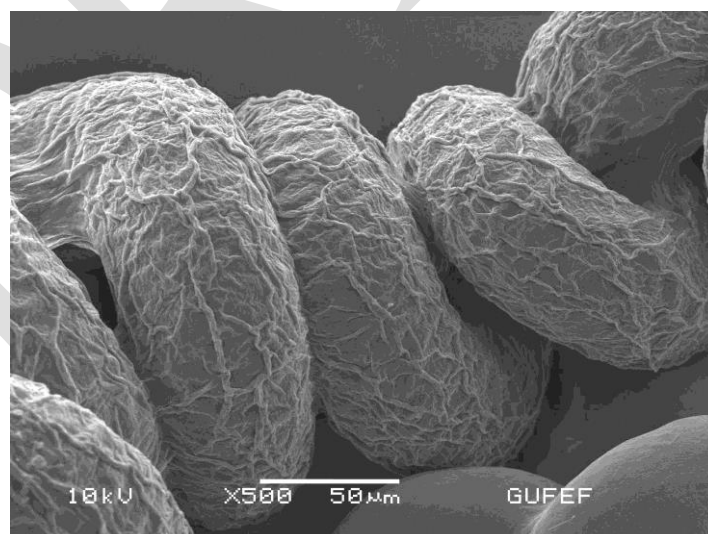




**Figure 19.** Spermatheca of *C. vibex*, connection of spermathecal gland on proximal duct in lateral view (SEM).



**Figure 20.** Spermatheca of *C. vibex*, pits on proximal part of ductus spermatheca in lateral view (SEM).



**Figure 21.** Spermatheca of *C. vibex*, spiral part of ductus spermatheca in lateral view (SEM).

As known *Cassida vibex* is in the nominotypical subgenus *Cassida* (*Cassida*). According to results of the present work, aedeagal and especially spermathecal morphologies of *Cassida vibex* distinctly differ from *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 that is the type species of the genus and nominotypical subgenus.

**Diagnostic external morphological characters of adults for *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex*:**

-. Primary puncturation of elytra arranged in regular rows, without any punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less rounded. On elytra with numerous small black spots. Underside completely black. Legs entirely yellow. Length 6.0-7.0 mm. An Asiatic-European species.... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

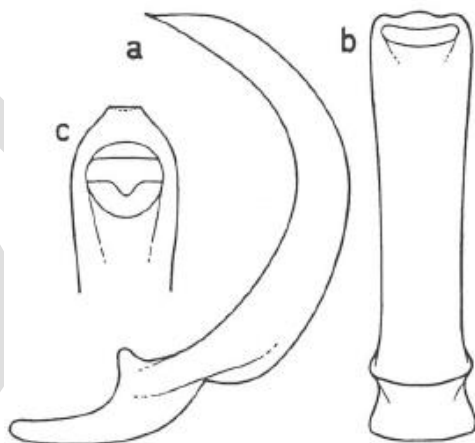
-. Elytra not regularly seriate-punctate, at least with some extra punctures between rows 3 and 4. Pronotum on both sides laterally more or less narrowed. On elytra without numerous small black spots. Elytra with a great darkened area prolonged along the suture to apical area. Underside mostly black, but borders of abdomen pale. Femora at least in basal half black. Length 5.6-7.0 mm. An Asiatic-European species..... *Cassida vibex* Linnaeus, 1767

At first view, aedeagal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex* are more or less similar in general. Even so, many characters in detail are different and diagnostic between *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex*. These diagnostic characters can see below.

**Aedeagus of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 in stereo microscope (Fig. 22):** Median lobe completely brown.

In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general. Median lobe gradually, but slightly narrowed from the base to the apex. The apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed.

In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex, and the apex more or less prolonged and clearly truncated. Upper and lateral margins of orifice more or less rounded. Dorsal plate distinct and almost covered basal half of orifice. Median lobe in lateral parts and fore part of orifice thickened. Thickening in lateral parts smaller than the fore part. Median lobe behind the orifice joined more or less V-shaped.



**Figure 22.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, a. lateral view, b. dorsal view, c. apex of median tube in dorsal view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of aedeagus for *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex* in stereo microscope:**

-. Median lobe completely brown. In lateral view, median lobe distinctly and regularly curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe almost abruptly sharpened and pointed; projection of apex short and right. In dorsal view, median lobe barely widened from the median part to the apex..... *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. Median lobe almost completely brown or dark brown in 3/4 of its length basally and light brown in 1/4 of its length apically. In lateral view, median lobe distinctly and more or less regularly (elliptically or semicircularly) curved median foramen to apex in general; the apex of median lobe gradually narrowed and

narrower and pointed; projection of apex longer and right. In dorsal view, median lobe slightly widened only apical part.....  
 .....*Cassida vibex* Linnaeus, 1767

On the other hand, spermathecal morphologies of *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex* are clearly different. Many characters in detail are diagnostic. These diagnostic characters can see below.

**Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758 in stereo microscope** (Fig. 23): General view of spermatheca in the form of opened hook or bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Collum invisible, very reduced. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.



**Figure 23.** Spermatheca of *Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758, lateral view (from Bordy, 2009).

**Diagnostic characters of spermatheca for *Cassida nebulosa* and *Cassida pannonica* in stereo microscope:**

-. General view of spermatheca in the form of opened hook or a bird beak-shaped, distinctly curved. Nodulus distinctly swollen and bulbous. Nodulus not darkened on any part. Apical part of cornu clearly sharpened. Apex of cornu pointed. Cornu with an integument trace in front of the apex. Ramus visible, but small. Ramus joined to nodulus in latero median part of external surface basally. Ductus spermatheca very long, rather fine, regularly spiral almost along its length.....*Cassida nebulosa* Linnaeus, 1758

-. General view of spermatheca eggplant-shaped or boxing glove-shaped, distinctly curved, relatively obtuse angled, dissymmetrical C-shaped (apical part of cornu prolonged). Nodulus short, almost parallel, not swollen. Nodulus darkened on internal surface basally. Apical part of cornu clearly swollen. Apex of cornu rounded. Cornu without any integument trace in front of the apex. Ramus invisible, very reduced or absent. Proximal duct joined to nodulus in latero median part of external surface basally because of ramus invisible. Ductus spermatheca rather thick, a straight tube-shaped at the proximal part, and then this tube broadly twisted. These parts probably almost 1/3 of all length of ductus spermatheca. Last part (or last 2/3) of ductus spermatheca probably rather long, rather thick and regularly spiral.....*Cassida vibex* Linnaeus, 1767

**CONCLUSION**

As mentioned above, 10 aedeagal characters for *Cassida nebulosa* that is the type species of the subgenus *Cassida* (*Cassida*), are determined. The type species is clearly distinguished from *Cassida vibex* by 4 determined aedeagal characters.

However, 9 spermathecal characters for *Cassida nebulosa* are determined. The type species clearly differs from *Cassida vibex* by all determined spermathecal characters.

Accordingly, it can say that the type species *Cassida nebulosa* and *Cassida vibex* are probably not congeneric.

According to results of the present work, we believe that ultrastructural and detailed investigations of aedeagi and spermathecae will be very important in the genus *Cassida* with regard to subgeneric classification especially.

## REFERENCES

- Bordy B 2009. Coléoptères, Chrysomelidae: Hispinae et Cassidinae, Faune de France, volume 85, 260 pp.
- Bordy B, Doguet S 1987. Contribution à la connaissance des Cassidinae de France. Étude de leur spermatheque (Coleoptera, Chrysomelidae). Nouvelle Revue d'Entomologie (N.S.), 4: 161-176.
- Borowiec L 2007. Two new species of *Cassida* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) from Madagascar and notes on subgenera of the genus *Cassida*. Zootaxa, 1586: 47-58.
- Borowiec L, Sekerka L 2010. Cassidinae. Pp. 368-390. In Löbl, I. & Smetana A. (eds.). Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Vol. 6. Chrysomeloidea. Stenstrup: Apollo Books, 924 pp.
- Borowiec L, Świętojańska J 2001. Revision of *Cassida litigiosa* group from southern Africa (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Annales Zoologici Warszawa, 51: 153-184.
- Ekiz AN, Şen İ, Aslan EG, Gök A 2013. Checklist of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) of Turkey, excluding Bruchinae. Journal of Natural History, 47(33-34): 2213-2287.
- Kısmalı S, Sassi D 1994. Preliminary list of Chrysomelidae with notes on distribution and importance of species in Turkey. II. Subfamily Cassidinae Spaeth. Türk Entomol. Derg., 18(3): 141-156.
- Özdikmen H, Bal N 2019. On the subgenus *Alledoya* Hincks, 1950 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). Munis Entomology & Zoology, 14(2): 350-357.
- Özdikmen H, Kaya G 2014. Chorotype identification for Turkish Chrysomeloidea (Coleoptera) Part I – Chrysomelidae: Hispinae and Cassidinae. Munis Entomology & Zoology, 9(1): 58-70.
- Özdikmen H, Mercan N, Cihan N, Kaya G, Topcu NN, Kavak M 2014. The importance of superfamily Chrysomeloidea for Turkish biodiversity (Coleoptera). Munis Entomology & Zoology, 9(1): 17-45.
- Warchalowski A 2003. Chrysomelidae: the leaf beetles of Europe and the mediterranean Area. Warszawa: Natura optima dux Foundation; 600 pp.
- Warchalowski A 2010. The Palaearctic Chrysomelidae. Identification keys. Vol. 1 & 2. Warszawa, 2010. 1212 pp.

## Stability enhancement in pectolytic enzymes by covalent immobilization

Suzan Biran Ay<sup>1\*</sup>, Emir Zafer Hoşgün<sup>1</sup>, Berrin Bozan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Technical University, Engineering Faculty, Department of Chemical Engineering, Eskişehir, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: suzanba@eskisehir.edu.tr

### Abstract

Current biotechnological industries demand development of new techniques for increasing enzyme utilization and extending their shelf life. These requirements are inevitable to facilitate large-scale applications and economic operations. Enzyme immobilization provides an excellent method to increase enzyme availability to utilization with greater turnover over a significant period. The two main purposes of immobilization are to obtain reusable and stable enzymes resistant to a variety of environmental agents. In this study, pectin degrading enzymes were efficiently immobilized on a natural and biocompatible support of chitosan via covalent linking using glutaraldehyde as an activating agent. The stability of free and immobilized enzymes was studied at 40-45-50-55-60°C and pH of 3.5- 4.0 - 4.5 -5.0 -5.5. Both free and immobilized enzymes showed highest activity at 45°C, however, while the immobilized pectinases retained more than 68% of their activity in the range of 40 to 60°C, the free enzymes were significantly affected and completely inactivated at 60°C. Thus, demonstrating the protective effect of immobilization on enzyme activity. The optimum pH for both free and immobilized enzyme was 4.0, free enzyme showing higher specific activity. Finally, the potential of immobilized enzymes for multiple utilization was investigated and upon use of immobilized pectinases in 5 consecutive cycles 43% of the residual activity was retained.

**Keywords:** enzyme immobilization, pectinase, chitosan, stability.

### INTRODUCTION

It is challenging to employ enzymes in industrial applications without losing their physical and operational stability (Wu et al., 2013). Due to the high cost of their isolation and purification, numerous immobilization techniques have been developed in order to benefit from their extended use. Immobilization is defined as the process of confining enzyme molecules in a distinct support or matrix. It may involve physical or chemical attachment of an enzyme to a carrier; entrapment (encapsulation) or cross-linking of the biocatalyst aiming to maintain the catalytic activity of the enzyme molecules and to provide their repeated and continuous use (Sheldon and van Pelt, 2013; Zhang et al., 2013).

There are numerous methods used in enzyme immobilization, such as adsorption, cross-linking, encapsulation, entrapment and covalent linking. Using covalent binding for attaching enzymes on solid support has a superior holding characteristics compared to entrapment or adsorption due to minimal shedding and leakage of enzyme (Sheldon and van Pelt, 2013). Still, chemical bond formation between the enzyme and support might result in enzyme inactivation due to unfavorable enzyme conformation during attachment to the support, steric hindrance or strong strength of the covalent binding (Zhang et al., 2013). This immobilization technique is irreversible, where a multifunctional reagent is used as a connector molecule (Nguyen and Kim, 2017). Glutaraldehyde is one of the most widely used reagents in the fabrication of immobilized biocatalysts (Ramirez, et al., 2016). It is a reagent with dual action, capable of reacting with amino groups of proteins as well as amine-functionalized supports (Barbosa et al., 2014; Nguyen and Kim, 2017).

Pectinases are the heterogeneous enzyme group that break down the pectin (complex polysaccharides of plant tissues) molecules into oligosaccharides by reactions such as hydrolysis, trans-elimination and de-esterification. They are one of the most industrially used group of enzymes (Kashyap et al., 2001; Rebello et al., 2017). They have a broad industrial application in various fields such as wine industry; food industry; paper industry for bleaching of pulp and waste paper recycling; in the processing of fruit-vegetables, tea-coffee, animal feed; extraction of vegetable oil and scouring of plant fibers (Buyukkileci et al. 2015; Garg et al., 2016; Grassin & Fauquembergue, 1996). The need for an efficient method ensuring pectinases' multiple use, many studies have been conducted on the immobilization of this enzyme on various supports such as calcium alginate beads and hydrogels (Rehman et al., 2013; Martin et al., 2019), celite (Chauhan et al., 2015), grafted alginate-agar gel beads (Wahab et al, 2018), magnetic cornstarch microspheres (Wang et al., 2013) polyethyleneimine (Rajdeo et al., 2016) etc.

Considering the wide usage of pectinases in food industry, there is a necessity to seek for a natural, biodegradable, biocompatible, non-toxic and inert support. Chitosan is a promising candidate as a carrier due to its hydrophilicity, rigidity, mechanical stability, and affinity to bind proteins. This polymer, comprised of D-amino glucose monomers, contains two reactive functional groups: amino ( $-\text{NH}_2$ ) and hydroxyl ( $-\text{OH}$ ) groups (Nitsae et al., 2016), amenable to further modification (Kamburov & Lalov, 2012). Chitosan can be obtained by deacetylation of chitin and is the simplest and the least expensive derivative of chitin.

In the present study, *Aspergillus niger* pectinase was covalently immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. Although the primary goal in immobilization is to produce a biocatalyst capable of operating multiple times, the confinement of enzymes on solid support may significantly reduce their catalytic activity. To evaluate the efficiency of this immobilization protocol, an investigation on thermal, pH and operational stability of both free and immobilized enzyme was conducted.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

*Aspergillus niger* pectinase (Sigma) was used in the study. High molecular weight chitosan was purchased from Aldrich. Glutaraldehyde solution (25%) was obtained from Sigma-Aldrich. Apple pectin from Sigma was used as a substrate in activity measurements. All other chemicals were standard analytical grade.

### Preparation of chitosan beads

Chitosan beads were produced by insolubilization of acidic chitosan dispersion in basic pH. 2.5% (w/v) chitosan – 1.5% (v/v) acetic acid mixture was heated to 60°C for complete solubilization of chitosan and left at room temperature for overnight mixing. Using a syringe, the viscous chitosan-acetic acid solution was added drop-wisely into 1M KOH solution and the formation of the beads was observed. The obtained beads were washed with distilled water until the wash solution had a neutral pH value and stored in 0.1 M phosphate buffer having pH=7.

### Activation of chitosan beads

Chitosan support was activated by immersing the beads in 5% (v/v) glutaraldehyde (GA) – phosphate buffer (pH=8) for 1 h at room temperature. To remove excess GA after activation, the beads were extensively washed with distilled water and later stored in 0.1 M phosphate buffer at refrigeration temperature.

### Immobilization of pectinase on chitosan beads

Pectinase solution (0.5% (w/v)) was prepared by mixing *A. niger* pectinase (Sigma) and 0.1M phosphate buffer (pH=8). Chitosan beads were put into the pectinase solution and placed on the stirrer for 2 hours. Then, the beads were separated by filtration and washed 3 times with 20 mL of the same buffer and the wash solutions were collected for analysis. Residual chitosan beads were stored in 50 ml 0.1M buffer solution at refrigeration temperature. The volume and the protein content of wash solutions were measured and the amount of enzyme bound to the support was calculated.

### Determination of immobilized protein amount

The protein content of enzyme samples was measured by Bradford method (Bradford, 1976). Shortly, 500  $\mu\text{L}$  appropriately diluted pectinase solution was mixed with 1 mL Bradford solution and after 10 min the absorbance was measured at 595nm in UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The protein content was calculated from established protein standard curve constructed with bovine serum albumin (BSA) solution (0.005-0.05 mg BSA/mL). Each reported measurement is an average of a triple analysis.

The amount of immobilized pectinase was quantified by measuring the protein content of the pectinase solution before and after immobilization, and the total protein content in the three wash solutions following immobilization. The amount of immobilized enzyme was calculated according to equation 1:

$$Mass_{immob.} = mass_{initial\ soln} - mass_{final\ soln} - mass_{washing\ solns} \quad (1)$$

### Pectinase activity assay

Pectinase activity was determined using apple pectin as a substrate. 0.5 g of apple pectin was mixed with 2 mL ethanol and dissolved in 100 mL acetate buffer (pH=4.5) and stirred overnight at room temperature. The substrate solution was centrifuged at 5000 rpm to remove any undissolved remains. The pectin hydrolysis was

carried out at 40°C and 1 ml-samples were taken from the substrate-enzyme mixture with 5 min intervals for 40 min. The activity assays were conducted by two parallel measurements. The amount of reducing sugars formed during hydrolysis was estimated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) method (Miller, 1959). Briefly, the hydrolysis samples were mixed with 1.5 mL DNSA reagent, boiled for 15 min, cooled and their absorbance was measured at 540 nm using UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The standard compound used for the calibration curve was D-(+) galacturonic acid monohydrate. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µmol galacturonic acid per mL per min under the described conditions. The results were reported as specific activity, which is defined as catalytic activity per mg of protein (equation 2):

$$\text{Specific activity } (U/mg) = \text{Enzyme activity } (U)/mg \text{ protein} \quad (2)$$

#### *pH stability*

The effect of pH on activity of free and immobilized enzyme was investigated by taking the same amount of protein (free and immobilized enzyme) and measuring the rate of reducing sugar hydrolysis from pectin by using substrates prepared in acetate buffer with a pH range of 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 and 5.5.

#### *Temperature stability*

Thermal stability of free and immobilized enzymes was studied by measuring enzyme activity in a substrate dissolved in phosphate buffer (pH=4.5) at temperatures of 40, 45, 50, 55, and 60°C.

#### *Multiple use stability*

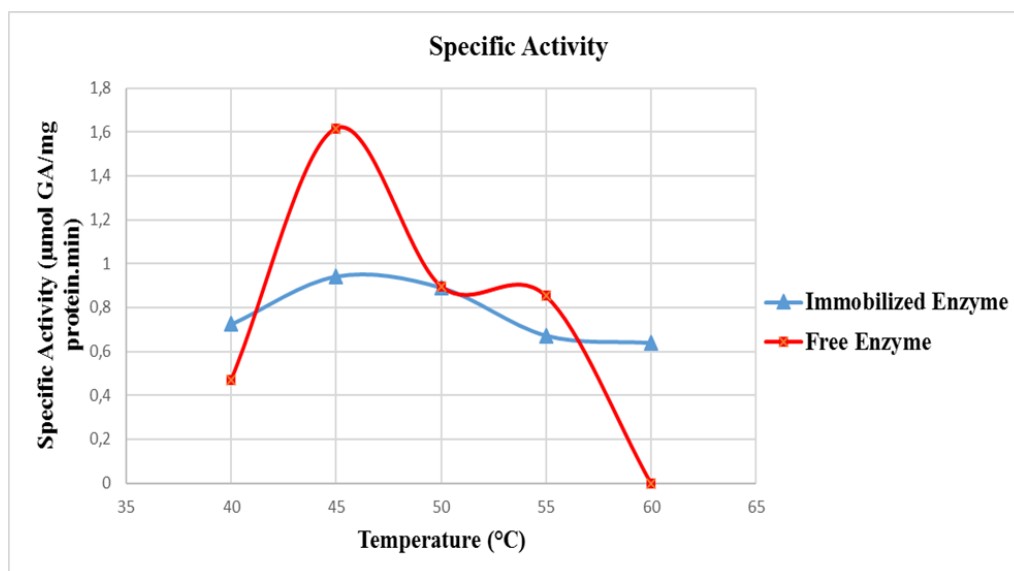
1 g immobilized chitosan beads were sequentially used for hydrolysis of apple pectin substrate. The activity measurement was conducted by taking samples from the substrate solution in time intervals for 40 min and then the produced reducing sugars were measured by DNSA method. The beads were filtered and washed, and immersed in a freshly prepared substrate solution. The multiple use cycle was repeated 5 times and the residual enzyme activity was calculated based on the initial activity of immobilized beads.

## **RESULTS and DISCUSSION**

Our preliminary studies have shown that increasing enzyme amount was not proportional to the increase in activity. Therefore, for comparison of free and immobilized enzyme, the same amounts of protein were adjusted in the stability experiments.

#### *Temperature stability*

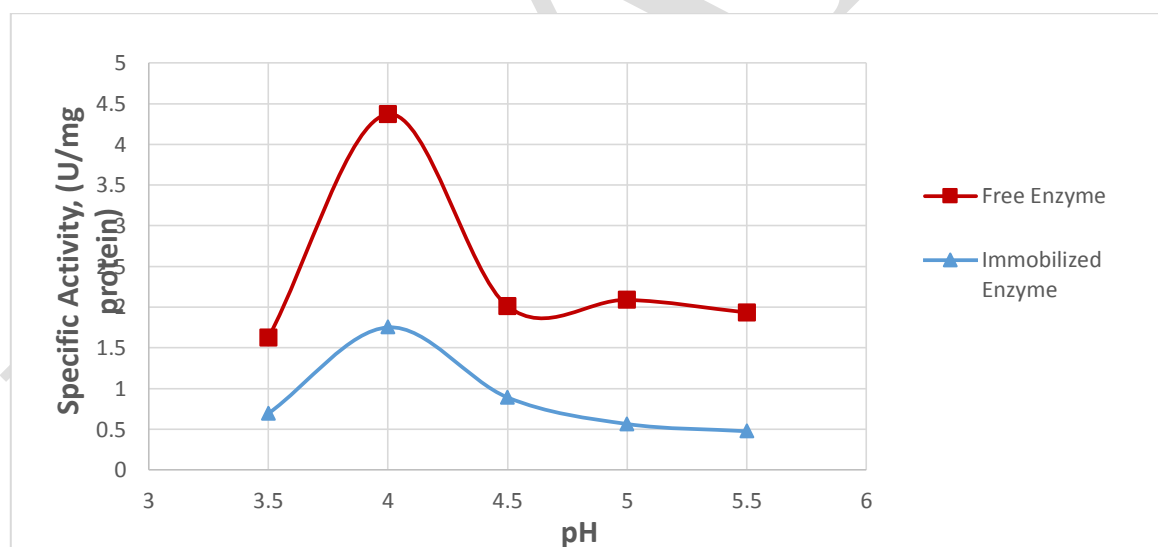
For industrial applications, it is significantly important to use an enzyme with good thermal stability, which could be improved by immobilization (Rehman et al., 2013). Temperature effect on the activity of free and immobilized pectinase was carried out by assaying different incubation temperatures, from 40 to 60 °C, at a constant pH value (4.5) and 1% (w/v) substrate concentration. Specific activities were calculated using equation 2 and results were plotted in Figure 1. Both immobilized and free enzymes exhibited a temperature optimum at 45°C, free enzyme showing higher activity than the immobilized pectinase. This implied that attachment to a support slightly limited the catalyzing ability of the enzyme, due to possible unfavorable orientation, active site obstruction or substrate diffusion limitation. In the studied range of 40-60°C, the free enzyme was substantially affected by temperature changes and completely inactivated at 60°C. For immobilized pectinase, on the other hand, temperature variations resulted in a little decrease in enzyme activity demonstrating the improved thermal stability of the enzyme. Moreover, at the studied highest temperature of 60°C, while the free enzyme had lost its activity, the immobilized pectinase retained more than 68% of its maximum activity. The enhancement in thermal stability has been attributed to the stabilizing effect of support matrix, which restricts the conformational changes of thermal denaturation (Rehman et al., 2013). Different effects of immobilization on thermal stability of pectinases were reported, while some exhibited enhanced stability at high temperatures (Wahab et al., 2018; Rehman et al., 2013), some were stabilized at lower temperatures (Martin et al., 2019), and some were not affected compared to the free enzyme (Rajdeo et al., 2016).



**Figure 1.** Effect of temperature on specific activity of free and immobilized pectinases

#### *pH stability*

The activity of free and immobilized pectinase were measured using pectin as a substrate dissolved in acetate buffer with pH values ranging from 3.5 to 5.5. For all pH conditions, free pectinase exhibited higher specific activity compared to the immobilized enzyme (Figure 2). The activity of both enzymes were measured by taking data within the same time interval. Rehman et al. (2013) stated that reaction time for immobilized enzyme increased due to diffusion limitation of substrate molecules into support beads which required greater time to reach the substrate binding site of immobilized enzyme. This also might be the reason for measured low activity of immobilized pectinase in our study.



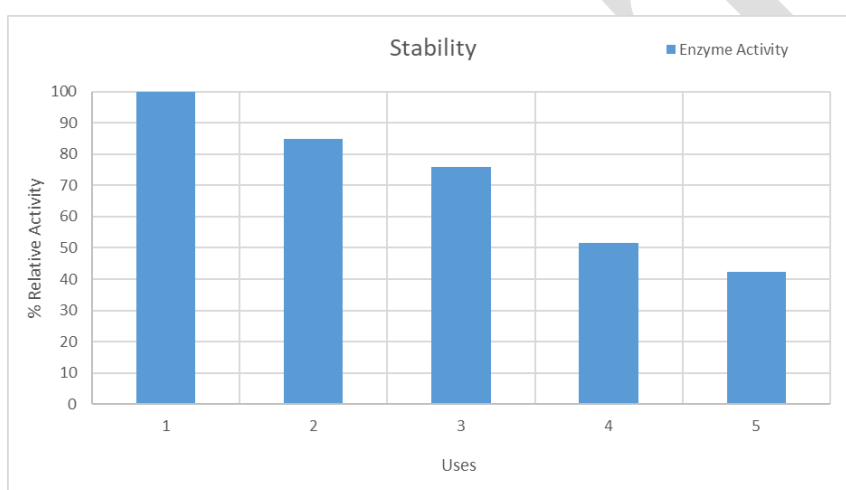
**Figure 2.** Effect of pH on specific activity (U/mg) of free and immobilized pectinases; activity measured by the hydrolysis 1% (w/v) apple pectin at 45°C.

Other studies demonstrate that, when immobilized on a support material, the enzymes might show different behavior at different pHs depending on enzyme nature as well as on the surface characteristic of the support material. Our results indicated that the immobilization had no significant impact on pH profile and optimum of pectinase. Maximum activity of both free and immobilized pectinase was found at pH 4 (Fig.2). No change of pH optimum was reported for pectinases immobilized on calcium alginate beads (Rehman et al., 2013), calcium alginate hydrogels (Martin et al., 2019), grafted alginate-agar gel beads (Wahab et al, 2018), polyethyleneimine (Rajdeo et al., 2016) supports. 0.5 change in below and above pH optimum resulted in a substantial decrease in pectinase activity (Fig. 2). Some authors reported that this decrease was less pronounced for immobilized pectinase, indicating that the immobilized enzyme had better adaptation to the pH changes than the free pectinase (Wahab et al., 2018; Martin et al., 2019; Rajdeo et al., 2016).



### Operational stability

Ability to use immobilized enzyme multiple times is a major parameter affecting the feasibility of a bioprocess. The number of reuses of the immobilized enzymes can be the marker for indicating the success of the immobilization process. It provides cost-effective solution to utilization of an expensive biological catalyst in industrial applications. However, all immobilized enzymes tend to lose their activity due to leakage from the support matrix, accumulation of inhibitory compounds, natural denaturation, etc. and eventually have to be disposed. Operational stability assays were carried out at 45°C at pH 4.5 in batch reactions and the residual activities after each use were plotted (Figure 3). As the use cycles increased, the residual activity of the enzyme gradually decreased. After the second and third use, the enzyme retained 85% and 75% of its initial activity, respectively. Following the 4<sup>th</sup> use, activity drop was more pronounced and upon the 5<sup>th</sup> re-use about 43% residual activity was retained. The results were in agreement with the previous reports of Rehman et al. (2013) and Martin et al. (2019), who measured approximately 40% relative activity after the 5<sup>th</sup> use cycle. Oliviera et al. (2018) reported about 60% , Wahab et al. (2018) and Ramirez et al. (2018) about 80% residual activity upon 5 time re-use of the immobilized pectinase. The loss of activity of immobilized enzyme may be due to leakage of enzyme from the chitosan beads as a result of washing of beads at the end of each cycle or conformational changes and denaturation because of repeated use (Rehman et al., 2013).



**Figure 3.** Operational stability of immobilized pectinase at 45°C in batch reactions

### CONCLUSION

*A. niger* pectinase was covalently bound on glutaraldehyde activated chitosan beads and the effect of immobilization on temperature, pH and operational stability of enzymes was investigated. The thermal stability of immobilized pectinases was significantly improved; while the free enzyme was completely inactivated at 60 °C, the immobilized pectinase retained 68% of its maximum activity. No significant impact on pH stability was observed. Finally, the multiple use experiments showed that immobilized pectinase preserves 43% of its initial activity upon 5 consecutive use cycles. The immobilization provides insight on potential multiple utilization of pectinases in industrial applications.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Anadolu University, Research Project BAP1605F452.

### REFERENCES

- Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R, 2014. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Rsc Advances*, 4(4): 1583-1600.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Buyukkileci AO, Lahore MF, Tari C, 2015. Utilization of orange peel, a food industrial waste, in the production of exo-polygalacturonase by pellet forming *Aspergillus sojae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(4): 749-760.

- Chauhan S, Vohra A, Lakhanpal A, Gupta R, 2015. Immobilization of Commercial Pectinase (Polygalacturonase) on Celite and Its Application in Juice Clarification. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6): 2135-2141.
- Garg G, Singh A, Kaur A, Singh R, Kaur J, Mahajan R, 2016. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *Biotech*, 6. doi:ARTN 47
- Grassin C, Fauquembergue P, 1996. Application of pectinases in beverages. *Pectins and Pectinases*, 14 : 453-462.
- Kamburov M and Lalov I, 2012. Preparation of Chitosan Beads for Trypsin Immobilization. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26: 156-163.
- Kashyap D R, Vohra PK, Chopra S, Tewari R, 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. 77(3): 215-227.
- Martín MC, López OV, Ciolino AE, Morata VI, Villar MA, Ninago MD, 2019. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Nguyen HH and Kim M, 2017. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*. 26(6): 157-163.
- Nitsae M, Madjid A, Hakim L, Sabarudin A, 2016. PREPARATION OF CHITOSAN BEADS USING TRIPOLYPHOSPHATE AND ETHYLENE GLYCOL DIGLYCIDYL ETHER AS CROSSLINKER FOR Cr(VI) ADSORPTION. *Chemistry & Chemical Technology*, 10(1): 105-113.
- Oliveira RL, Dias JL, Silva OS, Porto TS, 2018. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 109: 9-18.
- Rajdeo K, Harini T, Lavanya K, Fadnavis NW, 2016. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99: 12-19.
- Ramirez HL, Briones AI, Úbeda J, Arevalo M, 2013. Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotechnologia aplicada*, 30: 101-104.
- Rebello S, Anju M, Aneesh EM, Sindhu R, Binod P, Pandey A, 2017. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(3): 381-394.
- Rehman HU, Aman A, Silipo A, Qader SAU, Molinaro A, Ansari A, 2013. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, 139 : 1081-1086.
- Sheldon RA and van Pelt S, 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15): 6223-6235.
- Wahab WAA, Karam EA, Hassan ME, Kansoh AL, Esawy MA, Awad GEA, 2018. Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 24 full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113: 159-170.
- Wang M, Shi H, Wu D, Han HB, Zhang JX, Xing Z, Li QS, 2014. Glutaraldehyde Cross-Linking of Immobilized Thermophilic Esterase on Hydrophobic Macroporous Resin for Application in Poly(epsilon-caprolactone) Synthesis. *Molecules*, 19(7): 9838-9849.
- Wu R., He BH, Zhao GL., Qian LY, Li X. F. 2013. Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in whitewater treatment. *Carbohydrate Polymers*, 97(2): 523-529.
- Zhang D H, Yuwen L X, Peng LJ, 2013. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. *Journal of Chemistry*, doi:Artn 946248.

## The Adhesion of Dyes on Polymer and Investigation of pH Effect

Gizem ÇATIKKAŞ, Şahin ÖZEL, Ali KARA

Bursa Uludağ University Faculty of Arts and Sciences Department of Chemistry

**Abstract:** The dyestuff we work in is a mixture and reagent (rem blue mix). Wavelength scanning was carried out in dye solutions and we accepted the adsorption at 600 nm. The adsorption of different concentrations of aqueous solutions in the UV device at a certain pH range were measured. (between pH:2 and pH:12). The pre-testing with several polymers and decision to work with polymer microspheres. The study was carried out together with the polymers in a certain pH range and the adhesion of the dye on the polymers adsorbents. (between pH:2 and pH:12).

**Keywords:** rem blue mix, adsorption, polymer microspheres.

### 1. Introduction

Dyes usually have synthetic origin and complex aromatic molecular structures which make them more stable and more difficult to biodegrade. Today there are more than 10,000 dyes available commercially.(1) There was commonly about 10-15% of unused dyestuff entering the wastewater directly in the dyeing process but the loss of some reactive dyes in the dyeing process can be as high as 50% .The discharge of highly colored effluent is currently one of the world's major environmental problems as some of the dyes and their metabolites are either toxic or mutagenic and carcinogenic pose a potential health hazard to all forms of life. The use of reactive dyes has grown rapidly recently due to the increasing use of cellulosic fibers and the technical and economic limitations of other dyes used for these fibers.(2) Reactive dyes are typically azo-based chromophores combined with different types of reactive groups. They differ from all other classes of dyes in that they bind to textile fibers such as cotton to form covalent bonds.(3) The expanded use of reactive dyes during the last decade has made an impact on conventional methods for treating textile effluents due to the generally poor biodegradation of such dyes (especially those containing azo-groups) under aerobic conditions.(4) These colored compounds are not only aesthetically displeasing but they also inhibit sunlight from penetrating into the stream and reduce the photosynthetic reaction. Some dyes are also toxic and carcinogenic.(5) There are many studies in the literature related to the removal of dyes and heavy metals from industrial effluents.In many industrial fields dyes are widely used in order to colourise products and by this way a large quantity of colored wastewater is produced.(6) Conventional methods for the removal of dyes in effluents include physical, chemical, and biological processes. Unfortunately, reactive dyes are resistant to bacterial activity and biological treatment alone will take a long time to be effective. Furthermore, it is difficult to remove reactive dyes using chemical coagulation due to the dye's high solubility in water. Therefore, alternative technology must be developed to solve problem. The use of adsorption techniques for color removal from wastewater has already received considerable attention and several adsorbents have been developed for this purpose. Adsorption onto activated carbon appears to be the best prospect of eliminating this dye.(7) Separation by adsorption processes are simple and easy to apply. Adsorption efficiency; The adsorption capacity of the adsorbent used. Therefore, although natural adsorbents can be obtained easily and cheaply, polymer adsorbents are more preferred today.

Because polymeric adsorbents;

- It can be designed specific to the adsorbent desired to be removed.
- It is physically and chemically more stable.
- They have high mechanical strength and can be used repeatedly.
- The pore size is adjustable and can adsorb a large amount of organic molecules.

- It is time consuming to remove the adsorbent from the solution medium. This process can be completed in a short time with a suitable magnetic field by giving the polymeric adsorbents magnetic properties.

It is very important to design a good adsorbent.

The adsorption efficiency can be increased when adsorbents compatible with the structure of dyes are used. Therefore, the removal of dyestuffs with polymeric adsorbents among other methods is frequently preferred in recent years.(8) In addition, due to the increasing population growth and the need for water, the purification of water and re-use is extremely important both in terms of environment and economically.(9)

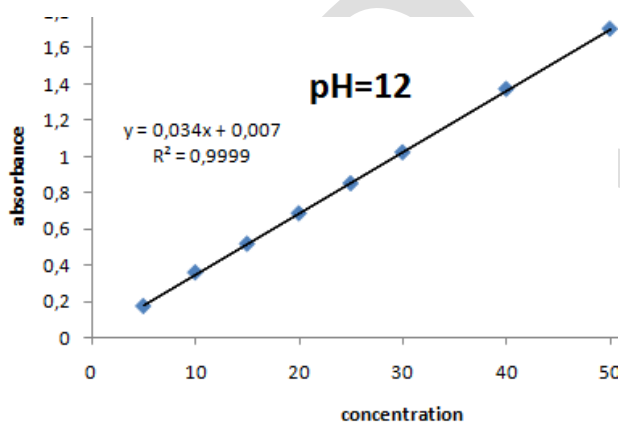
In this study, we examined at which pH and wavelength the dye works. We also observed at which pH it interacts better with the polymer and is graphically illustrated.

## 2.POLYMERS

When explaining what polymer means, it is more accurate to describe the terms monomer and polymer together. Monomer is a small molecule that can be connected to each other by covalent bonds to form larger molecules. Polymer is a large molecule (macro-molecule) formed by covalent bonding of multiple monomers to each other the degree of polymerization refers to the number of monomers in a polymer chain. Polymers having a molecular weight of about 500-600 are called "oligomers".(9)

### CLASSIFICATION OF POLYMERS

Polymers can be classified in different ways. Polymers can be classified according to molecular size, formation, source, polymerization reactions, chemical structure of the chain, physical structure of the chain, agglomeration shape, the functional groups they contain, chemical composition of the repeating units, thermal behavior and technological properties.(9)



	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
5 ppm	0,085	0,091	0,088	0,148	0,081	0,107	0,102	0,105	0,170	0,154	0,172
10 ppm	0,171	0,180	0,180	0,279	0,178	0,211	0,203	0,199	0,340	0,309	0,359
15 ppm	0,261	0,277	0,267	0,410	0,272	0,319	0,303	0,329	0,509	0,446	0,517
20 ppm	0,347	0,378	0,381	0,563	0,347	0,414	0,393	0,419	0,678	0,623	0,686

25 ppm	0,443	0,442	0,454	0,664	0,419	0,521	0,482	0,522	0,848	0,757	0,852
30 ppm	0,528	0,554	0,531	0,800	0,490	0,612	0,581	0,617	1,035	0,906	1,024
40 ppm	0,690	0,743	0,706	1,040	0,670	0,812	0,786	0,852	1,356	1,232	1,375
50 ppm	0,862	0,909	0,931	1,347	0,860	1,020	0,969	1,045	1,712	1,491	1,708

We received 20 mg polymer microspheres and added 10 mL of stock solutions. (between pH:2 and pH:12). The closed for 24 hours waited and absorbances measured. The absorbance value at pH = 2 was zero. Therefore, the best interaction between the dye and the polymer was at pH = 2

## RESULT and DISCUSSION

Linear regression of pH effects are very important factor that affects the adsorption process. In this study, the linear regression analysis of pH effects on adsorption has been examined in detail in pH (2-12). We measured the absorbance of the dye at different pH. Optimum pH was determined. We studied the interaction of polymer and dye at different pH. Temperature, time work continues.

## REFERENCES

- (1) R. Gong, M. Li, C. Yang, Y. Sun and J. Chen, Removal of cationic dyes from aqueous solution by adsorption on peanut hull. *J. Haz. Mat.*, B121 (2005) 247-250
- (2) A.W.M. Ip, J.P. Barford, G. McKay, Reactive Black dye adsorption/desorption onto different adsorbents: Effect of salt, chemistry, pore size and surface area, Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay Kowloon, Hong Kong.
- (3) Z. Aksu and S. Tezer, Equilibrium and kinetic modelling of adsorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. *Process Biochem.*, 36/5 (2000) 431-439
- (4) N.H. Ince Tezcanlı, Reactive dyestuff degradation by combined sonolysis and ozonation. *Dyes Pigments*, 49 (2001) 145-153.
- (5) S. Wang, Y. Boyjoo and A. Choueib, A comparative study of dye renasi using ly ash treated by different methods. *Chemosphere*, 1401-1407.
- (6) Bilsen Tural, Tuba Tarhan, Servet Tural, Removal Of Reactive Black 5 (Rb5) From Aqueous Solution by Cross-Linked Magnetic Biosorbent, *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, ISSN: 2321-9009, Vol-5, Iss-3, Spl. Issue-1 Aug-2017,
- (7) Özel, Ş. and A. Kara, Manyetik özelliğe sahip fonksiyonel polimerlerle Sentetik Asit Red 114 boyasının sulu çözeltilerden uzaklaştırılması ve fizikokimyasal parametrelerin incelenmesi, in 4. Uluslararası Lif ve Polimer Araştırmaları Sempozyumu. 2018: Bursa. Türkiye.
- (8) Mills, A. and S. Le Hunte, An overview of semiconductor photocatalysis. *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry*, 1997. 108(1): p. 1-35.
- (9) Pişkin, E., "Polimer Teknolojisine Giriş", İnkılap Kitapevi, Ankara, 1-199 (1987).

## Acarlar Longoz Ormanı Çevresindeki Yerel Halkın Ekoturizme Yönelik Bakış Açılarının İncelenmesi

Serir Uzun<sup>1\*</sup>, Melis Dila Ayhan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Peyzaj Mimarlığı Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

\*seriruzun@duzce.edu.tr

### Özet

Doğal ve kültürel kaynaklara zarar vermeden, sürdürülebilirliğini sağlayarak ve yerel halkın sosyo-ekonomik gelişimine katkıda bulunarak gerçekleştirilen ekoturizm; el değmemiş doğal yerlere yapılan, çevresel açıdan sorumlu ziyaretlerin genel adı olarak kullanılmaktadır. Bu araştırmanın amacı kendine özgü doğal güzellikleri, flora ve fauna çeşitliliği ile ulusal ve uluslararası öneme sahip, dünyanın beşinci Türkiye'nin ikinci büyük subasar ormanı olan Acarlar Longoz Ormanı Çevresindeki yerel halkın ekoturizme yönelik bakış açılarının belirlenmesidir. Çalışmada yöntem olarak 360 kişiyle yüz yüze görüşülerek anket uygulaması yapılmıştır. Yerel halka uygulanan anket çalışması sonucunda ekoturizme yönelik bilgi ve düşünceleri elde edilmiştir. Araştırmada ortaya çıkan sonuçlar neticesinde Acarlar Longoz Ormanı'nda doğal ve kültürel değerleri koruyarak sürdürülebilir turizm gelişimi için öneriler sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ekoturizm, Acar Longoz Ormanları, Sürdürülebilirlik

### Examination of the Views of Local People Around the Acarlar Longoz Forest Towards Ecotourism

#### Abstract

Ecotourism is carried out without harming natural and cultural resources, ensuring its sustainability and contributing to the socio-economic development of local people; It is used as the general name of environmentally responsible visits to untouched natural places. The aim of the unique natural beauty of this research, flora and fauna diversity and have national and international importance, the world's fifth-Turkey is the second largest floodplains are Acer, which is the forest is to determine the flooded forest Forest surrounding local population ecotourism oriented perspective. In this study, 360 people were interviewed face to face and a questionnaire was applied. As a result of the survey carried out on the local people, information and ideas for ecotourism were obtained. As a result of the results of the research, suggestions were made for sustainable tourism development by preserving natural and cultural values in Acarlar Longoz Forest.

**Keywords:** Ecotourism, Acar Longoz Forests, Sustainability

#### GİRİŞ

Son yıllarda insanların gerek eğitim seviyelerinin ve çevre bilinçlerinin artması gerekse kentlerin karmaşasından doğaya kaçma isteklerinin artması, doğal ve kültürel alanların daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur. Doğal ve kültürel açıdan hassas olan alanların ilgi görmesi ise doğal kaynakların sürdürülebilir kullanımına dayanan ekoturizmi gündeme getirmiş ve turizm endüstrisinin en hızlı gelişen sektörlerinden biri yapmıştır.

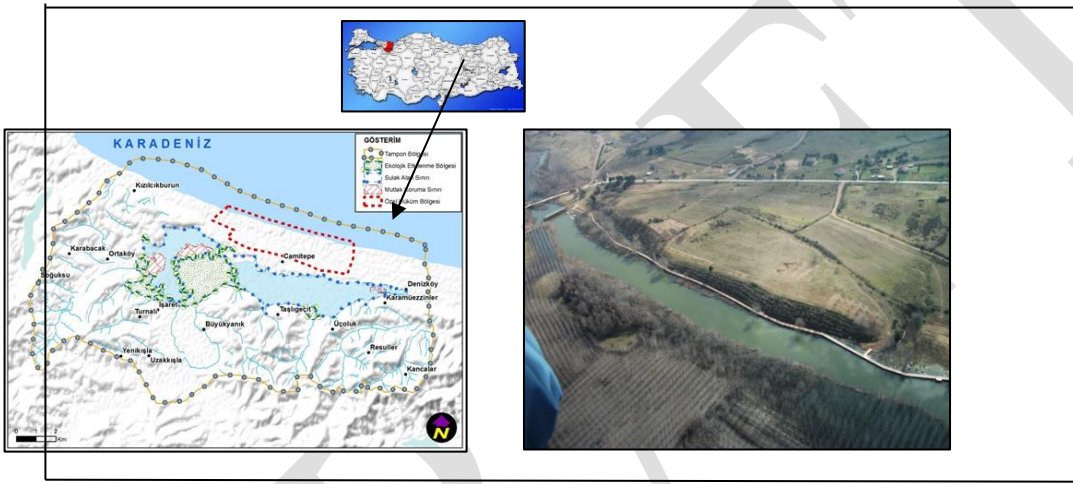
Uluslararası Doğa Koruma Birliği ekoturizmi “doğayı ve kültürel kaynakları anlayarak korumayı destekleyen, düşük ziyaretçi etkisi olan ve yerel halka sosyo-ekonomik fayda sağlayan, bozulmamış doğal alanlara çevresel açıdan sorumlu seyahat ve ziyarettir” şeklinde tanımlamaktadır (Küçükaslan, 2007). Mevcut doğal ve kültürel değerlerin turizme dahil edilmesiyle ekonomik bir anlam kazanan ekoturizm, doğa ile turizm arasında ilişki kurarak insanların gittikleri bölgelerin doğasını, kültürünü ve geleneklerini tanımaya yönelik aktiviteler bütünüdür (Ekim 2017). Ekoturizmin üç ana unsuru; çevreyi korumak ve geliştirmek, yerli kültürleri tanımak ve saygı duymak ve yöre halkına somut yararlar sağlamak olarak sıralanabilir (Blangy ve Mehta, 2006).

Ekoturizmde asıl amaç, turist sayısını aza indirmenin yanı sıra turizmi yıl içinde farklı dönemlere yaymak, doğal alanlara yapılan baskıyı en aza indirerek tahribatı önlemeye yönelik planlar yapmak ve uzun vadeli ekonomik yarar sağlamaktır (Çağatay 2002, Uçar ve ark. 2010). Koruyan ziyaretçi bilincini oluşturmaya çalışan ekoturizm aktiviteleri, faaliyet alanlarının koşullarını değiştirmeden kabul etmektedir (Polat ve Önder, 2006). Ekoturizmin faaliyet alanları el değmemiş doğal alanlar ya da kendine özgü dokusu korunmuş korunan alanlar, dağlık ve kırsal alanlar, tarihi alanlar, kıyı alanları, nehirler ve çevreleridir (Benzer, 2006).

Acarlar Longozu Ormanı birçok endemik bitki türü, yaban hayatı değerlerine sahip olması nedeniyle uluslararası öneme sahip, dünyada sayılı, ülkemizde ise önemli ikinci subasar ormanı olma özelliğini taşımaktadır. Ayrıca İstanbul, Ankara, İzmit gibi büyük şehirlerin etki alanında bulunmaktadır. Bu çalışmada Acarlar Longoz Ormanı Çevresindeki yerel halkın ekoturizme yönelik bakış açılarının belirlenmesi ve alanın sürdürülebilir kullanımının sağlanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Acarlar Longozu, Marmara Bölgesinin kuzeydoğusunda, Sakarya ili sınırları içerisinde, Karasu ile Kaynarca ilçeleri arasında yer almaktadır (SUÇEAD, 2009) (Şekil 1). Acarlar Longozu, Sakarya Nehri'nin Karadeniz'e ulaştığı kesimden yaklaşık 6 km batıda başlamaktadır. Buradan itibaren Karadeniz kıyı çizgisinden ortalama 1.5 km içeride ve kıyaya paralel olarak, batıya doğru dar ve uzunlamasına yaklaşık 12 km devam etmektedir. Yaklaşık alanı 23.231 km<sup>2</sup> ve rakımı 5 m'dir (DKMP, 2016). Acarlar Longozu, idari olarak doğusunda bulunan Karasu ilçesi bağlı bulunmaktadır. Göl alanı çevresinde Karasu ilçesine ait olan Denizköy, Camitepe köyü, Karamüezzinler köyü, Üçoluk ve Taşgeçit köyü bulunmaktadır. Gölün batıya doğru sonlandığı kesimlerden Kaynarca ilçesinin idari sınırı geçmektedir. Göl alanının çevresinde Kaynarca ilçesine ait olan Turnalı köyü, Büyükyanık köyü ve Birlik köyü bulunmaktadır (Baykal, 2006).



Şekil 1. Acarlar Longozu Coğrafi Konumu (DKMP, 2016).

Acarlar Longozu Gölü, güneybatıdan Kaynarca deresi, güneyden Kancalar deresi ile beslenmektedir. Gölün fazla suları ise doğudan Okçu deresi aracılığıyla Karadeniz'e dökülen Sakarya Nehrinin ağız kesimine boşaltılmaktadır ve "lagün" karakterindedir (Anonim, 2004). Acarlar Gölü'nün tabanı longoz – su basar ormanı ile yoğun bir şekilde kaplanmıştır (Baykal, 2006) ve gölün derinliği özellikle kış mevsiminde 4-5 m'yi bulmakta, yağışın azaldığı yaz mevsiminde 1 m'ye kadar düşmektedir.

Batı Karadeniz Bölgesinde yer alan araştırma alanı fitocoğrafik açıdan geniş anlamda Avrupa-Sibirya floristik bölgesi içinde yer almaktadır. Acar Longozunda 70 familyaya ait 203 cins, 247 tür ve tür altı takson tespit edilmiştir. Alanda 12 adet endemik bitki türü tespit edilmiştir (DKMP, 2016). Acarlar Longozu, sulak alan ve orman ekosistemlerinin bir arada bulunması nedeniyle flora ve fauna açısından oldukça zengindir. Alanda kayın, gürgen, meşe, dişbudak, karaağaç ve kızılalağaçların hakim olduğu karışık yaprak dökken orman vejetasyonu hakimdir. Alanda su ortamlarına uyum sağlamış bazı bitkilerle, göl ile kıyı arasında kumul bitkilerde yer almaktadır. Acarlar Longozu Ormanı'nın zengin bitki örtüsü, yaban hayvan türleri için barınma, beslenme ve üreme olanakları sağlamaktadır. Ayrıca alanın kuşların göç yolları üzerinde yer alması, göç dönemi birçok kuş türü için barınma, beslenme ve üreme alanına olanak sağlaması bakımından çok önemlidir. Acarlar Longozu'nda saptanan kuş türlerinin birçoğu Bern Sözleşmesi'nde öncelikli koruma uygulanan hayvan türleri arasında bulunmaktadır (TMMOB, 2012).



Şekil 2. Çalışma alanından genel görünüm (Fotoğraf: Serir Uzun, 2018).

Acarlar Longozu'nun 1976'dan önce herhangi bir koruma statüsü ile koruma altına alınmamıştır. Gölün batısındaki 1576 hektar alanın koruma ve üretme sahası olarak ayrılması uygun görülerek, Orman Bakanlığı, Milli Parklar ve Av Yaban Hayatı Genel Müdürlüğü'nce 1976 yılında "Yaban Hayatı Koruma Sahası" olarak ilân edilmiştir (Anonim, 2019a, Anonim 2019b, Anonim 2019c). 2006 yılında Acarlar Longozu'nun mevcut statüsü Yaban Hayatı Geliştirme Sahası tanımına daha uygun olduğu gerekçesiyle 2517 ha alanı kapsayan kısmı Bakanlar Kurulu kararı ile Yaban Hayatı Geliştirme Sahası statüsüne alınmıştır (DKMP, 2016). Ulusal öneme sahip sulak alan sınıfına girmesi ve nadir rastlanan su basar orman ekosistemi olması nedeniyle, Acarlar Gölü'nün tamamı Kültür Bakanlığı, Bursa Kültür ve Tabiat Varlıklarını Koruma Kurulu tarafından 25.06.1998 tarihinde, "1. Derece Doğal Sit Alanı" olarak ilan edilmiştir (DKMP, 2016).

Çalışmanın diğer bir materyalini ise Acarlar Gölü Longoz Ormanı çevresindeki uygulanmış olan anket verileri oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra çalışma kapsamında alana ait veriler (fotoğraf, proje, vb.) ve çalışma konusu ile ilgili literatürler de materyal olarak kullanılmıştır. Türkiye istatistik kurumunun verilerine göre 2018 yılı Acarlar Longoz Ormanı çevresindeki 8 tane köyün toplam nüfusu 5867 olarak alınmış olup (Anonim, 2018a), bu rakam çalışmanın evrenini oluşturmuştur. Evreni temsil edecek örneklem büyüklüğünün belirlenmesinde % 95 güven düzeyi ve % 5 hata payı (Yamane, 2001), dikkate alınarak 360 kişiyle anket çalışması yürütülmüştür.

Çalışma kapsamında uygulanmış olan anket formunun oluşturulmasında konuyla ilgili literatür taraması yapılarak benzer çalışmalardan Ekim (2017), Kasar (2017), Gökyer ve ark. (2017) ve Nayim(2017) yararlanılmıştır. Kullanılan anket formu 4 bölümden oluşmaktadır. Anketin birinci bölümünde yöre halkının bazı demografik özellikleri, ikinci bölümünde yöre halkının ekoturizm hakkındaki bilgileri, üçüncü bölümünde alanın ekoturizm için yeterlilik durumu, son bölümünde ise katılımcıların yörelerindeki ekoturizm faaliyetleri konusundaki düşünceleri sorgulanmıştır. Hazırlanan anketler Haziran-Ekim 2018 döneminde meydana rastgele olarak 360 kullanıcıya yüz yüze görüşme yöntemiyle uygulanmıştır.

Anket verilerini değerlendirmek için SPSS 22.0 programında veri tabanı oluşturulmuş ve veri girişi yapılmıştır. Veri giriş işlemi bittikten sonra veriler kontrol edilmiş ve eksik ve/veya hatalı girişler düzeltilmiştir. Oluşturulan veri seti yardımıyla çalışma amaçlarına uygun istatistiksel teknikler kullanılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Acarlar Longozu çevresinde yaşayan yerel halkın ekoturizme bakış açılarının öğrenilmesi amacıyla yapılan ankete katılanların % 52'si kadın, % 48'ü erkektir. Katılımcıların yaş dağılımı incelendiğinde ağırlıklı olarak orta yaş ve üzeri yaşa sahip olduğu görülmektedir. Katılımcıların % 52'si 50 yaş üzerindedir. Katılımcıların eğitim durumları incelendiğinde % 35'inin ortaokul, % 32'sinin ilkökul, % 18'inin de lise mezunu olduğu belirlenmiştir. Yapılan anket çalışmasında, soruları yanıtlayan kişilerin geçim kaynaklarının %29 oranla çiftçilik, %20 oranla hayvancılık olduğu belirlenmiştir. Katılımcıların aylık gelir durumlarına bakıldığında, % 47'sinin 0-2020 TL arası bir gelire sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).



**Tablo 1.** Kullanıcıların genel özellikleri

Kullanıcıların genel özellikleri		Frekans	Yüzde (%)
Cinsiyet	Kadın	188	52
	Erkek	172	48
Yaş	20-30	27	7
	30-40	51	14
	40-50	96	27
	50-60	114	32
	60 ve üzeri	72	20
Öğrenim durumu	Okuma-yazma bilmiyor	12	3
	İlkokul	116	32
	Ortaokul	125	35
	Lise	63	18
	Üniversite	44	12
Geçim Kaynağı	Memur	50	13
	İşçi	58	16
	Çiftçilik	104	29
	Esnaf	14	4
	Emekli	61	17
	Hayvancılık	71	20
	Diğer	2	1
Aylık geliri	0-2020 TL	168	47
	2021-3000 TL	115	32
	3001-4000 TL	50	14
	4001-5001TL	17	5
	5001 TL'den fazla	10	3

Katılımcılara ekoturizm kavramını duyup duymadıkları sorulduğunda %53'ü (190) duyduklarını, % 47'si, (170) ise daha önce duymadıklarını belirtmişlerdir. Katılımcıların çoğunun ekoturizm kavramını bilmesi yörede ekoturizmin geliştirilmesi açısından oldukça önemli ve dikkat çekici bir niteliktedir. Ekim (2017) yaptığı benzer çalışmasında Bafa Gölü Tabiat Parkı çevresinde yaşayan yerel halkın ekoturizmden haberdar olanlarının sayısının kitle turizminden haberdar olanlara göre iki kat daha fazla olduğunu belirtmiştir.

Katılımcılara ekoturizm kavramının kendilerine ne ifade ettiği sorgulanmış ve elde edilen bulgular Tablo 2'de verilmiştir. Katılımcıların en çok sırasıyla “çevre dostu ve doğaya saygılı bir turizmdir”, “doğayı anlatarak uygulamalı öğreten bir turizmdir” ve “doğa ile ilgili gezileri ve aktiviteleri kapsayan turizmdir” yargılarına katıldıkları görülmektedir. Ekoturizmin “pahalı, konforlu ve moda olan bir seyahat sunan turizmdir” yargısına ise katılmamaktadırlar.

**Tablo 2.** Ekoturizm kavramının anlamı

1:	Ekoturizm kavramı size ne anlam ifade etmekte	Arit. Ort*.	St. Sapma
	Çevre dostu ve doğaya saygılı bir turizmdir.	4,51	0,777
	Doğayı anlatarak uygulamalı öğreten bir turizmdir	4,45	0,778
	Doğa ile ilgili gezileri ve aktiviteleri kapsayan turizmdir.	4,44	0,780
	Farklı kültürleri ve gelenekleri tanımaya olanak sağlayan bir turizmdir.	4,41	0,913
	Konforsuz, basit ve sade olanaklar sunan turizmdir.	4,38	0,887
	Stresten, karmaşadan kaçış ve rahatlama sağlayan turizmdir.	4,35	0,945
	Macera ve sportif faaliyetlerin gerçekleştirilebildiği bir turizmdir.	4,34	0,874
	Yöre halkı için gelir sağlayan bir turizmdir.	4,20	0,913
	Yöre halkı ve turistler arasında sosyal ilişkiler kuran bir turizm türüdür.	4,01	1,163
	Pahalı, konforlu ve moda olan bir seyahat sunan turizmdir.	2,42	1,427

Kesinlikle katılıyorum, 2: Katılmıyorum, 3: Kararsızım, 4: Katılıyorum, 5: Kesinlikle katılıyorum

Katılımcıların yörelerine ekoturizmin ne gibi katkılar sağlayabileceğine ilişkin yapılan analizde 8 yargılı bir değerlendirme ölçeğinden yararlanılmıştır. Ekoturizmin yöreye sağlayacağı katkılara ait bulgular 3 önem düzeyine göre Tablo 3'de verilmiştir. Buna göre en çok yöreye ekonomik anlamda fayda sağlayabileceği görülmektedir. Bunu da sırasıyla yörenin tanıtılması ve prestijinin artırılması ve kültürel değerlerin korunması ve geliştirilmesi takip etmektedir. En az sağlayabileceği fayda olarak turizm yan sektörlerinin geliştirilmesi

gelmektedir. Kasar (2017) yaptığı çalışmasında, ekoturizm etkinliklerinin yöreye sağlayacağı katkıları sıralamış ve bunların başında ekonomik katkılar ve kültürel değerlerin korunması gelmiştir.

**Tablo 3.** Ekoturizmin yöreye sağladığı katkılar

Katkılar	En Çok	Çok	En az
Ekonomik anlamda fayda sağlar	+		
Yörenin tanıtılması ve prestijinin artırılması	+		
Kültürel değerlerin korunması ve geliştirilmesi	+		
Bitki, hayvan, su kaynaklarının korunması ve geliştirilmesi		+	
Yöre halkını yaşam koşullarının iyileşmesi		+	
Yörede alt yapı ve üst yapı koşullarının iyileştirilmesi		+	
Sosyal ilişkileri geliştirmesi		+	
Turizm yan sektörlerinin geliştirilmesi			+

Katılımcılara göre ekoturizmin yörelerinde ne gibi olumsuz etkiler yaratabileceğine ilişkin yapılan analizde 12 yargılı bir değerlendirme ölçeğinden yararlanılmıştır. Ekoturizmin yörede yaratacağı olumsuz etkilere ait bulgular 3 önem düzeyine göre Tablo 4’de verilmiştir. Buna göre “doğal ve kültürel kaynaklar ticari bir mal olarak görülür” seçeneği ilk sırada gelmektedir. Bunu sırasıyla “turistler yöre halkının yaşam biçimini olumsuz etkiler” ve “yörede hayat pahalılığı artar” seçenekleri takip etmektedir. Ekoturizm “kültürel kaynaklara zarar verir” seçeneğinin ise en az etkili olduğu saptanmıştır.

**Tablo 4.** Ekoturizmin yörede yaratabileceği olumsuz etkiler

Olumsuz Etkileri	En Çok	Çok	En az
Doğal ve kültürel kaynaklar ticari bir mal olarak görülür	+		
Turistler yöre halkının yaşam biçimini olumsuz etkiler	+		
Yörede hayat pahalılığı artar	+		
Yöre halkının kültürel ve ahlaki değerlerini olumsuz etkiler		+	
Gelenek ve görenekler yozlaşır		+	
Yöresel yemeklerin özgünlüğü bozulur		+	
Geleneksel kıyafetler kaybolur		+	
Çevre kirliliğine yol açar		+	
Yöreye göçü arttırması		+	
Yörenin sessizliği ve sakinliği bozulur		+	
Bitki, hayvan, su kaynaklarına tehdit oluşturur		+	
Kültürel kaynaklara zarar verir			+

Ekoturizm etkinliği olarak kabul edilebilecek etkinliklerin değerlendirmesi için yöre halkına yöneltilen soruda, en fazla % 20 (77) oranında doğa yürüyüşü seçeneği tercih edilmiştir (Tablo 5). Dağcılık %18 (64) oranı ve fotoğrafçılık ise %16 (59) oranı ile en fazla tercih edilen diğer seçeneklerdir.

**Tablo 5.** Etkinliklerin ekoturizm etkinliği olup olmamasının değerlendirilmesi

Etkinlik türü	Frekans	Yüzde (%)
Doğa yürüyüşleri	77	20
Dağcılık	64	18
Fotoğrafçılık	59	16
Kuş gözleme	34	10
Bitki inceleme	32	9
Bisiklet binme	24	7
At binme	22	7
Macera ve spor turizmi	21	6
Kampçılık	16	4
Mağaracılık	11	3

Katılımcılara Acarlar Longoz Ormanı ve çevresinde yapılma imkanı olan ekoturizm etkinliklerini belirlemeleri için sorulan soruya; sırasıyla doğa yürüyüşü %96, bitki inceleme %94 ve kuş gözlemlemenin %86 uygun

olduğunu belirtmişlerdir (Tablo 6). Alanın sahip olduğu zengin flora ve fauna ekoturizm potansiyeli açısından oldukça önemlidir. Bunların arasındaki endemik türler özellikle bitki gözlemciliği açısından önemlidir. Göl, aynı zamanda göçmen kuşlar için konaklama yeri olduğundan, alan kuş gözlemciliği açısından çok önemlidir.

**Tablo 6.** Acarlar Longoz Ormanı ve çevresinde ekoturizm etkinliği olup olmamasının değerlendirilmesi

Etkinlik türü	Uygun	Kısmen uygun	Uygun değil
Doğa yürüyüşleri	345	13	2
Bitki inceleme	340	15	5
Kuş gözleme	308	21	31
Fotoğrafçılık	305	45	10
Bisiklet binme	82	91	187
At binme	34	57	269
Kampçılık	33	40	283
Macera ve spor turizmi	24	38	298
Dağcılık	18	26	316
Mağaracılık	1	2	357

Katılımcılara yörelerindeki turizm faaliyetlerinden haberdar olup olmadıkları sorulduğunda % 98 'i (353) önceden haberdar olduklarını, %2'si (7) ise bilmediklerini belirtmişlerdir. Katılımcılara turizm ile ilgili bir işte çalışıp çalışmadıkları sorulduğunda %90' ı (324) çalışmadığını, % 10'u ise (36) çalıştıklarını belirtmişlerdir. Katılımcıların % 67'si (242) yörenizde ekoturizmin gelişme imkanı olsa katılır mısınız? sorusuna evet cevabı vermiştir. Bu katılımcılar sırasıyla %53 (191) oranla yerel ürünlerin (tereyağ, fındık vb.) pazarlanması ve hediyelik eşyaların satılmasında, %22 oranla (80) ev pansiyonculuğunda, %19 oranla (68) doğal alanlarda yapılacak aktivitelerde ve %6 (21) oranla da turistik tesislerde aktif şekilde çalışırım şeklinde cevap vermiştir. Ekim (2017) yaptığı benzer çalışmada yöre halkının %65'lik bir oranla ekoturizm faaliyetlerinde çalışmak istediklerini ve en çok % 42'lik bir oranla ekolojik ürün (zeytin yağı vb.) satabileceklerini belirtmiştir.

Katılımcılara Acarlar Longoz Ormanı ve çevresinin en çok hangi değerinin ekoturizm açısında dikkat çekici olduğu sorulduğunda %32' si (116) göl varlığının, %28'i (100) bitki örtüsünün, % 22'si (79) hayvan varlığının, %10'u (36) dünyanın sayılı subasar ormanı oluşunun, % 8'i (29) sessiz sakin bir yer oluşunun etkili olduğunu belirtmiştir.

Yöre halkına Acarlar Longozu ve Çevresindeki ekoturizm faaliyetlerinin gelişmesini engelleyen olumsuz faktörler hakkındaki düşünceleri sorulmuş ve elde edilen bulgular Tablo 7'de verilmiştir. Buna göre katılımcıların en etkili faktörleri sırasıyla konaklama tesislerinin olmayışı, alanın tanıtımının yapılmaması ve hafta sonları alanın ziyaretçi taşıma kapasitesinin yetersiz oluşu şeklinde sıralamıştır. Etkisiz olan faktörleri ise yerel halkın turistlere bakış açısı ve alana ulaşımın güç olması şeklinde sıralamışlardır. Kasar (2017) ve Gökkyer ve ark. (2017) yaptıkları benzer çalışmada yöre halkının yörede ekoturizmin gelişmesini engelleyen olumsuz faktörlerin başında konaklama tesislerinin olmayışının geldiğini belirtmişlerdir.

**Tablo 7.** Ekoturizm faaliyetlerinin gelişmesini engelleyen olumsuz faktörler

Faktörler	Arit. Ort*.	St. Sapma
Konaklama tesislerinin olmayışı	4,96	0,775
Alanın tanıtımının yapılmaması	4,94	0,767
Hafta sonu ziyaretçi taşıma kapasitesinin yetersizliği	4,89	0,797
Restoran, kafeterya, büfe gibi hizmet alanlarının yetersiz olması	4,87	0,772
Piknik alanlarının yetersizliği	4,84	0,892
Kamp alanlarının bulunmayışı	4,80	0,933
Yürüyüş patikalarının az oluşu	4,75	0,910
Doğa sporları aktivite alanlarının ve imkanlarının eksikliği	4,65	0,975
Altyapı olanaklarının yetersizliği	4,41	0,881
Güvenliğin yetersizliği	3,07	0,912
Rehberlik hizmetlerinin yetersiz olması	3,02	0,978
Yerel halkın turistlere bakış açısı	2,40	1,167
Ulaşımın güçlüğü	2,09	1,151

1: Kesinlikle katılıyorum, 2: Katılıyorum, 3: Kararsızım, 4: Katılıyorum, 5: Kesinlikle katılıyorum

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Acarlar Longozu'nda ağırlıklı olarak günübürlük piknik, son yıllarda yapılan birkaç bungalovla gece konaklama, doğa yürüyüşleri, fayton ve atv binme ile sınırlı kalan kontrolsüz bir turizm görülmektedir. Çalışmada yöre halkının sosyoekonomik yapısı ve ekoturizm konusundaki eğilimleri değerlendirilmiştir. Yöre halkının ekoturizm konusunda bilgi sahibi olduğu, ekoturizm faaliyetlerini destekledikleri ve ekoturizm faaliyetlerine katkı sağlamak konusunda istekli oldukları görülmektedir. Yöre halkının yerel ürünlerin pazarlanması, ev pansiyonculuğu gibi ekoturizme ilişkin temel faaliyetlere katılabileceklerini belirtmişlerdir.

Dünyada sayılı, ülkemizde ise önemli ikinci subasar ormanı olarak doğal zenginlikleri, flora ve fauna çeşitliliği bakımından ulusal ve uluslararası önemli orman olma özelliği taşıyan Acarlar Longozu ekoturizm faaliyetleri açısından önemli kaynak değerlerine sahiptir. Bu çalışma neticesinde Acarlar Longoz Ormanı ve Çevresinde ekoturizm faaliyetleri için önemli kaynaklar bulunmasına karşın bu kaynakların yeterince bilinmediği ve değerlendirilemediği tespit edilmiştir. Bu kaynakların planlı bir şekilde altyapı imkânları sağlanarak kaynak değerlerine zarar vermeyecek şekilde kullanılması ile ekoturizmin gelişmesine imkan verilebilir. Bu sayede yerel halka yeni iş kaynakları yaratılarak dışa göç bir nebze önlenmiş olacaktır. Bu şekilde bölgesel turizm potansiyeli gelişirken, aynı zamanda ekonomik olarak kalkınma da sağlanacaktır.

Yerel halk koruyarak-kullanma konusunda bilinçlendirilmelidir. Ekoturizmin gelişebilmesi için altyapı çalışmalarına destek verilmelidir. Acarlar Longoz Ormanı'nın iyi bir şekilde tanıtımının yapılması gerekmektedir. Alanın taşıma kapasitesi belirlenmelidir. Ayrıca ekoturizm etkinliklerini geliştirmek için valilik, belediye, kaymakamlık, köy muhtarlıkları, doğa demekleri ve doğa sporları kulüpleri tarafından ekoturizm planlaması yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Anonim, 2004. Acarlar Gölünün Çevresel Analizi ve Sürdürülebilir Kalkınma Açısından Değerlendirilmesi Projesi, Ara Rapor, (Ekolojik Özellikler ve Başlıca Çevre Sorunları) Türkiye Çevre Koruma ve Yeşillendirme Kurumu, British Embassy.
- Anonim, 20019a. [https://www.nufusu.com/ilce/karasu\\_sakarya-nufusu](https://www.nufusu.com/ilce/karasu_sakarya-nufusu) .Erişim tarihi: 5/05/2019.
- Anonim, 20019b. <http://www.nufusune.com/kaynarca-ilce-nufusu-sakarya>. Erişim tarihi: 5/05/2019.
- Anonim, 20019c. <http://sakaryakaynarca.bel.tr/tr-tr/alt-sayfalar/224/acarlar-longozu>. Erişim tarihi: 5/05/2019.
- Baykal H, (2006). Acarlar Longozu (Sakarya) Örneğinde Korunan Alanlarda Eğitim ve Bilinçlendirme Araçlarının Genel Özelliklerinin Saptanması, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, FBE, Ankara.
- Benzer KAN, (2006). Bolu-göynük ve yakın çevresi doğal ve kültürel kaynaklarının ekoturizm açısından değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Ankara, 296s.
- Blangy S, Mehta H, (2006). Ecotourism and Ecological Restoration, Journal for Nature Conservation, Finland, 14 (3-4)
- Çağatay A, (2002). Turizm için mekan ve yerel toplulukların katılımının planlanması Aksekiİbradı Havzası örneği. 2. Turizm Şurası Bildirisi 2.Cilt, s:205, 12-14 Nisan, Ankara.
- DKMP, (2016). Acarlar Gölü Longoz Ormanı, Sulak Alan Yönetim Planı. T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Doğa Koruma Dairesi Başkanlığı.
- Ekim V, (2017). Bafa Gölü Tabiat Parkı Ve Çevresinin Ekoturizm Potansiyelinin Belirlenmesi ve Çevre Sorunları. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı. Muğla, 137s.
- Gökyer E, Öztürk M, Tekiner F, Özsoy H, (2017). Bartın İlinde Yerel Halkın Ekoturizm ve Ekoturizm Alanlarına İlişkin Algılarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Karabük Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi. Özel sayı:3, 177-185s.
- Kasar Y, (2015). Rumkale Arkeolojik Sit Alanı ve Yakın Çevresinin Ekoturizm Potansiyelinin Peyzaj Mimarlığı Açısından Değerlendirilmesi. Basılmamış Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Peyzaj Mimarlığı ABD. Isparta, 180s.
- Küçükaslan N, (2007). Özel ilgi turizmi, Ekin Basın Yayın Dağıtım, s.80-81-84
- Nayim YS, (2017). Bartın İli Kapısuyu Köyü'ndeki Yerel Halk, Ziyaretçiler ve Yöneticilerin Sürdürülebilir Turizm Planlamasına Yönelik Bakış Açılarının İncelenmesi. Gümüşhane Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü. Cilt 8Sayı 19. 137-153s.

- Polat AT, Önder S, (2006). Karapınar İlçesi ve Yakın Çevresi Peyzaj Özelliklerinin Ekoturizm Kullanımları Yönünden Değerlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 20 (40): (2006) 53-64
- SUÇEAD (Su ve Çevre Araştırmaları Derneği), (2009) “Acarlar Gölü Longoz Ormanı Sulak Alan Yönetim Planı” T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Doğa Koruma Dairesi Başkanlığı Sulak Alanlar Şube Müdürlüğü.
- TMMOB (Türk Mühendis ve Mimar Odaları Birliği), (2012). “Karasu Kıyı Alanı Kıyı Daralması Raporu 2012”, Mattek basım Yayın Tanıtım Tic. San. Ltd. Şti., Ankara
- Uçar M, Çeken H, Ökten Ş, (2010). Kırsal Turizm ve Kırsal Kalkınma (Fethiye Örneği). Detay Yayıncılık, Ankara.
- Yamane T., (2001). Temel Örnekleme Yöntemleri. (İngilizceden Çeviren: Alptekin Esin, M. Akif bakır, Celal Aydın ve Esen Gürbüzsel). İstanbul: Literatür Yayıncılık., s 53.

## Koyun ve sığır yetiştirilen karma bir çiftlikten coryza gangrenosa bovum tespiti

Tuba Çiğdem Oğuzoğlu

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: oguzoglu@ankara.edu.tr

### Özet

*Coryza gangrenosa bovum* (CGB) enfeksiyonu, duyarlı ruminant türlerinde; ovine herpes virus-2 veya Afrika'da antilopları enfekte edebilen alcelaphine herpesvirus-1 tarafından oluşturulan, ekonomik öneme sahip ve son konakçı olan sığırların ölümü ile sonuçlanan bir virus enfeksiyonudur.

Bu çalışma; koyun ve sığırların bir arada beslendiği bir çiftlikten gelen organ materyalinde ovine herpes virus-2 tegument gen bölgesini çoğaltabilen primerler kullanılarak yapılan semi-nested polymerase chain reaction sonrası ilgili gen ürününün tespitine dayanmaktadır.

Türler arası geçiş olasılığı olan virusların duyarlı hayvanlar için risk oluşturacağı savından hareketle, küçükbaş ve büyükbaş hayvancılık işletmelerinde ahırlar arası mesafelerin yeterli uzaklıkta olması ve görevli personelin dezenfeksiyon ve sanitasyon tedbirlerine dikkat etmesi hayati öneme sahip tedbirler arasındadır. Bu bağlamda; CGB gibi hastalıkların bulaş ihtimalleri düşürülerek; enfeksiyonların kontrol altına alınabilmesi mümkün olabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Coryza gangrenosa bovum*, koyun-sığır karma çiftlik, tanı

### Detection of coryza gangrenosa bovum from a sheep and cattle mixed farm

#### Abstract

*Coryza gangrenosa bovum* (CGB) infection, susceptible ruminant species; ovine herpes virus-2 or alcelaphine herpesvirus-1, which is capable of infecting antelopes in Africa, is an economically important virus infection that results in the death of cattle as the last host.

This work; it is based on the detection of the related gene product after the semi-nested polymerase chain reaction using primers that can amplify the ovine herpes virus-2 tegument gene region in organ material from a farm where sheep and cattle are fed together.

Considering that viruses with probable cross-species are likely to pose a risk to susceptible animals, it is vitally important that the distance between stables in small ruminants and cattle-breeding establishments be sufficient and that the personnel in charge pay attention to disinfection and sanitation measures. In this context; by reducing the likelihood of transmission of diseases such as CGB; it will be possible to control infections.

**Keywords:** *Coryza gangrenosa bovum*, sheep-cattle mixed farm, diagnosis.

### GİRİŞ

*Coryza gangrenosa bovum* (CGB), malignant catarrhal fever (MCF) adıyla da tanınan, *Herpesviridae* ailesinin *Gammaherpesvirinae* alt ailesinde yer alan viruslarca; ovine herpes virus-2 (OvHV-2) ve Afrika'daki antilopları etkileyen tür alcelaphine herpesvirus-1 (AIHV-1) tarafından meydana getirilen, esas konakçısının koyun-keçi gibi küçük ruminantlar olduğu, duyarlı sığırlarla temas sonucu onları enfekte ederek ölümlerine neden olan bir virus enfeksiyonudur (Plowright ve ark., 1960; Plowright, 1990; Davison ve ark., 2009).

Hastalığın klinikopatolojik özellikleri özellikle enfekte sığırlarda tanımlanmaktadır. Bulgular arasında yüksek ateş, lenfadenopati, keratokonjonktivitis, lenfoid vaskülit, sinovitis, dermatitis ve tüm mukozal yüzeylerde şiddetli inflamatuvar ve dejeneratif lezyonlar bildirilmektedir. Bu hastalığın etkenlerinden olan OvHV-2, tüm dünyada bildirilmiş olup, sıklıkla asemptomatik enfekte koyunlarla temas ile sığırların enfeksiyonundan sorumlu tutulmakta ve koyun ile ilişkili MCF'ye (SA-MCF) neden olmaktadır. SA-MCF; sığırlar (Bridgen & Reid, 1991) yanısıra diğer büyükbaş hayvanlardan geyik (Denholm ve Westbury, 1982; Reid ve ark., 1979, 1987), bizon (Collins ve ark., 2000; Schultheiss ve ark., 1998), manda ve "Banteng" adı verilen Güneydoğu Asya'ya özgü yabani sığır türlerinde (Ramachandran ve ark., 1982) de bildirilmiştir. Afrika antilopları ile ilişkili veya Afrika MCF'si olarak bilinen alcelaphine herpesvirus-1 (AIHV-1) ile oluşan enfeksiyon ise genellikle Afrika kıtasında bildirilmiştir. AIHV-2

(Reid ve Rowe, 1973), hippotragine herpes virus-1 (Reid ve Bridgen, 1991), beyaz kuyruklu geyiklerde tanımlanan gammaherpesvirus (Li ve ark., 2000) ve keçilerde tanımlanan caprine herpesvirus-2 (CpHV-2) (Li ve ark., 2001; Keel ve ark., 2003) ile viral çeşitlilik artmıştır.

Ülkemizde de bildiri yapılan CGB enfeksiyonu (Dabak ve Bulut, 2003; Yazıcı ve ark., 2006; Kırbaş ve ark., 2013), koyun-sığır yetiştiriciliğinin birlikte yapılması kaynaklı görülmektedir. Bu çalışmada da benzer bir bulaş yolu söz konusu olup, moleküler tanı metodu kullanılarak yapılan teşhis sonrası hayvancılık işletmesine enfeksiyondan korunmaya yönelik önerilerde bulunulmuştur.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada, 180 koyun ve 32 sığırın birlikte yetiştirildiği bir hayvancılık işletmesinden tanı amacıyla Veteriner Hekim tarafından gönderilen otopsi materyali kullanılmıştır. Sığırlarda yüksek ateş, keratokonjunctivitis, üst solunum yolu lezyonları, mukosal yüzeylerde erozyonların varlığını takiben ani ölüm vakaları (n=6) gözlenmiş olup, ölen bir sığıra ait akciğer ve karaciğer dokusu tanı amacıyla soğuk zincir altında laboratuvara gönderilmiştir.

Gönderilen organ materyallerinden 0,5'er gr alınarak petride bistüri yardımıyla parçalanmış, 1/10'luk oranda phophat buffered saline (PBS) içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenizat +4 °C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatanttan 400 mikrolitre (µl) 2ml'lik eppendorf tüpe alınarak Phenol:Kloroform:İzoamilalkol ekstraksiyonu (Sambrook ve ark. 1989) ile viral nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Viral DNA, spektrofotometrik olarak ölçülmüş, 50 ng/ml üzerinde olarak tespit edilmiş ve seminested polymerase chain reaction (PCR) metodu kullanılarak amplifiye edilmek üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Seminested-PCR'da Baxter ve ark. (1993) ve Li ve ark. (1995)'nin bildirdiği primerler ve metod kullanılmıştır (Tablo-1).

**Tablo-1.** Kullanılan primerler, dizinleri ve ürün büyüklükleri.

Primer Adı	Primer Dizini	Ürün büyüklüğü-baz çifti (bç)
556	5'-AGTCTGGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3'	422 bç
755	5'-AAGATAAGCACCAGTTATGCATCTGATAAA-3'	
555	5-TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3	238 bç

Seminested PCR'da ilk turda 556 ve 755 nolu primerler, ikinci turda 556 ve 555 nolu primer çifti kullanılmıştır. Birinci turda 422 baz çiftlik (bç), ikinci turda 238 bç'lik ürünlerin PCR sonrası görüntülenmesi; %1'lik agaroz jelde uv transluminatörde (Kodak) yapılmıştır.

## BULGULAR

Organ örneklerinde OvHV-2 spesifik primerler kullanılarak yapılan seminested PCR'da beklenen büyüklükte ampikonların varlığı tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak deionize moleküler su kullanılmıştır. Her iki turda da beklenen büyüklükte ampikonlar tespit edilmiştir. Şekil 1'de jel görüntüsü bulunmaktadır.

## TARTIŞMA

Herpesviruslar, doğası gereği persiste latent enfeksiyon meydana getirirler, yani gizlenir ve yeniden aktive olurlar. Bu çalışmanın konusunu oluşturan herpesviruslarda ise türler arası geçiş mümkündür ve *ovidae* familyası yanısıra *bovidae* türleri de bu virusla enfekte olabilir. Nitekim; her ne kadar OvHV-2'nin doğal konakçısı ovine (koyun, keçi) türler ise de; klinik bulgular küçük ruminantlarda belirgin değildir, ancak diğer ruminant türlerinde örneğin sığırlarda enfeksiyonun tanımlanan tüm klinik bulguları gözlenebilir. Sığırlar; OvHV-2 için son konakçı olup, sığırdan sığıra nakil bildirilmemektedir. Enfeksiyon bu duyarlı son konakçılarda ölümle sonuçlanır. Sağaltım seçeneği ve korunmada herhangi aşı kullanımı yoktur.



**Şekil 1.** Saha örneklerinde uygulanan seminested PCR testi bulguları. M: 100 bç'lik merdiven,  
1.tur 422 bç'lik amplicon, 2.tur 238 bç'lik amplicon

Bu çalışmada, koyunlarla birlikte tutulan sığırlarda ani ölüm olaylarının şekillenmesi sonrası laboratuvar tanıya başvurulmuş olup, ölen bir sığırın organ örneklerinde OvHV-2'ye spesifik primerler kullanılarak nükleik asit yönünden pozitiflik tespit edilmiştir. İşletmedeki koyunlarda (n=180) herhangi klinik bulgu not edilmezken, ani ölüm görülen 6 sığırdaki ve işletmedeki diğer sığırlarda corneada opaklaşmanın olduğu bir keratokonjunktivitis bildirilmiştir. Tespit edilen klinik bulgular, veteriner klinisyenlere tanıya yön verici olsa da; kesin sonuç laboratuvar tanı ile teyit edilmelidir. Bu çalışma sonucunda; enfeksiyonun yaşandığı işletmeye, koyunlarla sığırların bir arada tutulmaması gerektiği ve klinik bulgu gözlenen veya gözlenmeyen enfekte sığırlarda ani ölümle karşılaşılacağı bildirilmiştir.

## SONUÇ

CGB enfeksiyonundan korunmada alınacak önlemler arasında; koyun ve sığırların aynı ahırda bir arada tutulmaması önem taşımaktadır. Bu bağlamda hayvancılık işletmelerinde tek başına sığır ve tek başına koyun yetiştirilmesi önerilirken, her iki türün birlikte yetiştiriciliğinin yapılması durumunda OvHV-2 enfeksiyonunun naklinden korunmak için, işletmeler arası mesafelerin kilometre düzeyinde tutulması ve ortak personel kullanımından kaçınılması göz ardı edilememesi gereken hususlar arasında yer almaktadır. Böylelikle bu tip viral enfeksiyonlar söz konusu olduğunda, türler arası bulaş riski kontrol altına alınabilir. Ayrıca viral tür çeşitliliği nedeniyle diğer türlerden (keçi, geyik vs.) geçiş olasılıklarının da araştırılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Veteriner Hekim İbrahim Yıldırım'a saha örneklerinin gönderimindeki katkısından dolayı teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Baxter SIF, Pow I, Bridgen A, et al. 1993. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. Arch Virol 132:145-159.
- Bridgen A, Reid HW 1991. Derivation of a DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. Res.Vet. Sci. 50, 38-44.
- Collins JK, Bruns C, Vermedahl TL, Schiebel AL, Jessen MT, Schultheiss PC, Anderson GM, Dinsmore RP, Callan RJ & DeMartini JC 2000. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 12, 406-411.
- Dabak M and Bulut H 2003. Outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in Turkey. Vet. Rec. 152, 240-241.



- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E 2009. The Order Herpesvirales. Arch Virol. 154(1): 171–177.
- Denholm LJ & Westbury HA 1982. Malignant catarrhal fever in farmed Rusa deer (*Cervus timorensis*). I. Clinico-pathological observations. Australian Veterinary Journal 58, 81-87.
- Keel MK, Patterson JG, Noon TH, Bradley GA and Collins, JK 2003. Caprine herpesvirus-2 in association with naturally occurring malignant catarrhal fever in captive sika deer (*Cervus nippon*). J. Vet. Diagn. Invest. 15,179–183.
- Kırbaş A, Oruç E, Ozkanlar E, Sözdutmaz I, Aktaş MS, Sağlam YS 2013. Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever: First report in a Calf in Northeastern Turkey. Israel Journal of Veterinary Medicine, 68 (3): 195-200.
- Li H, Shen DT, O'Toole DT, et al.: 1995, Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 33:2048–2053.
- Li H, Dyer N, Keller J & Crawford TB 2000. Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Journal of Clinical Microbiology 38, 1313-1318.
- Li H, Keller J, Knowles DP & Crawford TB 2001. Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. Journal of General Virology 82, 227-232.
- Plowright W, Ferris RD & Scott GR 1960. Blue wildebeest and the aetiological agent of bovine malignant catarrhal fever. Nature 188, 1167-1169.
- Plowright W 1990. Malignant catarrhal fever virus. In Virus Infections of Ruminants, pp. 123-150. Edited by Z. Dinter & B. Morein. New York: Elsevier.
- Ramachandran, S., Malole, M., Rifuliadi, D. & Safriati, T. 1982. Experimental reproduction of malignant catarrhal fever in Bali cattle (*Bos sondaicus*). Australian Veterinary Journal 58, 169-170.
- Reid HW & Rowe L 1973. The attenuation of a herpesvirus (malignant catarrhal fever virus) isolated from hartebeest (*Alcelaphus buselaphus cokei* Gunther). Research in Veterinary Science 15, 144-146.
- Reid HW, Buxton D, Corrigan W, Hunter AR, McMartin DA & Rushton R 1979. An outbreak of malignant catarrhal fever in red deer (*Cervus elephus*). Veterinary Record 104, 120-123.
- Reid HW, Buxton D, Mckelvey WAC, Milne JA & Appleyard WT 1987. Malignant catarrhal fever in Pe're-Davids deer. Veterinary Record 121, 276-277.
- Reid HW & Bridgen A 1991. Recovery of a herpesvirus from a roan antelope (*Hippotragus equinus*). Veterinary Microbiology 28, 269-278.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T 1989. Molecular Cloning, (Cold Spring Harbor Laboratory, NY)
- Schultheiss PC, Collins JK, Austgen LE & DeMartini JC 1998. Malignant catarrhal fever in bison, acute and chronic cases. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10, 255-262.
- Yazici Z, Arslan HH, Gumusova SO, Meral Y and Albayrak H 2006. Occurrence of ovine herpesvirus type-2 infection in sheep and cattle in Samsun Province, Turkey. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 113, 348-350.

## Synthesis of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocomposites and Supercapacitor Characterizations

O.Yoruk<sup>1,2</sup>, Y. Bayrak<sup>2</sup>, and M. Ates<sup>\*,1</sup>

<sup>\*1</sup> Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Namik Kemal University, 59030, Tekirdag, Turkey

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Trakya University, 22030, Edirne, Turkey

Presenting author: [ozanyoruk@trakya.edu.tr](mailto:ozanyoruk@trakya.edu.tr)

\*Corresponding author : [mates@nku.edu.tr](mailto:mates@nku.edu.tr)

### Abstract

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> is used as a electrode material for supercapacitors due to its relatively low cost, good electrochemical performance, well-defined redox behavior and high theoretical capacitance ( $C_{sp}= 3560$  F/g)(Deng et al., 2009). In this work GO is reduced with microwave-assisted method to form rGO. The obtained rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy-Attenuated transmission reflectance (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive X-ray analysis (EDX), Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area, thermal-gravimetric analysis (TGA-DTA). Supercapacitor device performances were taken by cyclic voltammetry (CV), galvanostatic charge-discharge (GCD), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) as two electrode configuration.

**Keywords:** supercapacitor, nanocomposite, reduced graphene, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

### INTRODUCTION

Supercapacitors are used in energy storage systems with their capability to deliver high specific power, charge/discharge capability, long cycle life in many technological evaluations (Luo et al., 2015). Supercapacitors have a variety of electroactive materials, such as activated carbon, conducting polymes and metal oxides (Kotz and Carlen, 2000; Ingolo et al., 2017).

As a kind of electro active carbonaceous material, reduced graphene oxide(rGO) has been generally researched because of its unique properties. It has good thermal, electrical and mechanical properties, low cost, higher surface area and reasonable chemical stability (Weng at al., 2011).

Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, metal oxide and a significant supercapacitor electrode material, has a lot of advantages such as low cost, well-defined redox behaviour, environmental friendliness an ultra high theoretical capacitance ( $\sim 3560$  F/g<sup>-1</sup>)(Lui at al., 2008). As a result, rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite was synthesized and characterized by SEM-EDX, FTIR-ATR, TGA-DTA, BET surface analysis, CV, GCD, and EIS. Electrochemical measurements were taken by 3 different methods.

### MATERIALS AND METHODS

Graphene oxide (GO) was synthesized from graphite using the modified Hummers method. Graphene-TiO<sub>2</sub> hybrid nanocomposite synthesis was performed by the microwave method (Tran Thi et al., 2017). 90 mg GO and 50 ml de-ionized water were dispersed with sonication for 30 min. And then 40 mg Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles were added GO solution and solution was provided a single dispersion for 30 min. The initial feed ratio of [GO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub> is 2/1. For optimum conditions [GO]<sub>o</sub>/ [Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub> ratio of 1/1; 1/2; 1/5 and 1/10. The solution was adjusted to pH ~ 9 by adding 0.5M NaOH to the brown-black suspension. The mixture put into microwave oven and treated with microwave irradiation power of 180 W for 10 min. At the end of the reaction the color of the solution changed to gray-black, which indicates that GO is reduced. The solution was then filtered and washed several times with de-ionized water. Lastly, the rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite was dried in a vacuum oven at 50 °C for 24 h. The illustration of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite formation was given in **Figure 1**.

## RESULTS and DISCUSSION

**Table 18.** EDX analysis of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>= 1:1; 1:2; 1:5 and 1:10.

Elements	Weight percent of rGO/Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanocomposites			
	[rGO] <sub>o</sub> /[Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sub>o</sub> = 1/1	[rGO] <sub>o</sub> /[Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sub>o</sub> = 1/2	[rGO] <sub>o</sub> /[Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sub>o</sub> = 1/5	[rGO] <sub>o</sub> /[Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sub>o</sub> = 1/10
<b>C</b>	79.65	66.88	49.70	34.02
<b>O</b>	9.59	14.28	18.53	21.37
<b>Co</b>	10.76	18.84	31.77	44.61

**Table 2.** Bet analysis parameters of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>= 1:1; 1:2; 1:5 and 1:10.

BET parameters	[rGO] <sub>o</sub> /[Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sub>o</sub> =			
	1/1	1/2	1/5	1/10
<b>Surface Area/m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup></b>	3.0193	2.4262	1.8403	1.2163
<b>Micropore Area/ m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup></b>	1.3670	1.3995	0.5385	0.5397
<b>P/P<sub>0</sub> of top total pore volume less than bottom/cm<sup>3</sup>g<sup>-1</sup></b>	0.984	0.984	0.984	0.984
<b>Pore volume / cm<sup>3</sup>/g</b>	0.003430	0.002369	0.001665	0.000695
<b>Micropore volume / cm<sup>3</sup>/g</b>	0.000615	0.000632	0.000225	0.000235
<b>Adsorption average pore width 4V/A by BET / nm</b>	4.5436	3.9054	3.61904	2.28710

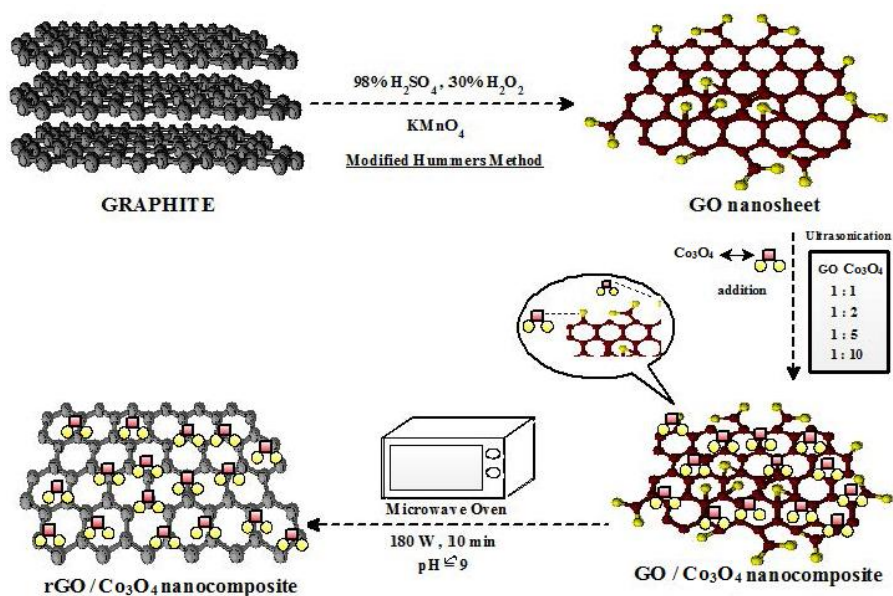


Figure 39. The synthesis procedure of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite.

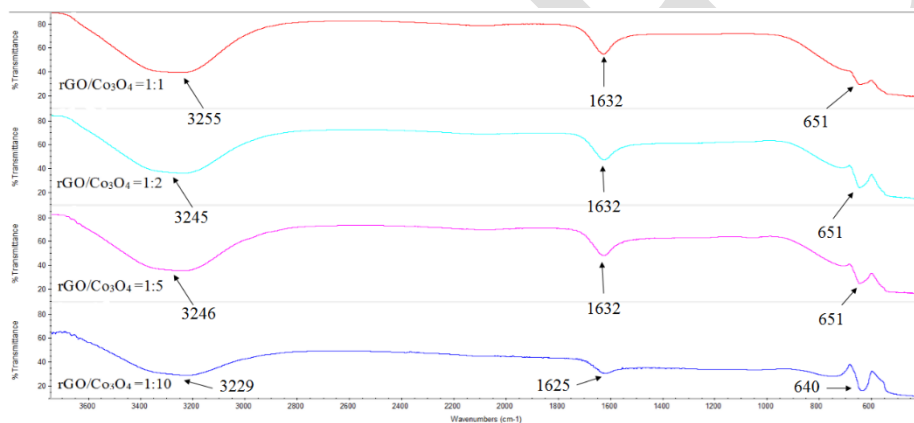
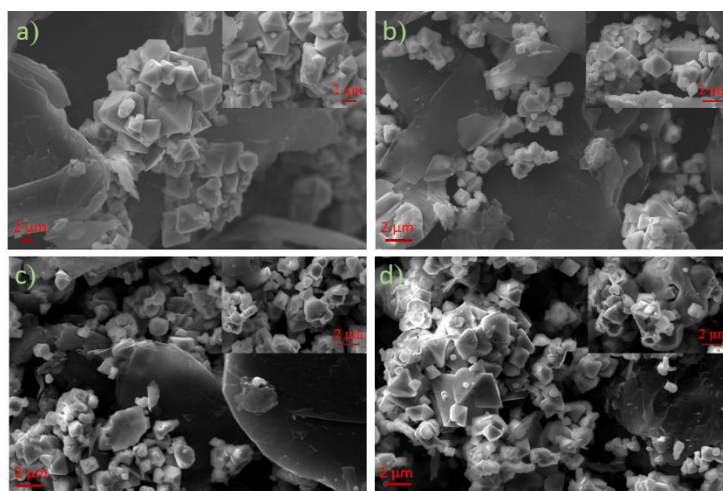
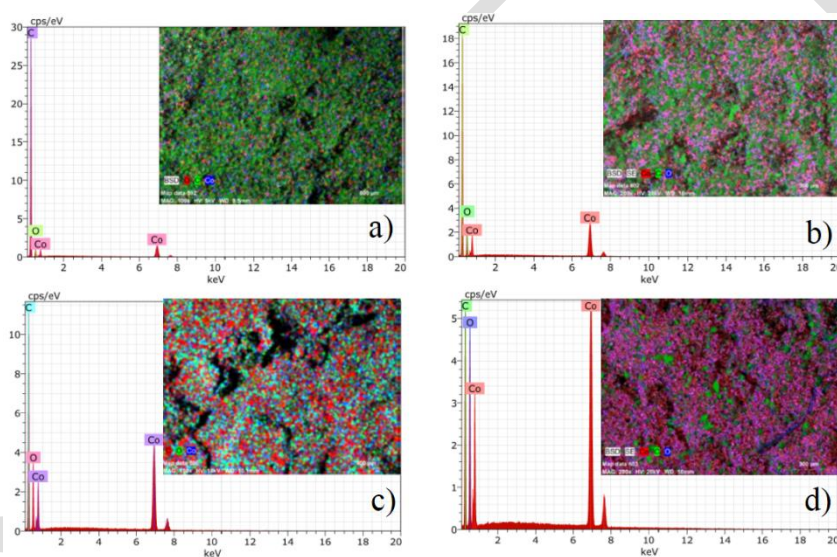


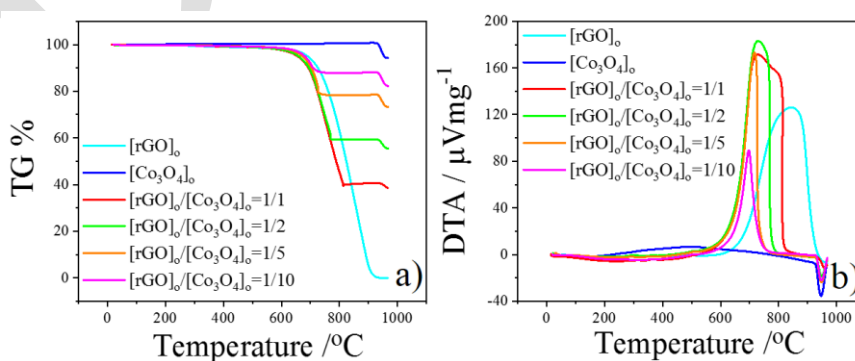
Figure 2. FTIR-ATR images of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratio of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10



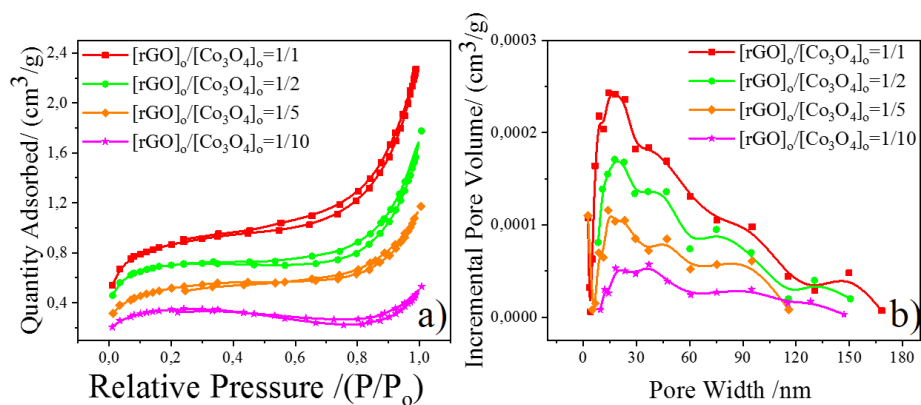
**Figure 3.** SEM images of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratio of a) [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; b)[rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:2; c)[rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:5 d) [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:10.



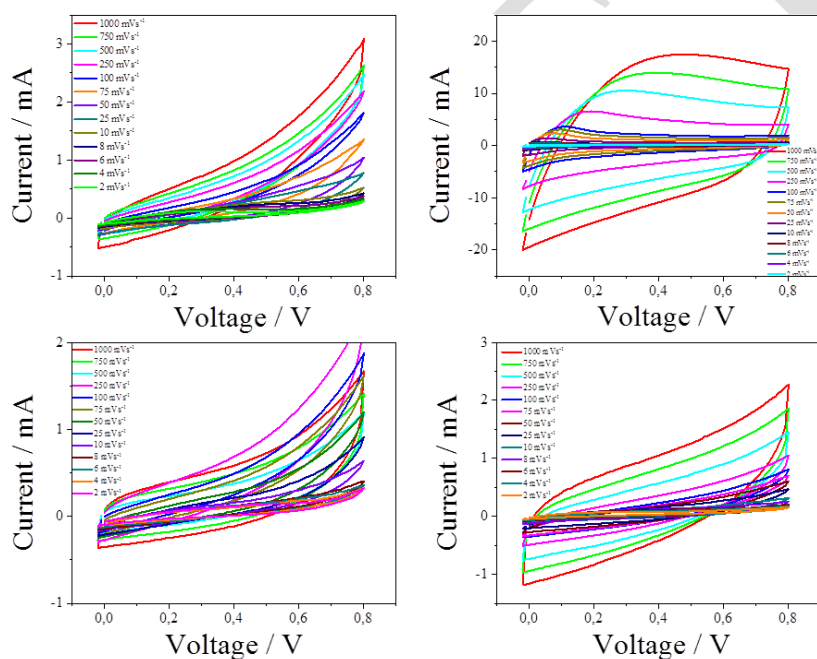
**Figure 4.** EDX analysis of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratio of a) [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; b)[rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:2; c)[rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:5 d) [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:10.



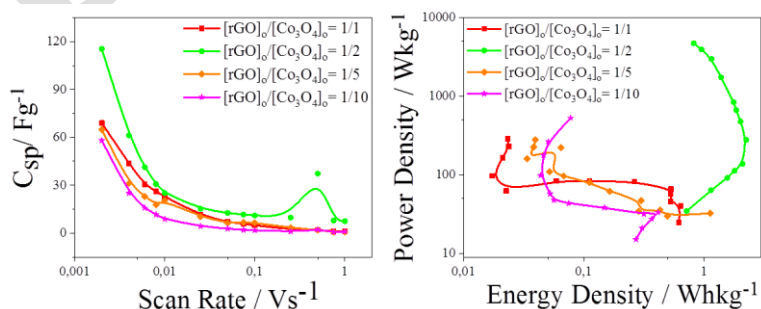
**Figure 5.** TGA-DTA analysis of rGO, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratio of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10.



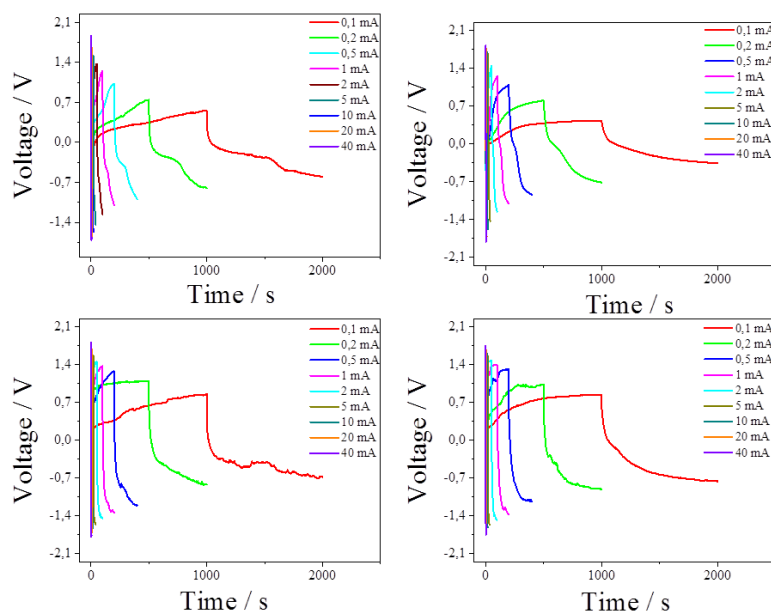
**Figure 6.** BET surface analysis of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratio of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10. **a)** Nitrogen adsorption-desorption isotherms and **b)** Pore size distribution curves of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite.



**Figure 7.** CV plots for of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial fees ratio of **a)** [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; **b)** [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:2; **c)** [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:5 **d)** [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:10.

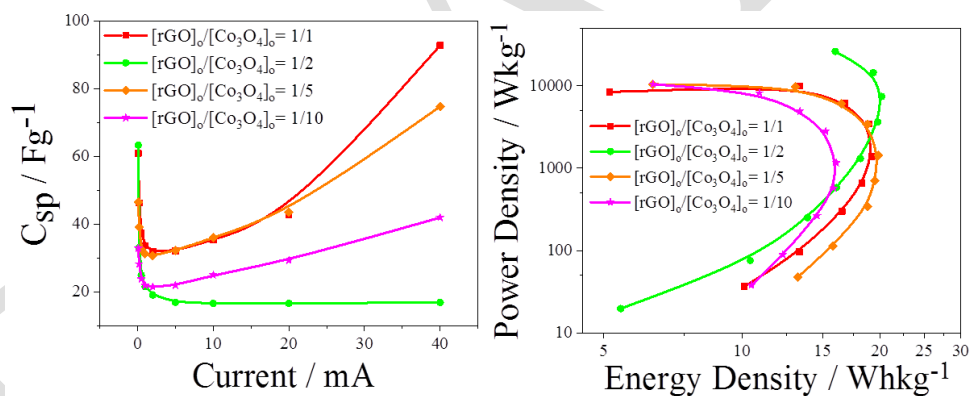


**Figure 8.**  $C_{sp}$  vs. constant current of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial fees ratio of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10. Experiments were performed in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.

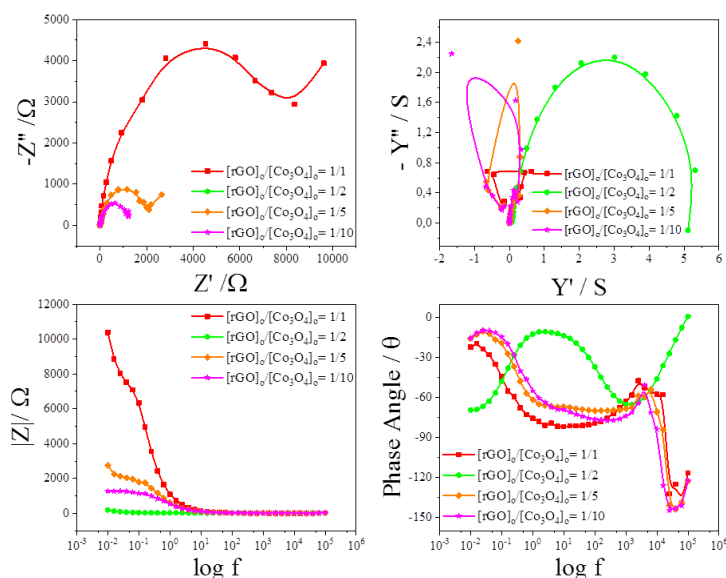


**Figure 9.** GCD measurements of of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial fees ratio of **a)** [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>=1:1; **b)** [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>=1:2; **c)** [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>=1:5 **d)** [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>=1:10.

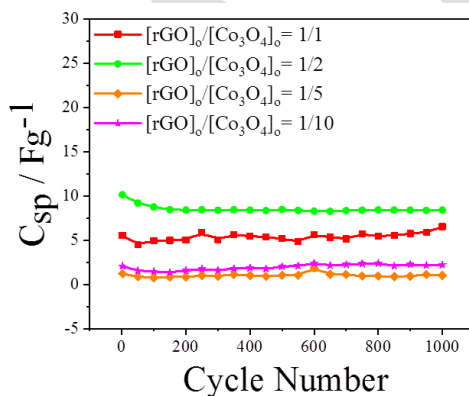
Supercapacitor measurements were taken at a constant current of 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, and 40mA, respectively in two-electrode system.



**Figure 10.** C<sub>sp</sub> vs. constant current of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial fees ratio of [rGO]<sub>o</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>o</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10. Experiments were performed in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution.



**Figure 11.** EIS measurements of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites at different initial feed ratios of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10. **a)** Nyquist plot, **b)** Bode-magnitude plot, **c)** Bode-phase plot, **d)** Admittance plot. Experiments were performed in the frequency between 10 mHz and 100 kHz in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figure 12.** Stability of rGO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite at various initial feed ratios of [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>=1:1; 1:2; 1:5 and 1:10. Measurements were taken as 100 mV/s for 1000 cycles

## CONCLUSION

rGO/ Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite materials were examined by FTIR-ATR, SEM-EDX, TGA-DTA, BET surface, CV, GCD, and EIS methods. The highest specific capacitance was obtained as C<sub>sp</sub>= 115.35 F/g at 2 mV/s for [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>= 1:2. We have obtained the initial capacitance protection as 100%, 82.8%, 82.46%, and 104.3% for [rGO]<sub>0</sub>/[Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>]<sub>0</sub>= 1:1; 1:2; 1:5 and 1:10, respectively. As a result, it may be used as a supercapacitor device.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are acknowledged to The Scientific Research Project Unit (Trakya University, project number: 2018-138) financial support as the source of the study's funding.



## REFERENCES

- Deng MJ, Huang FL, Sun IW, Tsai WT, Jang JK 2009. An entirely electrochemical preparation of a nanostructured cobalt oxide electrode with superior redox activity. *Nanotechnology*, 20:175602-175607
- Tran Thi VH, Lee BK 2017. Great improvement on tetracycline removal using ZnO rod-activated carbon fiber composite prepared with a facile microwave method. *J. Hazard Mater.*, 324: 329-339.
- Kotz K, Carlen M 2000 Chemical synthesis of polythiophene for supercapacitor application, *Electrochim. Acta*, 45: 2483-2486.
- Ingolo SM, Navale ST, Navale YH, Dhole IA, Mane RS, Stadler FJ, Patil VB 2017. Galvanostatically electroplated MnO<sub>2</sub> nanoplate-type electrode for potential electrochemical pseudocapacitor applications, *J. Solid State Electrochem.*, 21: 1817-1826.
- Liu Y, Zhao WW, and Zang XG, 2008. Soft template synthesis of mesoporous Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/RuO<sub>2</sub>.xH<sub>2</sub>O composites for electrochemical capacitors. *Electrochimica Acta*, vol:53, no:8 3296-3304.
- Weng Z, Su Y, Wang DW, Li F, Du JH, Cheng HM, 2011. Graphene-cellulose paper flexible supercapacitors, *Adv. Energy Mater.*, 1:917-922.

## Hayvan beslemede kullanılan aromatik ve terapatik bitkilerin et kalitesi üzerine etkileri

Aydan Atalar<sup>1\*</sup>, Nurcan Çetinkaya<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Çaycuma Gıda ve Tarım MYO, Gıda İşleme, Zonguldak, Türkiye

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: aydan.atalar@beun.edu.tr

### Özet

Hayvancılıkta uygulanan biyolojik yöntemlerin gelişimi ile birlikte yetiştiriciler hayvanlarda çeşitli üretim parametrelerini doğrudan etkileyecek farklı yem katkı maddeleri beklentisi içine girmişlerdir. Aromatik bitkiler son yıllarda potansiyel doğal kaynaklar olup özellikle gıdalarda hem koruyucu olarak hemde hayvansal ürünlerin kalitesini arttırmada kullanılmaktadır. Özellikle etin kalitesi hayvana uygulanan besleme stratejileriyle birlikte artırılabilir. Bu stratejiler arasında etin lipit ve yağ asiti profili ile E vitamini içeriğinin değiştirilmesi sayılabilir. Ayrıca insan sağlığı üzerinde son derece önemli olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve konjuge linoleik asit (CLA) miktarında rasyona yapılan müdahaleler ile artırılabilir. Tıbbi aromatik bitkiler sağlığı iyileştirici etkilerinin yanısıra hayvanların vücudundaki metabolize olup ete geçerek farklı fonksiyonel etkileriyle hayvansal gıdanın besin değerini artırabilirler. Rasyona katılan doğal antioksidanlar ile PUFA ların okside olması önlenir. Et kalitesi üzerinde etkili olabilecek aromatik ve terapatik bitkiler arasında turunçgil özü, keçiyoynuzu, zeytin, susam, üzüm çekirdeği, biberiye ve kekik sayılabilir. Örneğin rasyona ilave edilen keçiyoynuzu meyvesinin etin yağ asiti profilinde olumlu etkilerini olduğu görülmüştür. Turunçgiller yapılarında bulunan biyoaktif bileşenler (polifenoller, terpenler, karotenoidler ve askorbik asit) sayesinde doğal antioksidan özelliğine sahiptirler. Rasyona ilaveleri ile birlikte etlerde lipit peroksidasyonuna karşı direnci artırırlar. Kekik esansiyel yağı, antioksidan ve antimikrobiyal etki gösteren 60'tan fazla bileşen içerir ve hindi, tavuk, domuz ve sığır ve kuzu gibi birçok hayvanda rasyona katılarak başarıyla kullanılmaktadır. Biberiye, içeriğinde bulunan karnosol, rosmanol, epirosmanol, metilkarnosat ve rosmarinik asit gibi fenolik diterpenler ile antioksidan etki gösterir. Sonuç olarak insan beslenmesinde temel protein kaynağı olarak kullanılan hayvansal gıdaların hem kalitesinin artırılmasında hem de raf ömürlerinin uzatılmasında bitkisel ekstraktlardan yararlanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** aromatik bitkiler, terapatik bitkiler, et kalitesi

### Effects of aromatic and therapeutic plants used in animal nutrition on meat quality

Aydan Atalar<sup>1\*</sup>, Nurcan Çetinkaya<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup> Zonguldak Bülent Ecevit University Çaycuma Vocational School of Food and Agriculture, Food Processing, Zonguldak, Turkey

<sup>2</sup> Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Samsun, Turkey

\*Corresponding author e-mail: aydan.atalar@beun.edu.tr

### Abstract

With the development of biological methods applied in animal production, breeders have come to expect different feed additives that will directly affect various production parameters in animals. Aromatic and therapeutic plants are potential natural resources in recent years, especially in foods as a preventative and used to improve the quality of animal products. Especially the quality of meat can be improved with feeding strategies applied to animals. These strategies include changing the lipid and fatty acid profile and vitamin E content of meat. In addition, the amount of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and conjugated linoleic acid (CLA), which are extremely important on human health and they can be increased by diet formulations. Oxidation of PUFAs can be prevented by natural antioxidants supplementation to the diet. Aromatic and therapeutic plants include citrus extract, carob, olive, sesame seeds, grape seeds, rosemary and thyme that can be effective on meat quality. For example, carob fruit added to the diet has positive effects on the fatty acid profile of meat. Citrus fruits have natural antioxidant properties due to their bioactive components (polyphenols, terpenes, carotenoids and ascorbic acid). By the supplementation of them to the diet, they

increase resistance to lipid peroxidation in meats. Oregano essential oil contains more than 60 ingredients with antioxidant and antimicrobial effects and is successfully used in the diets of many animal species such as turkey, chicken, pig and cattle and lamb. Rosemary has antioxidant effect with phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, epirosmanol, methylcarnosate and rosmarinic acid. As a result, plant extracts can be used both in improving the quality of animal foods used as the main source of protein in human nutrition and in extending shelf life.

**Keywords:** aromatic plants, therapeutic plants, meat quality

## GİRİŞ

Son yıllarda artan tüketici bilinci ve insanların daha sağlıklı yaşama isteği gündeme gelmiş buna bağlı olarak ta insanların tercihinin uygun gıda üretimi üzerinde durulmaya başlanmıştır (Tougan ve ark., 2013). Özellikle de kırmızı ve beyaz et gibi hayvansal gıdalar insan sağlığı açısından son derece önemlidirler. Hayvancılıkta uygulanan biyolojik yöntemlerin gelişimi de dikkate alındığında hayvanlarda çeşitli üretim parametrelerini doğrudan etkileyecek farklı yem katkı maddeleri karşımıza çıkmaktadır. Rasyona katılabilecek doğal yem katkı maddeleri arasında probiyotik ve prebiyotikler, enzimler, organik asitler ile aromatik ve terapatik bitkiler sayılabilir (Wood ve ark., 2003). Ayrıca uygulanan hayvan besleme stratejileri ile birlikte rasyona ilave edilen antioksidanlarla ette oksidatif stabilite sağlanarak raf ömrü uzatılabilir. Bunun yanında etteki çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği artırılarak etin kalitesi artırılabilir. Ette PUFA'nın artması ile birlikte kalp ve kardiyovasküler hastalıklarda azalma görülür. Aromatik ve terapatik bitkiler sağlığı iyileştirici etkilerinin yanı sıra hayvanların vücudundaki metabolize olup ete geçerek farklı fonksiyonel etkileriyle hayvansal gıdanın besin değerini artırabilirler. Et kalitesi üzerinde etkili olabilecek aromatik ve terapatik bitkiler arasında turuncgil özü, keçiyoynuzu, zeytin, susam, üzüm çekirdeği, biberiye ve kekik sayılabilir. Aromatik ve terapatik bitkiler içerdikleri biyoaktif bileşenler ile etkilerini gösterirler. Sonuç olarak insan beslenmesinde temel protein kaynağı olarak kullanılan hayvansal gıdaların hem kalitesinin artırılmasında hem de raf ömürlerinin uzatılmasında bitkisel ekstraktlardan yararlanılabilir.

## Fonksiyonel et üretimi

Et ve et ürünleri dengeli bir diyet için zorunludur, ancak aynı zamanda bu ürünlerin daha "sağlıklı" bir görünüm ve içeriğe getirilmelerinde de çeşitli stratejilerin uygulanabileceği unutulmamalıdır. Hayvan beslemede kullanılan rasyona yapılan müdahaleler ile ete fonksiyonel özellik kazandırılarak istenilen hedefe ulaşmak söz konusudur. Fonksiyonel et üretimi için hayvan besleme stratejileri arasında rasyonun lipit, yağ asiti ve E vitamini içeriğinde değişimler yapılabilir (Jiménez ve ark., 2001). Rasyona ilave edilen yem katkı maddeleri arasında doğal antioksidanlar, konjuge linoleik asit, omega-3 yağ asitleri, vitamin E, selenyum, çeşitli meyveler ve posaları ile aromatik ve terapatik bitkiler sayılabilir.

## Doğal antioksidanlar

Taze et, çoğunlukla işlenmemiş ve paketli olarak buzdolabında saklanır. Gıda sektöründe pazarlamanın ana kaygılarından birisi de paketlenmiş taze ürünlerin kısa raf ömrüdür. Etin lipit bileşimi, eti oksidatif değişikliklere karşı duyarlı hale getirir (Jeremiah, 2001). Et ürünlerinin kalite özellikleri, işleme ve depolama sırasında lipit oksidasyonu nedeniyle bozulur. Lipit oksidasyonu ile birlikte oksidasyon ürünleri (kısa zincirli aldehitler ve ketonlar) ortaya çıkarak ürün kalitesinde istenmeyen etkilere sebep olur ve ekonomik kayıp olarak karşımıza çıkar. Sentetik antioksidanlara alternatif olarak rasyona çeşitli bitkilerden elde edilen doğal üzüm, zeytin, susam, çay, soya fasulyesi, biberiye, kekik vb. eklenebilir. Bu doğal antioksidanlar etin oksidatif stabilitesini artırarak raf ömrünü uzatırlar (Tang ve ark., 2001). Doğal antioksidan olarak kullanılan aromatik ve terapatik bitkilerin antioksidatif etkileri içerdikleri fenolik bileşiklerden gelir (Inserra ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada broyler rasyonlarına biberiye, yeşil çay, domates ekstraktı ve üzüm çekirdeği eklenmiş ve göğüs eti üzerine yağ oksidasyon seviyesine bakılmış sentetik antioksidanların raf ömrünü uzatmada daha etkili olduğu gözlenmiştir (Smet ve ark., 2008).

## Konjuge linoleik asit (CLA)

Konjuge linoleik aside (CLA) olan ilgi, son on yılda insan sağlığı üzerine sağladığı faydalar ve hayvansal üretim üzerindeki potansiyel etkileri ile et kalitesini iyileştirmesinden dolayı artmıştır. Konjuge linoleik asitin lipit metabolizmasına etkilerini belirlemek amacıyla birçok hayvan modelinde çalışmalar yapılmış ve trans-10, cis-12'nin adipoz dokunun birikmesini önlediği görülmüştür. Fare modelinde, CLA'nın metabolik hızı ve yağ asidi oksidasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Wahle ve ark., 2004). Yapılan diğer çalışmalarda da rasyonla tüketilen CLA'nın tavuğun kas ve yağ dokularında CLA konsantrasyonunu artırabileceğini göstermiş

ve üretilen kanatlı etinin bu yolla daha değerli ve kaliteli bir ürün olabileceği ortaya konmuştur (Du ve Ahn, 2002).

### **Selenyum**

Birçok ülkede, beslenmede selenyum tüketimi eksikliği görülmektedir. Selenyum tüketimini iyileştirmek amacı ile yapılan çalışmalara bakıldığında selenyum yönünden zengin gıdaların üretimi karşımıza çıkmaktadır. Rasyona ilave edilen Selenyum ile hayvansal kökenli gıdalar olan yumurta, süt ve ette selenyum düzeyi artırılarak sayılan gıdalara fonksiyonellik kazandırılabilir. Selenyumun özellikle insan sağlığında önemli bir iz element olduğu ve özellikle kanser mortalitesini iki kata kadar azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Clark ve ark., 1996).

### **Omega-3 yağ asitleri**

İnsan sağlığı açısından son derece önemli olan Omega-3 yağ asitleri (PUFA) tüketimi, kardiyovasküler hastalık riskini azaltır (Temple, 1996). Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), hayvanın gelişmesi ve büyümesi için temel bileşendir. Bu grubun bileşenlerinde dokosaheksaenoik asit (DHA, 22: 6), dokosapentaenoik asit (DPA, 22: 5) ve eikosapentaenoik asit (EPA, 20: 5) vardır. n-3 doymamış yağ asitlerinin günlük tüketimi hayvansal gıdaların doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesi ile artırılabilir. Bunun için de rasyona keten tohumu, chia ve bunların yağları eklenebilir (Ayerza ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada zeytinyağı, ayçiçek yağı ve keten tohumu yağının broiler rasyonlarına eklenmesi ile kesim sonrası tavuk etlerinin yüksek oranda omega-3 içerdiği görülmüştür (Crespo ve ark., 2002).

### **Aromatik ve terapatik bitkiler**

Koku ve tat özellikleri olan, ayrıca tedavi özelliklerinden dolayı ilaç olarak kullanılan bitkilere aromatik ve terapatik bitkiler denilmektedir. Yapılarında flavonoid, alkaloid, tannin, bereberin ve kinin gibi aktif bileşenler bulunur. Ayrıca yapılarında bulunan uçucu yağlar (esansiyel yağlar) ile antimikrobiyal, sedatif, diüretik, antiseptik ve sindirim uyarıcı gibi etkiler oluştururlar. Et kalitesi üzerinde etkili olabilecek aromatik ve terapatik bitkiler arasında turuncgil özü, keçiyoynuzu, zeytin, susam, üzüm çekirdeği, biberiye ve kekik sayılabilir. Yapılan bir çalışmada kuzu rasyonlarına eklenen keçiyoynuzu posasının kesim sonrası kuzu etlerinde yağ asitlerinin modifikasyonu ve oksidatif stabilizasyon üzerine olumlu etki gösterdiği görülmüştür (Gravador ve ark., 2015). Turuncgiller yapılarında bulunan biyoaktif bileşenler (polifenoller, terpenler, karotenoidler ve askorbik asit) sayesinde doğal antioksidan özelliğine sahiptirler. Rasyona ilaveleri ile birlikte etlerde lipit peroksidasyonuna karşı direnci artırır (Gladine ve ark., 2007). Ayrıca rasyona algler de eklenebilir. Algler, DHA (Dokosaheksaenoik Asit)'nin orijinal kaynaklarıdır. Birçok çalışma tavuk etinde DHA içeriğini artırmak için ruminant rasyonlarına alg ilavesinin alternatif yem katkı maddesi olarak katılabileceğini göstermektedir (Abril ve ark., 2003). Kekik esansiyel yağı, antioksidan ve antimikrobiyal etki gösteren 60'tan fazla bileşen içerir ve hindi, tavuk, domuz ve sığır ve kuzu gibi birçok hayvanda rasyona katılarak başarıyla kullanılmaktadır. Biberiye, içeriğinde bulunan karnosol, rosmanol, epirosmanol, metilkarnosol ve rosmarinik asit gibi fenolik diterpenler ile antioksidan etki gösterir (Janz ve ark., 2007).

### **SONUÇ**

Sonuç olarak insan beslenmesinde temel protein kaynağı olarak kullanılan hayvansal gıdaların hem kalitesinin artırılmasında hem de raf ömürlerinin uzatılmasında aromatik ve terapatik bitkilerin ekstraktlardan yararlanılabilir.

### **KAYNAKLAR**

Abril, R., Garret, J., Zeller, SG., Sande, WJ., Mast, RW. 2003. Safety assessment of DHARich microalgae from Schizochytrium sp.: Part V. Target animal safety/toxicity in growing swine. Regul Toxicol Pharmacol. 37,73-82.

Ayerza, R., Coates, W., Lauria, M. 2002. Chia seed (Salvia hispanica L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: Influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. Poultry Science 81(6), 826–837.

Clark, LC., Combs, GF. Jr, Turnbull, BW., Slate, EH., Chalker, DK., Chow, J., Davis, LS., Glover, RA., Graham, GF., Gross, EG, Krongrad, A., Leshner, JL. Jr, Park, HK., Sanders, BB. Jr, Smith, CL., Taylor, JR. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J Am Med Assoc.* 276, 1957–1963.

Crespo, N., Esteve-García, E. 2002. Nutrient and fatty acid deposition in broilers fed different dietary fatty acid profiles. *Poultry Science.* 81, 1533–1542.

Du, M., Ahn, DU. 2002. Effect of dietary conjugated linoleic acid on the growth rate of live birds and on the abdominal fat content and quality of broiler meat. *Poultry Sci.* 81, 428–433.

Gladine, C., Rock, E., Morand, C., Bauchart, D., Durand, D. 2007. Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *Br J Nutr.* 98, 691–701.

Gravador, RS., Luciano, G., Jongberg, S., Bognanno, M., Scerra, M., Andersen, ML., Marianne, N., Lund, MN., Priolo, A. 2015. Fatty acids and oxidative stability of meat from lambs fed carob-containing diets. *Food Chem.* 182(1), 27–34.

Insera, L., Priolo, A., Biondi, L., Lanza, M., Bognanno, M., Gravador, RS., Luciano, G. 2014. Dietary citrus pulp reduces lipid oxidation in lamb meat. *Meat Science.* 96(4), 1489–1493.

Janz, JAM., Morel, PCH., Wilkinson, BHP., Purchas, RH. 2007. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science.* 75, 360–365.

Jeremiah, LE. 2001. Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. *Food Res Int.* 34, 749–772.

Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. 2001. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci.* 59, 5–13.

Tougan PU, Dahouda M, Salifou CF, Ahounou SG, Kpodekon MT, Mensah GA, et al. 2013 Conversion of chicken muscle to meat and factors affecting chicken meat quality. *International Journal Agronomy Agricultural Research* ;3(8):1-20.

Smet K, Raes K, Huyghebaert G, Haak L, Arnouts S, Smet SD. 2008 Lipid and protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. *Poultry Science*;87:1682-8.

Tang, S., Kerry, JP., Sheehan, D., Joe Bukley, D., Morrissey, PA. (2001). Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Res Int.* 34, 651–7.

Temple, NJ. (1996). Dietary fats and coronary heart disease. *Biomed Pharmacother.* 50(6–7), 261–268.

Wahle, KWJ., Stevens, SD., Rotondo, D. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog Lipid Res.* 43, 553–87.

Wood, JD., Richardson, RI., Nute, GR., Fisher, AV., Campo, MM., Kasapidou, E., Sheard, PR., Enser, M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci.* 66, 21–32.

## Kongenital anomalili yavru doğumu görülen bir koyunculuk işletmesinde viral enfeksiyonların varlığının araştırılması

Tuba Çiğdem Oğuzoğlu

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: oguzoglu@ankara.edu.tr

### Özet

Hayvancılık işletmelerinde döl verimliliği esas olup, sağlıklı yavru alımı ile sürdürülebilir. Bu bağlamda; yaşama gücü zayıf kongenital anomalili yavru doğumları döl verimliliği üzerinde negatif yönde etkili olgulardır. Bu çalışmada halk elindeki bir koyunculuk işletmesinde abortlar, kongenital anomalili ve yaşama gücü zayıf yavru doğumları gözlenmiş, laboratuvar tanıya başvurulmuştur. Anomalili yavruardan alınan kan örnekleri (n=5), Pestivirus, Mavidil, Akabane ve Ainoviruslar yönünden moleküler metotlar kullanılarak tetkik edilmiş olup, Akabane virus nükleik asiti yönünden pozitiflik tespit edilmiştir.

Akabane virus, *Bunyaviridae* ailesinden sokucu sineklerle nakledilen vektörlü bir hastalık olup, ruminant türlerini enfekte etmekte ve ülkemizdeki duyarlı ruminant sürüleri için periyodik olarak salgınlar meydana getirmektedir. Özellikle seronegatif gebe hayvanlar, transplental olarak virüsü fütusa geçirmekte ve fötusun yaşına bağlı olarak yavru ölmeden ya da aborte olmadan doğabiliyorsa, çeşitli anomali olguları ile karşılaşmaktadır. Vektörlü hastalıklar, küçükbaş ve büyükbaş hayvancılık işletmelerinde kontrol altına alınabilmesi zor enfeksiyonlardan olup, mücadelede aşı önem arz etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, kongenital anomalili, Akabane virus, tanı

### Investigation of the presence of viral infections in a sheep flock with congenital anomalies

#### Abstract

In animal husbandry enterprises, reproductive fertility is essential and can be sustained by healthy fry intake. In this context; lamb/calf births with poor congenital anomalies with poor survival rates are negatively influential on reproductive fertility. In this study, abortions, congenital anomalies and poorly live infant births were observed in a sheep farm in the hands of people and laboratory diagnosis was applied. Blood samples taken from the anomalous offspring (n = 5) were examined by using molecular methods for Pestivirus, Mavidil, Akabane and Ainoviruses and positive for Akabane virus nucleic acid.

Akabane virus is a vector disease that is transmitted by inserting flies from the *Bunyaviridae* family, infecting ruminant species and periodically produces outbreaks for sensitive ruminant flocks in our country. In particular, seronegative pregnant animals pass the virus into fetus as a transplental and, depending on the age of the fetus, various anomaly cases are encountered if the offspring can be born without dying or aborted. Vector diseases are difficult to control in cattle and cattle farms and the vaccine is important in the struggle programme.

**Keywords:** Sheep, congenital anomalie, Akabane virus, diagnosis.

### GİRİŞ

Ruminantlarda kongenital anomalili yavru doğumlarına sebep olan viral ajanlar arasında pestiviruslar, blue-tongue (Mavi Dil), Akabane virus enfeksiyonları yer almaktadır. Özellikle gebelikte fötusun yaşı ve gebeliğin dönemine göre, anede meydana gelen enfeksiyonun transplental olarak yavruya aktarımı sonucunda oluşan klinik bulgular çeşitlilik göstermektedir. Kör yavru doğumları, doğmasal damak yarıklığı, arthrogyryposa ve/veya hydranencephalie sendromlu (AH sendromlu) veya yaşama gücü zayıf yavru doğumları tanımlanmış kongenital anomaliler arasında sıklıkla görülenleridir. Çoğunlukla etkilenen yeni doğanlar ilk yaşam haftasında ölmektedir.

Bu çalışmada, kongenital anomalili kuzu doğumlarının gözlendiği bir işletmeden gelen kan örneklerinde Pestivirus, Blue tongue virus, Akabane ve Aino virusların varlığı araştırılmış olup, test edilen örneklerde Akabane virus nükleik asiti tespit edilmiş, diğer enfeksiyonlar yönünden herhangi pozitiflik belirlenmemiştir. Akabane virus, *Bunyaviridae* ailesinin *Orthobunyavirus* genusunda yer alan viruslarca meydana getirilen, esas konakçılarının büyük ve küçük ruminantlar olduğu, *Culicoides* cinsi sokucu sineklerle bulaşan vektörlü

hastalık ajanıdır (ICTV, 2017). Bu anlamda arthropod-borne (arbo) viruslar arasında sayılmaktadır (OIE, 2015). Coğrafik dağılımına bakıldığında ülkemizin de bazı bölgeleriyle içinde bulunduğu tropik ve subtropik iklim kuşağındaki ülkelerde enfeksiyonun varlığı bildirilmiştir (Taylor ve Mellor, 1994; Oğuzoğlu ve ark., 2015; Şevik 2017; Akabane Disease, 2018).

## **MATERYAL VE METOT**

Çalışmada, gönderilen 5 adet kongenital anomalili yavruya ait EDTA'lı kan örneği kullanılmıştır. Kuzularda klinik bulgu olarak ayağa kalkamama, üst solunum yolu enfeksiyonu bulguları, öksürük, diarreoe bildirilmiştir. İşletmede toplam 37 yavrunun ya ölü doğduğu ya da doğduktan sonra öldüğü hayvan sahibi tarafından belirtilmiştir.

Gönderilen EDTA'lı tam kan örnekleri, +4 °C'de 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra ortadaki lökosit tabakasından 400 mikrolitre (µl) 2ml'lik eppendorf tüpe alınarak; Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform ekstraksiyonu (Chomczynski ve Sacchi, 1987) ile viral nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Viral RNA, spektrofotometrik olarak ölçülmüş, 50 ng/ml üzerinde olarak tespit edilmiş ve komplementer DNA sentezi için reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) metodu kullanılarak amplifiye edilmek üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Pestivirüsler için Vilcek ve ark.'nın (1994) bildirdiği primerler, Blue tongue virus için Breard ve ark. (2003)'nin bildirdiği primerler, Akabane ve Aino virüsler için nested-RT-PCR'da Akashi ve ark.'nın (1999) bildirdiği primerler kullanılmıştır.

Akabane virüsün S segmentini çoğaltan nested RT-PCR'da birinci turda 721 baz çiftlik (bç), ikinci turda 230 bç'lik ampikon verdikleri bilinmektedir. Elde edilen ürünlerin PCR sonrası görüntülenmesi; %1'lik agaroz jelde uv transluminatörde (Kodak) yapılmıştır.

## **BULGULAR**

AH sendromlu 5 kuzudan alınan kan örneklerinin 3 adedi Akabane virüs spesifik primerler kullanılarak yapılan nested RT-PCR'da pozitif bulunmuştur. Negatif kontrol olarak deionize moleküler su kullanılmıştır. Şekil 1'de jel görüntüsü bulunmaktadır.

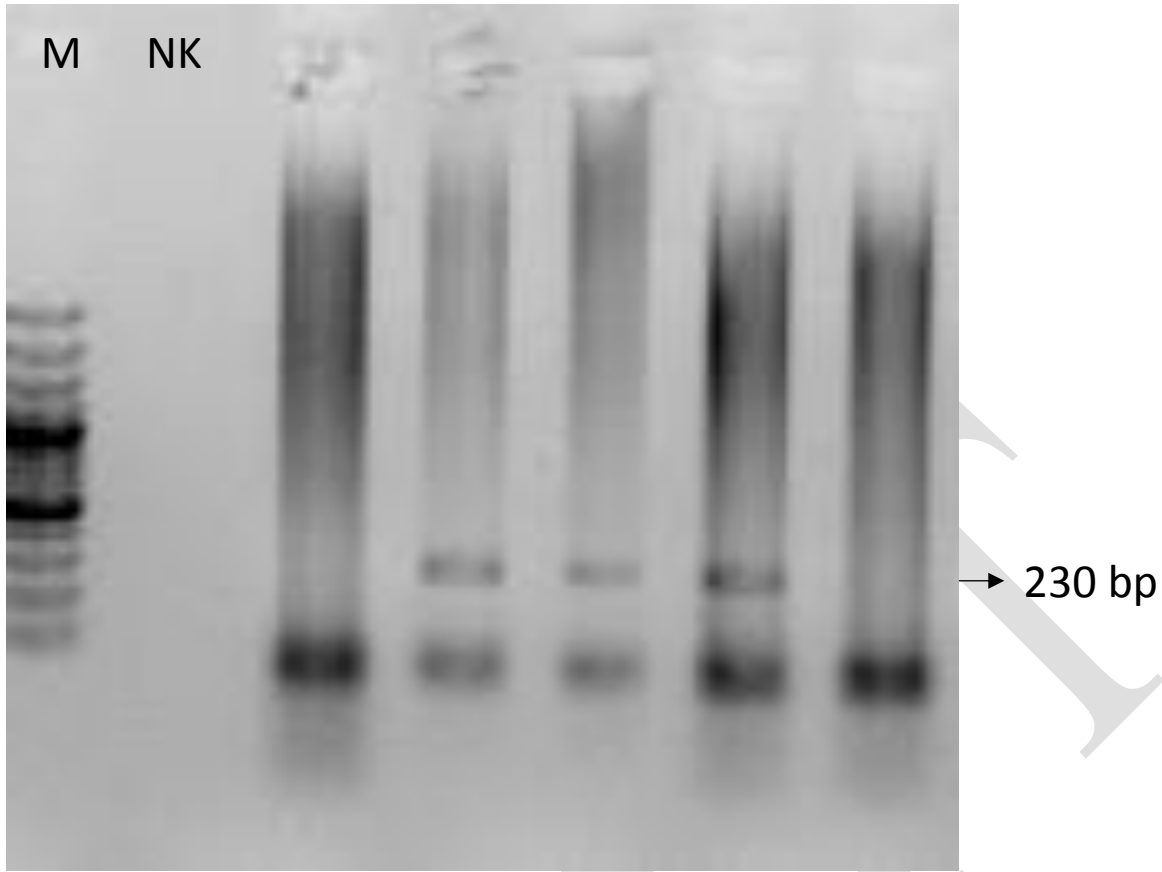
## **TARTIŞMA**

Akabane virüs, ülkemizdeki ruminant sürülerinde periyodik salgınlarla ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda; kongenital anomalili yavru doğumlarında oluşturulacak tanısal panellerde mutlaka yer verilmesi gereken enfeksiyöz ajanlardandır. Bu enfeksiyonun varlığı ve yaygınlığı hakkında bilgilerin güncellenmesi ve epidemiyolojik taramaların moleküler düzeyde yapılması, hastalıkla ilgili ileride geliştirilecek mücadele programlarının temel verilerini sağlaması açısından önem arz etmektedir. Moleküler düzeyde farklı genogruplardan Akabane virüsler ülkemizde sirküle olsa da, korunma için geneli temsilen seçilecek uygun aşı virüsleri ile hastalıkla etkin mücadelenin yapılabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Pozitiflik tespit edilen bu işletmeye, koç katımı tarihinden önce damızlık erkek hayvanlarını antijenik yönden test ettirmesi ve negatif olanların damızlık olarak kullanılması önerilmiştir.

## **SONUÇ**

Kongenital anomalili yavru doğumları, gerek hayvan sağlığı ve döl verimliliği ve gerekse ekonomik kayıplar nedeniyle hayvancılık sektörünü direkt etkileyen unsurlar arasındadır. Vektörlü hastalıklardan olan Akabane virüs için inaktif virüs aşısı üretimi adımlarının atılabilmesi, sahada sirküle olan enfeksiyonlardan virüs izolatlarının kazanımı ile söz konusu olabilecektir.



**Şekil 1.** Saha örneklerinde uygulanan nested RT-PCR testi bulguları. M: 100 bç'lik merdiven, Toplam 3 örnekte 2.tur 230 bç'lik amplikonlar

#### **KAYNAKLAR**

- Akabane Diseases 2018. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>
- Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T 1999. Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction. *Arch Virol* 144(11):2101–2109
- Breard E, Sailleau C, Coupier H, Mure-Ravaud K, Hammoumi S, Gicquel B, Hamblin C, Dubourget P, Zientara S 2003. Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet Res* 34(6):777–789
- Chomczynski P ve Sacchi N 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem*, Apr;162(1):156-159.
- International Committee on Taxonomy of Viruses Universal Virus Database [ICTVdB] Management [online]. Virus taxonomy: 2014 release EC 46, Kingston and Montreal, Canada, July 2014, Email ratification 2015 (MSL #29). Akabane virus. Available at: <http://www.ictvdb.org/virusTaxonomy.asp>
- Oguzoglu TC, Toplu N, Koç BT, Doğan F, Epikmen ET, İpek E, Akkoç AN 2015. First molecular detection and characterization of Akabane virus in small ruminants in Turkey. *Arch Virol*, 160:2623–2627
- OIE Terrestrial Animal Health Code <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrialcode/access-online/>
- Şevik M 2017. Molecular detection and genetic analysis of Akabane virus genogroup Ib in small ruminants in Turkey. *Arch Virol*, 162:2769–2774.
- Taylor WP, Mellor PS 1994. The distribution of Akabane virus in the Middle East. *Epidemiol Infect* 113(1):175–185
- Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least 3 genogroups using polymerase chain-reaction and restriction-endonuclease analysis. *Arch Virol* 136(3–4):309–323



## Grafted Thermosensitive Gelatin Scaffold as Drug Delivery System

Serap Durkut

Tissue Engineering, Biomaterials and Nanobiotechnology Laboratory,  
Ankara University Faculty of Science, Ankara, Turkey

\*Corresponding author e-mail: durkut@science.ankara.edu.tr

### Abstract

Gelatin-based hydrogels have been extensively used in pharmaceutical and medical applications in respect to their biocompatibility, non-toxicity, biodegradability, and being an economic, readily available material. Gelatin is obtained by the hydrolytic degradation of natural collagen, which possesses RGD sequences promoting cell recognition. The mechanical and chemical properties of gelatin can be easily modified via its functional side groups (e.g., -COOH, -NH<sub>2</sub>), in order to fabricate gelatin-based scaffolds for tissue engineering and regeneration medicine applications.

Poly(N-vinylcaprolactam) (PNVCL) based studies have attracted interest due to its versatile characteristics such as biocompatibility, solubility, and thermosensitivity. The lower critical solution temperature (LCST) of PNVCL is very close to body temperature.

In this study, gelatin (GL) was conjugated with thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam) using the strong covalent amide bonds by a cross-linking agent pair (EDC/NHS). Thermosensitive gelatin-based hybrid (GL-g-PNVCL) hydrogel and the formed scaffold was investigated in terms of structural characteristics and drug delivery properties. Phase transition temperature of the conjugate was determined by measuring the optical transmittance at a wavelength of 480 nm over the temperature range of 25-40 °C. Water uptake and model drugs (lidocaine and bovine serum albumin, BSA) release properties of thermosensitive GL-g-PNVCL scaffolds were determined depending on different temperatures (25°C and 40°C).

The LCST of GL-g-PNVCL solution (10% w/v in distilled water) was determined as 38°C which is a suitable value for a number of biomedical applications. ATR-FTIR and <sup>1</sup>HNMR analysis proved successful graft polymerization of gelatin with PNVCL. The water uptake and drug release from GL-g-PNVCL scaffolds exhibited differences depending on temperature. The thermosensitive gelatin-based hydrogel underwent a reversible structural transition from transparent gel to an opaque gel by an increase in temperature. Studies exhibited that the copolymerization of gelatin with PNVCL introduced a new property to the gelatin hydrogel while retaining its temperature sensitivity.

**Keywords:** Thermosensitivity, poly(N-vinylcaprolactam), gelatin, biopolymer, drug delivery

### INTRODUCTION

Hydrogels are polymeric materials extensively swollen with water or physiological fluids and are composed of three-dimensional insoluble networks (Buwalda et al. 2014). They resemble body tissues due to their high water content. Gelatin is one of the very attractive polymers for preparing hydrogels. Gelatin is a water-soluble natural protein produced by acidic or basic hydrolysis of insoluble collagen which is a fibrous protein located in the connective tissues. Gelatin is a relatively “safe” hydrogel which is approved by the US FDA (Elzoghby et al. 2012). Gelatin is widely used in the biomedical application (tissue engineering, wound dressing, gene therapy, and drug delivery, etc.) due to its various desirable features such as biocompatibility, biodegradability, low antigenicity, low cost and gelling properties (Jiang et al. 2014, Su and Wang 2015). Gelatin can absorb water and forms a physical hydrogel that is stable at low temperature (about 20–30 °C) above a certain concentration (around 2% w/v). Gelatin undergoes a first-order thermo-reversible gelation transition and forms a conformational change from a random coil (sol) to a triple helix (gel) and stabilizes through intermolecular hydrogen bonding between gelatin chains at low temperatures (Chang et al. 2009). Moreover, increasing interest in the use of gelatin stem arises from its the peptide sequences responsible for the recognition of integrin receptors in the cells (Wang et al. 2012).

However, gelatin has poor mechanical properties due to weak non-covalent interactions (van der Waals forces, hydrogen bonds, and electrostatic and hydrophobic interactions) and low thermal stability which limits its wider possible applications. Some strategies including chemical modification and physical blending have been

adopted to tune the gelling condition of gelatin or decrease its solubility and degradation rate in aqueous solutions (Ayre et al. 2014). Generally, gelatin-based hydrogels are formed by different cross-linking agents (such as, formaldehyde, glutaraldehyde, genipin or carbodiimide) to increase the stability and mechanical properties (Ofner 1996, Nickerson 2006, Lien 2009).

Gelatin-based stable hydrogels are also fabricated with natural or synthetic polymers via copolymerization methods at mild conditions (room temperature, neutral pH, in aqueous environments). Copolymerization of gelatin with other polymers provides further properties such as prolonged degradation time, enhanced water-resistance and sensitivity (pH, temperature, etc.) depending on the chemical character of the polymers. Gelatin is blended or conjugated with natural polymers such as alginate, chitosan, hyaluronan, fibrinogen, etc. or their combination with alginate/fibrinogen, and alginate/fibrinogen/hyaluronan and examined in clinical applications (Tseng et al. 2013, Luo et al 2015). On the other hand, when compared with natural polymers, synthetic polymers have some advantages such as controllable degradation rate and high mechanical strength. However, they generally lack biological cues to bind the cells and proteins (Toh and Loh 2015). Therefore, gelatin-based stable hybrid hydrogels that combine the benefits of natural and synthetic polymers have attracted significant attention in biological and biomedical applications.

In recent years, intelligent or smart hydrogels have become attractive materials especially for drug release systems because of their ability to rapidly and reversibly respond to environmental stimuli (pH, temperature and magnetic etc.). Temperature is the most widely utilized signal in drug release systems due to generally elevation of body temperature above the normal level (37°C) with fever or other pathological diseases. Grafted thermoresponsive gelatin microspheres were prepared with poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm) by chemical conjugation and exhibited phase transition at below the body temperature (Curcio 2010). In another study, a hybrid hydrogel based on pNIPAAm and gelatin was synthesized using a two-step crosslinking process with genipin or glutaraldehyde and the effect of gelatin on the release profile of drugs was evaluated (Lee and Lee 2007). Although PNIPAAm is the most studied thermosensitive polymer, usage of PNIPAAm in drug release or tissue engineering is limited due to its amide moieties released with degradation, increasing toxicity (Prabaharan et al. 2008).

Alternatively, the poly (N-vinyl caprolactam) (PNVCL) is another known thermosensitive synthetic polymer due to its unique characteristics such as nontoxicity, biocompatibility, and solubility in both water and organic solvents. PNVCL has a lower critical solution temperature (LCST) around 32-34°C close to physiological temperature and undergoes a phase separation at around 37°C. The use of PNVCL in drug delivery and other biomedical applications has increased in the last decades because PNVCL shows reversible swelling/collapsing behavior depending on external temperature. Below the LCST, hydrophilic forces are dominant and hydrogel swells, however, above the LCST, the polymers collapse since the intra- and intermolecular attraction between the hydrophobic groups become dominant and water molecules around polymer are released (Cortez-Lemus and Licea-Claverie 2016). Previously, PNVCL was grafted onto both carbohydrate-based natural polymers (chitosan, alginate, or dextrans) and synthetic polymers (methacrylic acid, undecenoic acid, etc.) to produce scaffolds (nanoparticles, microspheres, beads) as controlled drug release devices (Prabaharan et al. 2008, Rejinold et al. 2011, Mundargi et al. 2011, Lou et al. 2014).

In this study, the thermosensitive gelatin-based hybrid hydrogel was chemically obtained with biocompatible and synthetic PNVCL using the crosslinking agents, EDC/NHS. Covalent crosslinking of gelatin with PNVCL was an effective method to design gelatin-based biocompatible and thermosensitive scaffolds with a more stable structure. Moreover, water uptake and drug release behavior of the (GL-g-PNVCL) hybrid scaffolds were investigated depending on the environmental temperature (at room temperature 25°C, and at physiological temperature 37°C) and their potential use for drug release systems was evaluated.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

Gelatin, N-Vinylcaprolactam (NVCL), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxy succinimide (NHS), and 3-mercaptopropionic acid (MPA) were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2'-Azobisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). All other chemicals and solvents were supplied from either Sigma-Aldrich or Merck (Darmstadt, Germany).

### Synthesis of PNVCL-COOH

Thermosensitive PNVCL-COOH was synthesized by free radical polymerization in ethanol (Figure 1A). The monomer NVCL (37.35 mmol) and MPA (3.278 mmol) were dissolved in 50 mL of absolute ethanol. The oxygen was removed from the reaction solution through nitrogen for 20 min. Then, AIBN (0.304 mmol) was added to initiate the polymerization. Polymerization was performed under nitrogen atmosphere at 75 °C for 8 h. Samples were precipitated in diethyl ether. Upon drying in vacuum, the solid was re-suspended in ultrapure water. Then, the solution was purified by dialysis for 3 days against ultrapure water in cellulose membrane tubing (MW cutoff 1000 Da) and freeze-dried (Prabaharan 2008).

### Synthesis of GL-g-PNVCL

Gelatin solution (10 %, w/v) (bovine skin, Sigma-Aldrich, Germany) was prepared at 50°C using ultrapure water (Direct-Q, Merck Millipore, Germany) as a solvent. GL-g-PNVCL copolymer was synthesized by grafting PNVCL-COOH onto GL chains as shown in Figure 1B. 10 mL gelatin solution (10%) was mixed with 0.5 g of PNVCL-COOH (5% w/v in 1mL deionized water) (GL/PNVCL-COOH; 2:1). Later, 0.1 mL solutions of NHS (0.023 g) and EDC (0.018 g) in ultrapure water were added. The crosslinking reaction was performed under constant stirring for 4 h at room temperature.

### Preparation of the GL-g-PNVCL copolymer scaffold

GL-g-PNVCL scaffolds were fabricated from GL-g-PNVCL hybrid hydrogel solution which was transferred into the wells of 24 well-plates (1 mL/well each), frozen overnight at -80°C, followed by lyophilization at -56°C (Christ Alpha 1-4 LD, Osterode am Harz, Germany).

### Attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

Structural assessment of the synthesized GL, PNVCL-COOH, and conjugated product GL-g-PNVCL were performed by using ATR-FTIR (Spectrum 100, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA). Finely powdered lyophilized samples were used for characterization. Spectral measurements were performed in the region of 400–4000 cm<sup>-1</sup> with an accumulation of four scans.

### Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) analysis

Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) experiments were recorded using a Varian mercury 400MHz model spectrometer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). <sup>1</sup>H-NMR spectra of GL, PNVCL-COOH, and GL-g-PNVCL were obtained using tetramethylsilane as an internal standard and D<sub>2</sub>O as a solvent at 25°C.

### Phase transition temperature analysis

The phase transition of the copolymer in aqueous solution was determined by utilizing the spectrophotometric method. Briefly, 0.3 mL each of the polymer solutions (GL, PNVCL-COOH, or GL-g-PNVCL) were filled in the wells of 96-well polystyrene plates. The plates were read on a temperature-controlled Spectramax M5 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 480 nm.

The phase transition from transparent to white opaque gel was determined by slowly heating from 25 °C to 42 °C with the change rate of 1 °C/min. The samples were equilibrated for 10 min at each temperature.

### Temperature-sensitive water uptake

The water uptake of GL-g-PNVCL scaffolds was investigated at two different temperatures (at 25°C and 38°C). The weight of the dry lyophilized samples (W<sub>dry</sub>) were measured, then the samples were incubated in swelling media (distilled water). At predetermined time intervals, the weight of swollen scaffolds (W<sub>wet</sub>) was recorded after removing the excess surface water. The swelling ratio of the samples was calculated using the following equation [Eq. (1)]:

$$\% \text{ Water Uptake} = [(W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) / W_{\text{dry}}] \times 100 \quad (1)$$

where W<sub>wet</sub> is the weight of the swollen sample at predetermined time, and W<sub>dry</sub> is the weight of the dried sample.

### Temperature-sensitive drug release

To assess the in vitro drug release properties of the GL-g-PNVCL scaffold, experiments were carried out with the model protein (BSA; bovine serum albumin) and model drug lidocaine (local anesthetic) and at two different temperature (25°C and 38°C) conditions. To incorporate the model drug into GL-g-PNVCL scaffolds,

empty scaffolds (approximately 150 mg) were wetted with 0.5 mL in a concentrated drug solution (2.5 mg/well) and kept overnight at 25°C. Each experiment was performed in triplicates under static conditions. Then scaffolds were immersed in 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), sealed, and incubated at 25°C and 38°C. At selected time points, 1 mL aliquots were withdrawn and replaced with the release medium. The amount of BSA was measured by using the Lowry assay at 750 nm and using the BSA standard curve. The amount of lidocaine was measured by UV spectrophotometer at 263 nm and using the lidocaine standard curve.

## RESULTS and DISCUSSION

### Synthesis and structural characterization of the copolymer

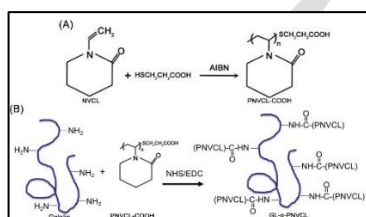
Firstly, N-vinylcaprolactam was polymerized by free radical polymerization. Carboxylic acid functionalized PNVCCL-COOH was formed in the presence of the MPA (Figure 1A). Grafting reaction between the synthetic and the natural polymer was carried out by chemically crosslinking reactions. Carboxylic acid groups of PNVCCL-COOH were activated with NHS and EDC and conjugated with GL via  $-NH_2$  groups to form covalent amide bonds ( $-CONH$ ). The reaction scheme of GL-g-PNVCCL copolymer is presented in Figure 1B.

The structures of PNVCCL-COOH, GL, and GL-g-PNVCCL were confirmed through FTIR and <sup>1</sup>HNMR analyses.

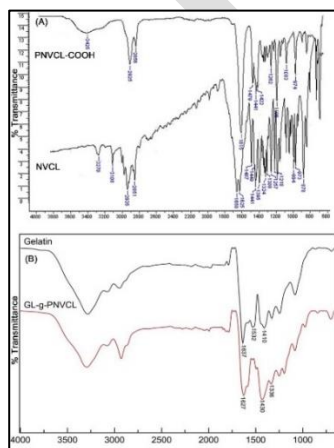
The FTIR spectra of GL, PNVCCL-COOH, and GL-g-PNVCCL are shown in Figure 2. Characteristic vinyl peaks of NVCL monomer at 3000–3100  $cm^{-1}$  ( $-CH=$ ) disappeared due to double bond opening and the new bands of PNVCCL-COOH were observed due to acid peak ( $-COOH$ ) at 1615  $cm^{-1}$  ( $-C=O$  stretching vibration), and 3425  $cm^{-1}$  ( $-OH$  stretching vibration) are shown in Figure 2A.

The ATR-FTIR spectrum of gelatin exhibited the characteristic absorption bands of its protein structure, the bands at 1637 and 1532  $cm^{-1}$  are assigned to  $C=O$  stretching for the amide I and N-H deformation peak for the amide II, respectively.

After covalent amide conjugation, the spectrum of GL-g-PNVCCL exhibited that the characteristic acid peak at 1627  $cm^{-1}$  came from  $-C=O$  and the  $C-N$  stretching vibration peak of primary amine groups on gelatin at 1532  $cm^{-1}$  (Figure 2B) has disappeared which proves the involvement of this group in the crosslinking reaction.



**Figure 1.** Chemical synthesis of A) PNVCCL-COOH B) GL-g-PNVCCL

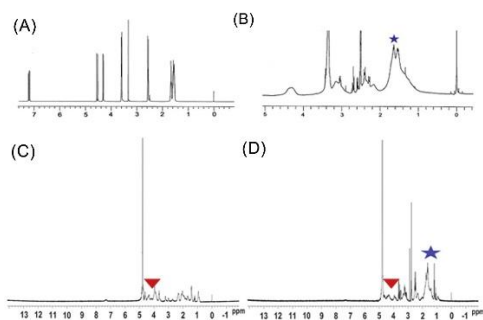


**Figure 2.** ATR-FTIR spectra of (A) NVCL and PNVCCL-COOH (B) Gelatin (GL) and GL-g-PNVC

<sup>1</sup>H-NMR spectra of NVCL, PNVCL-COOH, GL, and GL-g-PNVCL hybrid polymer are given in Figure 3. The spectra exhibited peaks of PNVCL-COOH at 4.3 ppm (1H, -NCH), 3.1 ppm (2H, -NCH<sub>2</sub>), 1.4–1.8 ppm (8H, -CH<sub>2</sub>-), 2.4 ppm (2H, -COCH<sub>2</sub>-) and chain-transfer agent (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) peaks at 2.6–2.7 ppm. Moreover, the peak of the vinyl proton of the monomer at 7 ppm was not detected.

The pure gelatin exhibited chemical signals in the range of 0.5–1.5 ppm which represent aliphatic protons attached to carbon atoms of valine, leucine, and isoleucine. The signals in the region of 1.5–3.0 ppm are due to aliphatic carbon protons of Arg, Leu, Lys, Pro, Gly, and Asp. The peaks between 3.2 and 4.3 ppm represent the resonance signals of the -CH of the amino acids. The chemical shifts around 7.3 and 8.2 ppm are due to aromatic protons of Phe (Subramanian and Vijayakumar 2013).

After synthesis of GL-g-PNVCL, <sup>1</sup>H-NMR spectra in Figure 3D exhibited both chain-transfer agent (S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) peaks of PNVCL at 2.6–2.7 ppm and gelatin peaks around 3.2 and 4.3 ppm indicating a chemical linkage of the PNVCL group on the gelatin backbone.

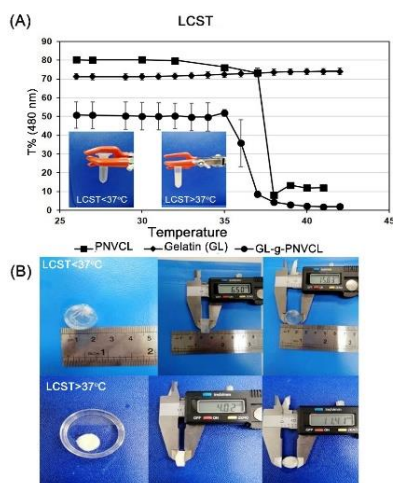


**Figure 3.** <sup>1</sup>H NMR spectra of (A) NVCL and (B) PNVCL-COOH c) Gelatin and d) GL-g-PNVCL

### Phase transition temperature

Temperature-dependent phase transition of PNVCL and the copolymer GL-g-PNVCL solutions were investigated in the temperature range of 25–45°C by a spectrophotometer at 480 nm in terms of decrease of transmittance as shown in Figure 4. Gelatin solution (10% w/v) had a homogeneous transparent form in all temperatures. However, PNVCL-COOH (10%) copolymer solutions exhibited a phase transition from a transparent solution to white opaque solution at 37°C to be seen in Figure 4A. After conjugation with thermosensitive PNVCL, gelatin-based hybrid hydrogel solution exhibited phase transition at 38°C. A slight increase in the LCST value of GL-g-PNVCL could be attributed to the hydrophilic character of gelatin. The phase transition temperature which can be tuned by concentration, molecular weight, and hydrophobic/hydrophilic character of polymers is the most important parameter of the thermosensitive hydrogels (Sun and Wu 2011, Wu 2005). PNVCL-g- Col copolymer exhibited a higher LCST value at 38.5 °C. when compared with the LCST of homopolymer PNVCL (Durkut and Elçin 2017). Curcio et al. prepared thermosensitive microspheres including hydrolyzed methacrylated gelatin (HMA) and NIPAAm. The LCST of the thermosensitive microspheres was determined as 36.9°C due to gelatin which increased the content of hydrophilic moieties in the network (Curcio et al. 2010).

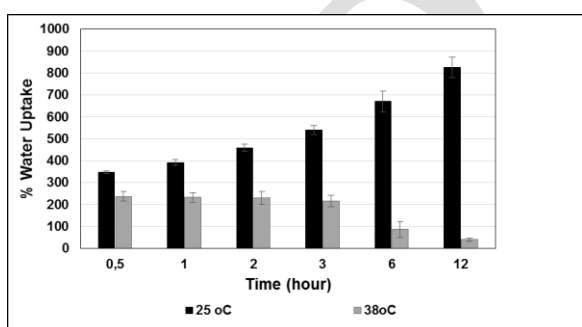
Similarly, GL-g-PNVCL scaffolds exhibited a phase transition with changing temperature which was given at Figure 4B. By an increase in the hydrophilic character and water affinity at 25 °C, GL-g-PNVCL cylindrical scaffold had a diameter of 15 mm and a thickness of 0.6 mm. However, above the LCST, dimensions of scaffold decreased approximately 40 % (diameter of 11 mm and thickness of 0.4 mm) as a result of the collapse.



**Figure 4.** Temperature-dependent phase transition of (A) PNVCL, gelatin, and GL-g- PNVCL solutions (B) GL-g-PNVCL scaffold and their dimensions

### Water uptake

The thermosensitive water uptake of GL-g-PNVCL scaffolds was tested at 25°C and 38°C. As shown in Figure 5, the GL-g-PNVCL scaffold displayed a higher swelling property at 25°C owing to the increasing hydrophilic character and water affinity. However, above the LCST, hydrophobic interactions between chains of polymer became dominant which cause the dismissal of water molecules from scaffold leading to its collapse. As a consequence, water uptake significantly decreased at 38°C. Curcio et al. (2010) had previously shown the swelling behavior of thermosensitive HGelMA-PNIPAAm microspheres. According to their results, hydrophilic units in the microspheres had the desire to bind many water molecules leading to the swelling of the polymeric network at 25 °C. However, at 40 °C, the hydrophobic interactions increased between the polymeric chains and water molecules released from the microspheres. Water uptake rate of a hydrogel scaffold is a significant feature in applications like the controlled release of biological agents and tissue engineering.

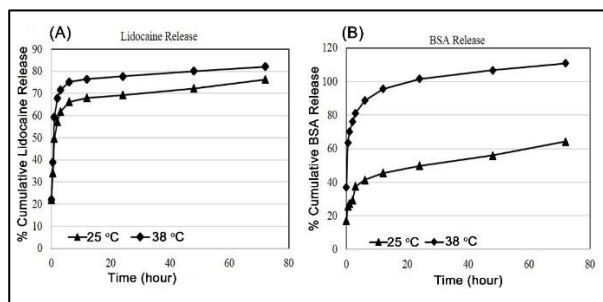


**Figure 5.** Water uptake of GL-g-PNVCL scaffolds depending on temperature at 25°C and 38°C

### Model drug release

*In vitro* model protein (BSA) and model drug (lidocaine) release from GL-g-PNVCL was examined as a function of temperature at 25°C and 38°C (Figure 6). GL-g-PNVCL scaffolds exhibited an initial burst release for the model agent (approximately 30%) in all groups during the first 30 min. The release rate of the loaded model drug increased with increasing temperature. Above the LCST, loaded lidocaine and BSA in GL-g-PNVCL scaffolds were released at 82 % and 110 % within 72 hours, respectively. Above the phase transition temperature, the hydrophobic character of GL-g-PNVCL scaffold became dominant and led to a rapid collapse of the scaffold triggering the release of the drug molecules. The higher protein release than at 100% of loaded BSA can be attributed to the natural protein gelatin which could have released under the conditions. In contrast, at 25°C, loaded lidocaine and BSA release decreased to almost 76% and 64%, respectively. Below the LCST, model drug release from GL-g-PNVCL decreased with increasing hydrophilic character caused by hydrogen-bond interactions between the polymer and the protein. According to results, thermosensitive GL-g-PNVCL scaffolds exhibited temperature-triggered drug release above the physiological temperature (37 °C).

Thermosensitive gelatin based hydrogels have gained importance in several biomedical fields, such as drug delivery and tissue engineering because of its non-toxicity, biocompatibility and high water absorption capacity. Thus, there are several reports on thermosensitive gelatin based hydrogels in the literature. For example, Slemming Adamsen et al. had proposed the synthesis of a nanofiber based in situ crosslinked PNIPAAm and gelatin, and had shown its thermally release characteristics of a drug (DOx). At 40 °C, total DOX release from the crosslinked fibers was found to be three times higher than that at room temperature (Slemming Adamsen et al. 2015).



**Figure 6.** Cumulative release profiles of GL-g-PNVCL scaffolds depending on temperature at 25°C and 38°C (A) Lidocaine (B) BSA

## CONCLUSION

We have developed a hybrid and mechanically strong copolymer by grafting the synthetic polymer, poly(N-vinylcaprolactam) with gelatin. Thermosensitive PNVCL grafting on gelatin slightly increased phase transition temperature. GL-g-PNVCL scaffolds quickly responded to the environmental temperature by regulating water uptake and drug release. According to our findings, the thermosensitive properties of gelatin-based hybrid hydrogel together with its biological attributes has the potential to enhance the therapeutic efficiency of the delivery of bioactive agents and could possibly be used as a versatile system as a tissue engineering scaffold.

## REFERENCES

- Ayre AP, Pawar HA, Khutle NM, Lalitha KG 2014. Polymeric nanoparticles in drug delivery systems critical review and concepts. *Int J Pharm Technol* 5:2809–2823.
- Bozzini S, Petrini P, Altomare L, Tanzi MC 2009. Fabrication of chemically cross-linked porous gelatin matrices. *J. Appl. Biomater. Biomech.* 7: 194–199.
- Buwalda SJ, Boere KW, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE 2014. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *J. Control. Release* 190:254–273.
- Chang Y, Xiao L, Tang Q, 2009. Preparation and characterization of a novel thermosensitive hydrogel based on chitosan and gelatin blends. *J Appl Polym Sci.* 113:400–7.
- Chun S, Kim J. 1996. A novel hydrogel-dispersed composite membrane of poly(N-isopropylacrylamide) in a gelatin matrix and its thermally actuated permeation of 4-acetamidophen. *J Control Release* 38:39–47.
- Cortez-Lemus N A and Licea-Claverie A 2016. Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular; *Progress in Polymer Science* 53: 1-51.
- Curcio M, Spizzirri U G, Iemma F, Puoci F, Cirillo G, Parisi OI., Picci N. 2010. Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76: 48–55.
- Curcio M, Puoci F, Spizzirri UG, Iemma F, Cirillo G, Parisi OI, et al. 2010. Negative thermo-responsive microspheres based on hydrolyzed gelatin as drug delivery device. *AAPS PharmSciTech.* 11:652–662.
- Durkut S. and Elcin Y M 2017. Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam)-g-collagen. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45:1665–1674.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA 2012. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Control Rel* 161:38–49.
- Jiang Q, Xu H, Cai S, Yang Y 2014. Ultrafine fibrous gelatin scaffolds with deep cell infiltration mimicking 3D ECMs for soft tissue repair. *J Mater Sci: Mater Med* 25:1789–1800.
- Lee W and Lee S 2007. Effect of gelatin on the drug release behaviors for the organic hybrid gels based on N-isopropylacrylamide and gelatine. *J Mater Sci Mater Med.* 18:1089–96.
- Lien SM, Ko LY, Huang TJ 2009. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 5: 670–679.

- Lou S, Gao S, Wang W, Zhang M, Zhang Q, Wang C, Li C, Kong D 2014. Temperature/pH dual responsive microgels of crosslinked poly(N-vinylcaprolactam-co-undecenoic acid) as biocompatible materials for controlled release of doxorubicin. *J Appl Polym Sci* 131:41146/1–7.
- Luo Y, Lode A, Akkineni AR, Gelinsky M 2015. Concentrated gelatin/ alginate composites for fabrication of predesigned scaffolds with a favorable cell response by 3D plotting. *RSC Adv.* 5: 43480–43488.
- Mundargi RC, Rangaswamy V, Aminabhavi T, 2011. Poly(Nvinylcaprolactam-co-methacrylic acid) hydrogel microparticles for oral insulin delivery. *J Microencapsulation* 28: 384–94.
- Nickerson MT, Patel J, Heyd DV, Rousseau D, Paulson AT, 2006. Kinetic and mechanistic considerations in the gelation of genipin-crosslinked gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 39: 298–302.
- Ofner CM, and Bubnis WA 1996. Chemical and swelling evaluations of amino group cross-linking in gelatin and modified gelatin matrices. *Pharm. Res.*, 13: 1821–1827.
- Prabaharan M, Grailler JJ, Steeber DA, Gong S 2008. Stimuli-responsive chitosan-graft poly(N-vinylcaprolactam) as a promising material for controlled hydrophobic drug delivery. *Macromol. Biosci.* 8: 843–851.
- Rejinold NS, Muthunayanan M, Divyarani VV, Sreerekha PR, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R. 2011. Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *J Colloid Interface Sci.* 360:39–51.
- Slemming-Adamsen P, Song J, Dong M, Besenbacher F, Chen M 2015. In Situ Cross-Linked PNIPAM/Gelatin Nanofibers for Thermo-Responsive Drug Release. *Macromol. Mater. Eng.* 12: 1226–1231
- Su K and Wang C 2015. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol. Lett.*, 37:2139–2145.
- Subramanian K, Vijayakumar V 2013. Evaluation of isophorone diisocyanate crosslinked gelatin as a carrier for controlled delivery of drugs. *Polym. Bull.* 70:733–753.
- Sun, S.; Wu, P. 2011. Infrared Spectroscopic Insight into Hydration Behavior of Poly(N-vinylcaprolactam) in Water. *J. Phys. Chem. B*, 115, 11609–11618.
- Tang G, Zhang H, Zhao Y, Zhang Y, Li X, Yuan X 2012b. Preparation of PLGA scaffolds with graded pores by using a gelatin-microsphere template as porogen. *J Biomater Sci Polym Ed* 23:2241–2257.
- Toh WS and Loh XJ 2015. Advances in hydrogel delivery systems for tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* 45:690–697.
- Tseng HJ, Tsou TL, Wang HJ, and Hsu S-H 2013. Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 7: 20–31.
- Wang H, Boerman OC, Sariibrahimoglu K, Li Y, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG 2012. Comparison of micro- vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase. *Biomaterials* 33:8695–8703.
- Wu JY, Liu SQ, Heng PWS, Yang YY. 2005. Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels. *J Control Release.* 102:361–372.



## Production and characterization of calcium silicate added Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> for bioceramic applications

Gülşüm Topateş\*

\*Ankara Yıldırım Beyazıt University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: gtopates@ybu.edu.tr

### Abstract

Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramics show good combination of mechanical, thermal and chemical properties and the usage of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> as prosthesis in bone reconstruction/repair or in joints replacements has been investigated intensively. The main drawback of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramics is the necessity of special equipment during the production process. Sintering should be done under protective atmosphere. This study aims to produce and characterize Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> based ceramics with various amounts of calcium silicate addition. Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramics are composed of 0-15 wt. % of calcium silicate. Sintering was done under air atmosphere between 1200-1300°C. Calcium silicate addition formed liquid phase and provided liquid phase sintering and hence densification. Highly dense Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> based ceramics were obtained, the open was ~10 %. Three point bending strength increased from 35 MPa (for pure calcium silicate) to 76 MPa with the contribution of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Elastic modulus over 40 GPa. These results showed that the weak mechanical properties of bioactive ceramics can be improved and non-oxide ceramics can be densified at lower temperature and under air atmosphere.

**Keywords:** calcium silicate, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, air sintering, bioceramic.

### INTRODUCTION

Hench classified ceramics depending on the tissue-bioceramic interface into four groups; bioinert, porous-bioinert, bioactive and biodegradable. Bioinert ceramics do not form chemical or biological bond with tissue, a non-adherent, fibrous capsule is being formed between implant and tissue. In the second type, tissue ingrowth into micropores is being observed. A biological interface forms and it can withstand more complex stress than that form with bioinert ceramic. Bioactive ceramic forms a chemical bond with the tissue and it increases rate of bone formation. In the last group, ceramic material is dissolved in the tissue and replaced with bone (Hench, 1991).

Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> is one of the well-known non-oxide, structural ceramics that contains high amount of covalent bonding character. Due to covalent character, its diffusion coefficient is quite low and that makes densification of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> harder. It's necessary to use special equipment or conditions (e.g. controlled atmosphere, external pressure) during the sintering process of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. In spite of this disadvantage, it has a perfect combination of chemical, thermal and mechanical properties. Depending on the production processes and microstructure, it's bending strength can reach to 1100 MPa while higher fracture toughness values around 10 MPa.m<sup>1/2</sup> can be attained (Riley, 2000). This superior mechanical properties make them one of the candidate for bioceramic materials where high-load resistance is required. It has also high biocompatibility, antimicrobial behavior, stability in vivo/in aqueous environment and partial radiolucency. These properties increase the applicability of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> as a bioceramic (Rahaman and Xiao, 2017), (Bal and Rahaman, 2012). The first usage of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ceramic was as a spinal fusion implant in Australia in 1986 and it was approved by US Food and Drug Administration to be used as a spinal vertebral body replacement device in 2006. It has been still under investigation for total hip, total joint and dental implant products (Fu et.al, 2018). Even Pezzotti et al. showed that Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> can be bioactive after a special heat treatment process, most of the studies accepted Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> is a bioinert ceramic in-vivo.(Pezzotti et al., 2017), (Silva et al., 2008), (Mazzocchi and Bellosi, 2008).

Calcium silicate (CS) based bioceramics have been known as bioactive bioceramics for bone-tissue regeneration due to their superior bone bioactivity compared to hydroxyapatite. Various types of CS have been used as bioceramics; β-CaSiO<sub>3</sub>, tricalcium silicate, dicalcium silicate. The poor mechanical strength is restricted the usage of them only for low-bearing applications (Pan et al., 2016).

The aim of this study to combine both ceramics to improve their weak properties. CS will be used as a sintering additive for densification of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> and providing bioactive behavior. The mechanical resistance of CS will improved the by the incorporation of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> whose mechanical properties are significantly better than CS.

## MATERIALS AND METHODS

$\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  powder (UBE E-10) and calcium silicate ( $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ) were used as starting powders.  $\text{Y}_2\text{O}_3$  (H.C. Stark) and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Honeywell Fluka) were added to  $\text{Si}_3\text{N}_4$  powder by 5 wt. %.  $\text{Si}_3\text{N}_4$  mixture were prepared by using horizontal ball mill (MSE Technology) at 180 rpm for 24 h. 7.5 and 15 wt.% of CS were added to  $\text{Si}_3\text{N}_4$  and dry mixed by Dual Asymmetric Centrifugal Mixer (Speed Mixer 150 FVZ). The samples were shaped by uniaxial pressing under 100 MPa pressure. Disk shaped samples with a diameter of 20 mm were prepared for XRD and density measurement, for mechanical testing rectangular bars were pressed with dimensions of 3x5x50 mm. Finally samples were sintered at 1200-1300°C for 1 h by using a box furnace (MSE technology) under air. Seven different samples were designed and their name were given in Table 1.

**Table 1.** Name and composition of samples

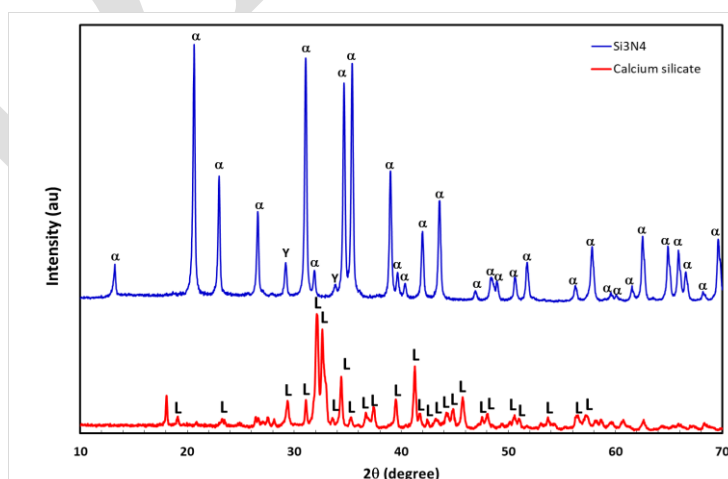
Name	Sintering Temperature (°C)	Amount of CS addition (Wt. %)
S-12	1200	0
S-13	1300	0
C-12	1200	100
S-12/7.5CS	1200	7.5
S-12/15CS	1200	15
S-13/7.5CS	1300	7.5
S-13/15CS	1300	15

Density of samples was measured by Archimedes' principle of buoyancy, the powders and samples were characterized by X-ray diffraction (XRD) (Rigaku Miniflex 600) by using using monochromatic  $\text{Cu-K}\alpha$  radiation. Mechanical characterization was done by 3-point bending test (Instron 5581 model Universal Testing Machine). Microstructure of samples was characterized by scanning electron microscope (SEM) (Hitachi SU 5000)

## RESULTS and DISCUSSION

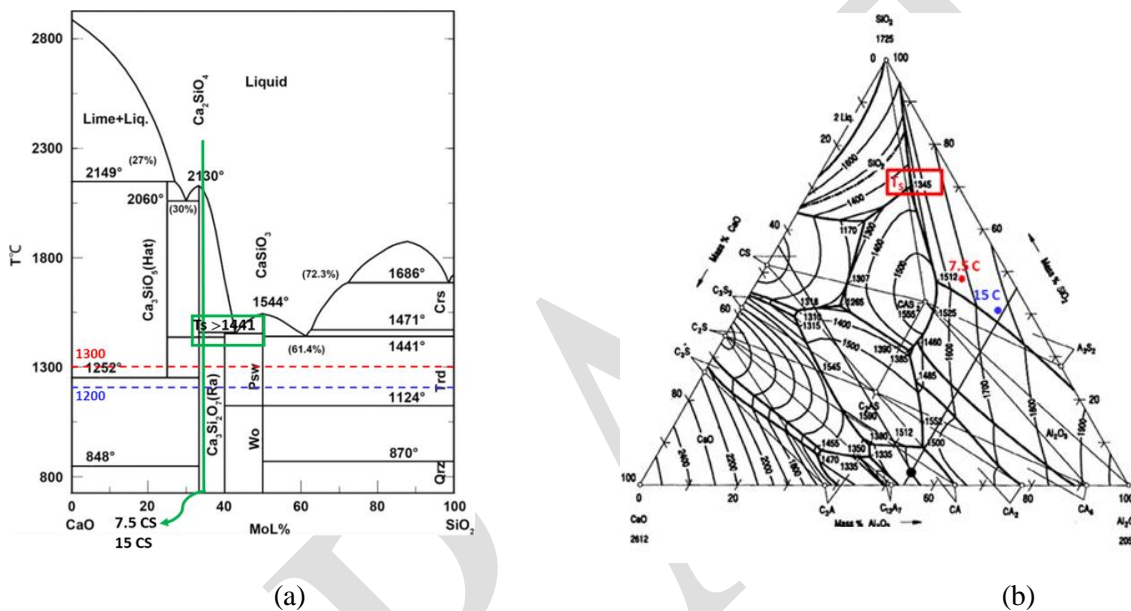
### Phase Development and Densification

The XRD patterns of starting powders can be seen from Figure 1.  $\text{Si}_3\text{N}_4$  powder was consisted of  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  and some amount of  $\text{Y}_2\text{O}_3$  was also detected. CS was in the form of larnite whose chemical composition was  $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ .



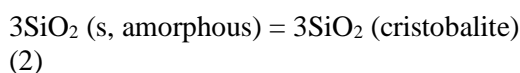
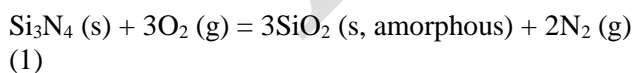
**Figure 1.** XRD patterns of starting powders ;  $\alpha$ :  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ , L: larnite ( $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ )

In the study, the possible usage of CS as a liquid phase was investigated. During the consolidation of ceramics, liquid phase can be used to increase transport of matter into the pores by forming a high diffusivity path. In this study, the possible oxides that are form liquid phase are CaO, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. To find out the solidus temperature (the temperature where first liquid phase form during heating process), binary and the ternary diagrams of oxides were used. Figure 2. (a) shows binary CaO and SiO<sub>2</sub> system, the composition of possible liquid phase was indicated by green line. According to diagram, the solidus temperature was > 1441°C that is higher than sintering temperatures. When Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> was included to this binary system, ternary diagram of CaO-SiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Figure 2. (b)) must be used. The composition of possible liquid phase were given in the diagram and their solidus temperature was 1345°C which was still higher than the sintering temperatures. With the addition of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, the temperature decreased nearly 100°C. Both liquid phases are a quaternary compounds, quaternary diagram of CaO, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> must be used. This diagram wasn't obtained but it's anticipated that the solidus temperature will be formed at least the highest sintering temperatures.

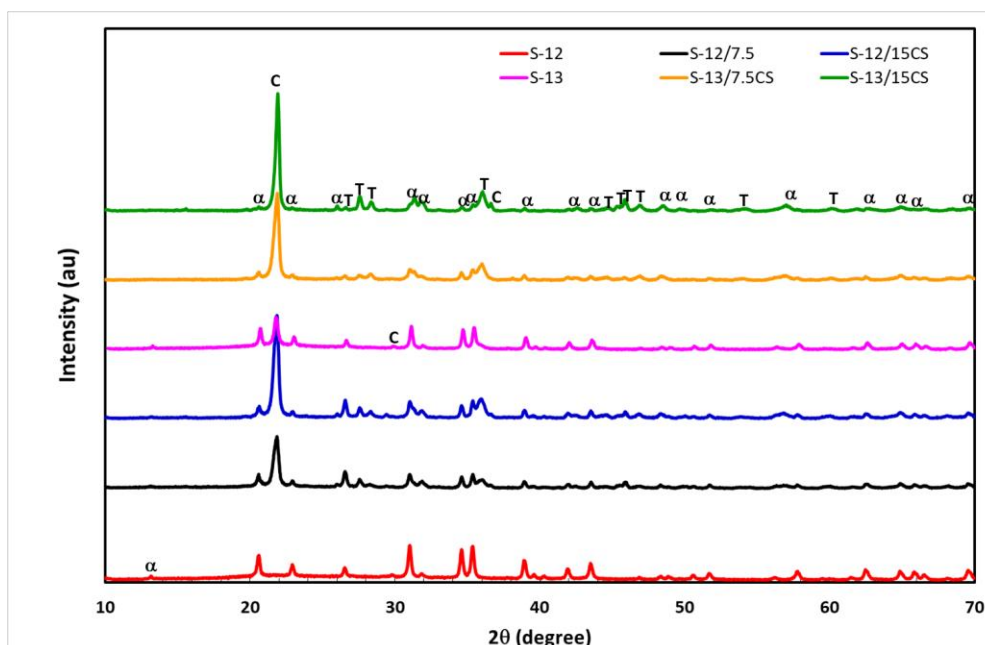


**Figure 2.** (a) Binary and (b) ternary phase diagrams to find the solidus temperature of liquid phase (Pan et al., 2016, Shu et al., 2015)

The phase development of samples can be seen in Figure 3. Samples without CS addition have Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> in  $\alpha$ -form. As the sintering temperature increased from 1200 to 1300°C, formation of cristobalite took place due to oxidation of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Ding et al. showed that oxidation product of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> at lower temperature was amorphous SiO<sub>2</sub> and at higher temperature it crystallize to cristobalite form (Ding et al. 200) The oxidation reaction of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> were given in Eqs. (1) and (2).

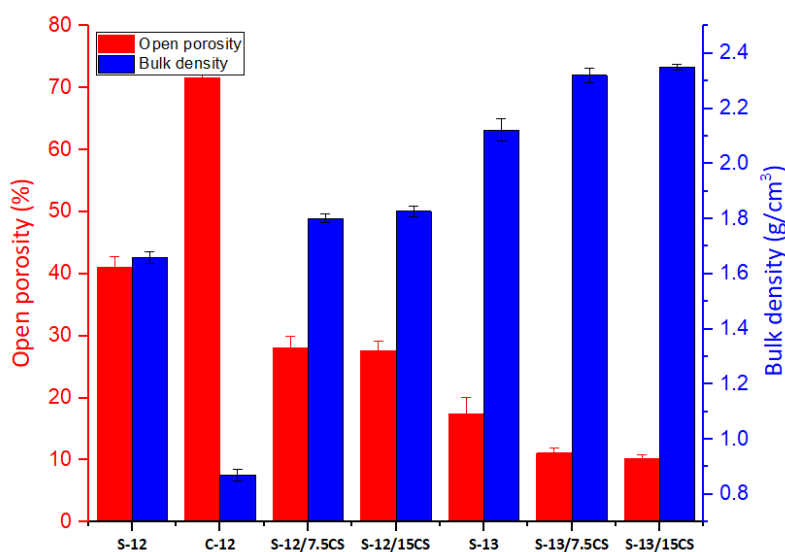


When CS was added, a new crystal phase was developed; tricalcium cyclo-trisilicate (3CaO.3SiO<sub>2</sub>). It formed via the reaction between CS and amorphous SiO<sub>2</sub> that was formed during the oxidation of Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Addition of CS was also accelerated the crystallization of cristobalite since it was formed at 1200°C for CS added samples.



**Figure 3.** XRD patterns of samples;  $\alpha$ :  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$ , C: cristobalite ( $\text{SiO}_2$ ), T: Tricalcium cyclo-trisilicate ( $3\text{CaO} \cdot 3\text{SiO}_2$ )

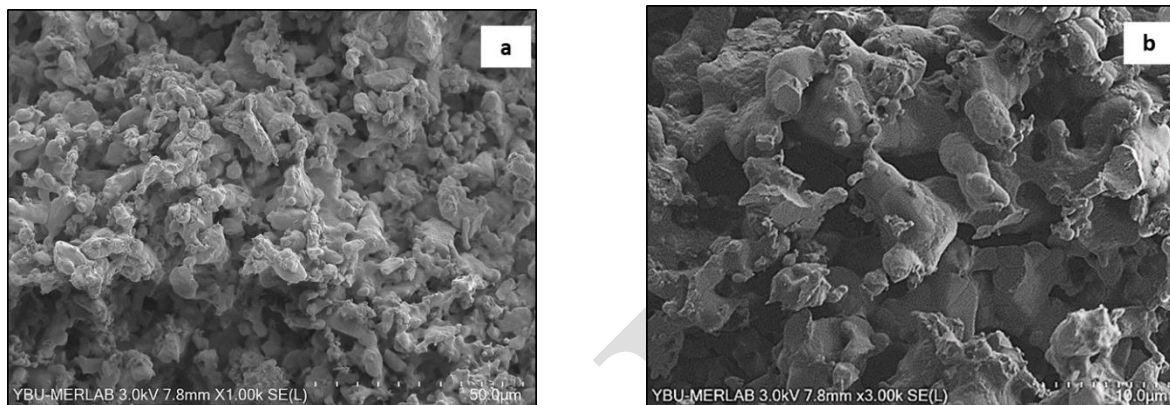
The open porosity and bulk density values of all samples were given in Figure 4. The highest porosity was obtained for C-12. As mentioned by Pan, CS ceramics have poor densification behavior (Pan et al., 2016). Also, phase diagram in Figure 2 (a) showed that there was no liquid phase at the sintering temperatures, therefore highly porous ceramic was obtained. S-12 had a porosity around 40%, with an increase in temperature the porosity decreases below 30%. CS addition also increased the densification behavior as anticipated. For S-13/7.5 and 15CS, lower porosity (less than 10%) was obtained. It showed that formation of liquid phase took place at 1300°C.



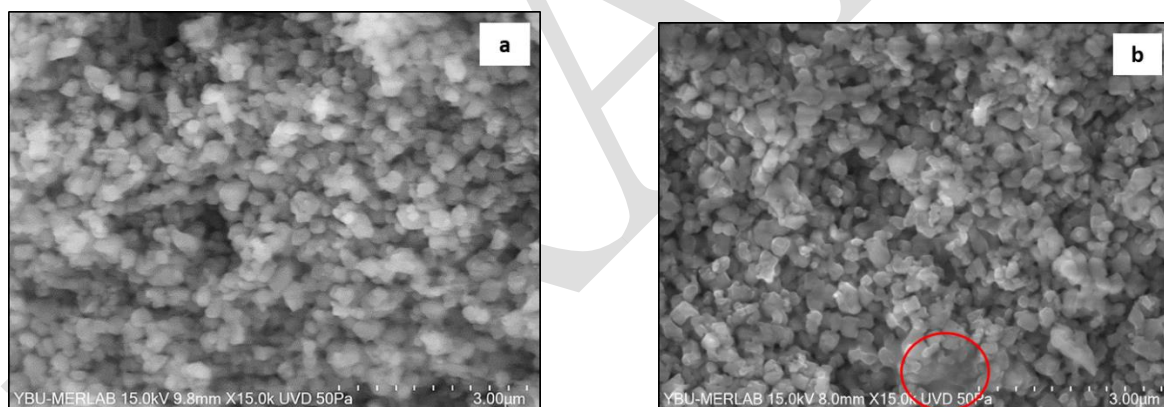
**Figure 4.** Open porosity and bulk density values of samples

## Microstructural Development

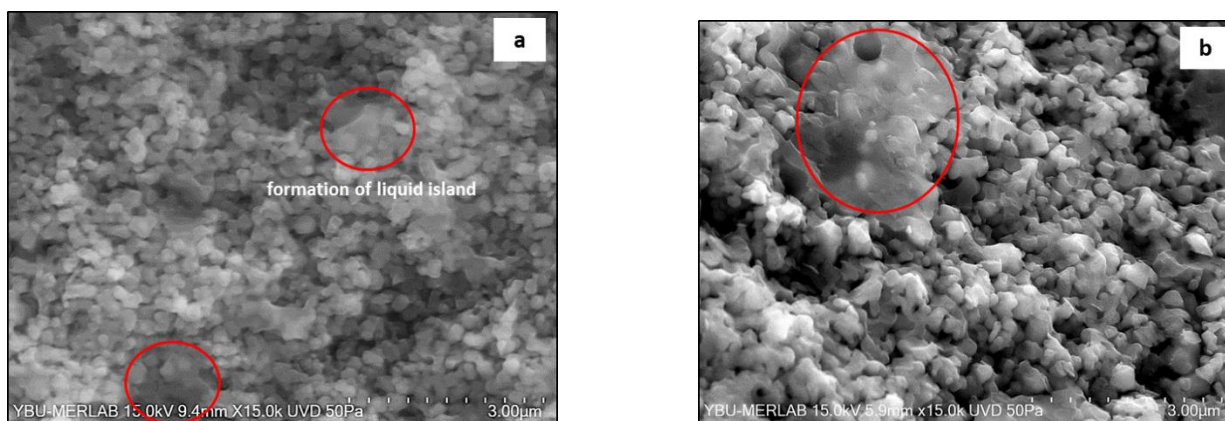
Microstructures of samples were investigated from the fracture surface of samples by secondary electron (SE) images. C-12 had highly porous structure, bonding of grains also took place via solid phase reaction as seen from Figure 5 (a) and (b). Figure 6 (a) shows the microstructure of S-12 and (b) shows S-13. Typical  $\alpha$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  grains equiaxed shaped and lower aspect ratio were presented in the samples. Densification started at 1300°C, neck formation was observed for S-13 through the liquid phase. That was indicated by red circle. As CS added to the samples, neck formation took place, it was obvious for SC-13/15. Also, liquid phase formed but its distribution non-uniform of liquid phase. These liquid island were shown by red circles in Figure 7 (a) and (b).



**Figure 5.** SEM-SE images of C-12 at different magnifications (a) 1kX (b) 3kX



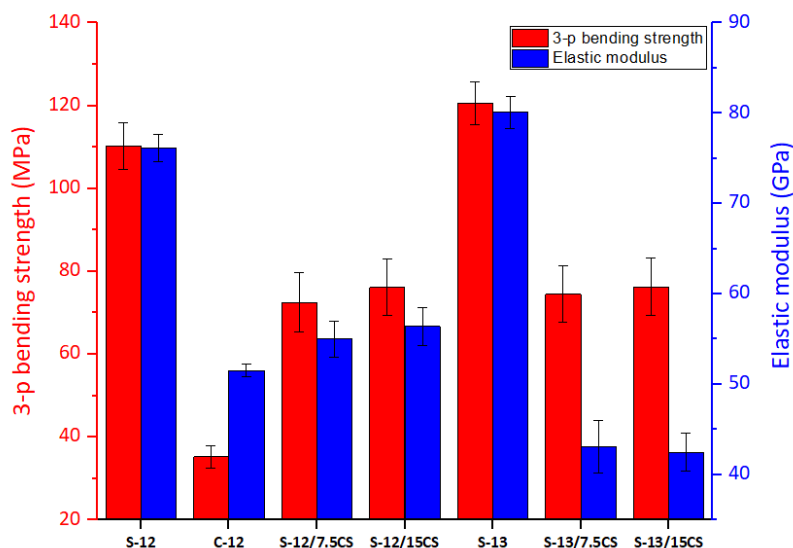
**Figure 6.** SEM-SE images of (a) S-12 and (b) S-13



**Figure 7.** SEM-SE images of (a) S-12/15C (b) S-13/15C

### Mechanical Characterization

3-point bending strength and elastic modulus values of samples can be seen in Figure 8. Results showed that both sintering temperature and  $\text{Si}_3\text{N}_4$  had important contribution on final mechanical properties. C-12 had the lowest bending strength.  $\text{Si}_3\text{N}_4$  improved the density, it nearly doubled the 3-point bending strength value of S-13/7.5 and 15 CS. The highest strength was achieved for S-13, the strength value was almost 120 MPa. Even the addition of CS decreased the strength, compare to pure CS higher mechanical properties could be obtained.



**Figure 8.** Mechanical properties of samples

### CONCLUSION

$\text{Si}_3\text{N}_4$  ceramics with two different amounts of CS addition were prepared under air atmosphere by pressureless sintering. The type CS was tricalcium cyclo-trisilicate that was formed by the reaction between starting CS and cristobalite. The addition of CS enhanced densification behavior; with the addition of 15 wt.% CS, porosity of samples reduced by half for both sintering temperatures. Comparison with CS, higher mechanical properties were successfully obtained, which is much higher than that of the pure CS (35.2 MPa for 12-C and 76 MPa for 12-S/7.5CS). To prevent non-uniform distribution of liquid phase in CS added samples, wet-mixing process can be applied instead of dry-mixing. Cristobalite formation can be diminished by forming a protective atmosphere in the furnace (e.g., usage of double crucible system). To observe the tissue interaction of  $\text{Si}_3\text{N}_4$ -CS ceramics, samples should be tested in simulated body fluid.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project is supported by the Ankara Yıldırım Beyazıt University, Scientific Research Project, Number: 4116. The author greatly acknowledges Dr. Ayşe Kalemtaş for supply of Calcium Silicate powder.

## REFERENCES

- Bal BS, Rahaman M 2012. Orthopedic applications of silicon nitride ceramics. *Acta Biomaterialia*, 8: 2889–2898
- Hench, L 1991. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7): 1487–1510.
- Ding S, Zeng YP, Jiang D 2007. Oxidation bonding of porous silicon nitride ceramics with high strength and low dielectric constant. *Materials Letters*, 61:2277–2280
- Fu L, Engqvist H, Xia W 2018. Spark plasma sintering of biodegradable Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> bioceramic with Sr, Mg and Si as sintering additives for spinal fusion. *Journal of the European Ceramic Society*, 38:2110–2119.
- Mazzocchi M, Bellosi A 2008. On the possibility of silicon nitride as a ceramic for structural orthopaedic implants. Part I: processing, microstructure, mechanical properties, cytotoxicity. *Journal of Materials Science: Mater Med* 19: 2881.
- Pan Y, Zuo K, Yao D, Yin J, Xin Y, Xia Y, Liang H, Zeng Y 2016. The improved mechanical properties of β-CaSiO<sub>3</sub> bioceramics with Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> addition. *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 55:120–126
- Pezzotti G, Marin E, Adachi T, Rondinella A, Boschetto F, Zhu W, Sugano N, Bock RM, McEntire B, Bal BS 2017. Bioactive silicon nitride: A new therapeutic material for osteoarthropathy. *Scientific Reports*, 7: 44848.
- Rahaman M, Xiao W 2017. Silicon nitride bioceramics in healthcare. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 1–12.
- Riley, FL 2000. Silicon Nitride and Related Materials. *Journal of the American Ceramic Society*, 83 [2]: 245–65.
- Silva CCG, Rigo, ECS, Marchi J, Bressiani AHA, Bressiani JC 2008. Hydroxyapatite coating on silicon nitride surfaces using the biomimetic method. *Materials Research*, 11(1): 47–50.
- Shu Q, Yanfei W, Jiangling L, Yang L, Pengfei L, Kuo-Chih C 2015. Effect of Na<sub>2</sub>O on dissolution rate of alumina in CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub> slag. *ISIJ International*, 55: 2297–2303.

## 3D yazıcılar ve gıda uygulamaları

Emin Yılmaz\*, Selçuk Ok

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: eyilmaz@comu.edu.tr

### Özet

3 boyutlu (3D) yazıcı teknolojisi, materyallerin katman katman birleştirilmesiyle katı formdaki kompleks yapıların oluşturulduğu, son yıllarda oldukça ilgi görmeye başlayan bir üretim teknolojisidir. 3D yazıcılar ilk olarak, seramik, metal, polimer gibi maddeler kullanılarak 3 boyutlu kompleks yapıların tek aşamada oluşturulması için icat edilmiştir. Gıda sektöründe ise amaç üretim sürecini tek basamağa indirmek değildir. 3D yazıcı teknolojisinin gıda sektörüne adapte edilmesindeki asıl amaç kompleks geometride, belli tekstürde ve belirli bir amaca uygun besinsel içerikte, istenilen tat, koku ve renkte 3 boyutlu yapıların oluşturulmasıdır. 3D gıda yazıcıları ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, ilk yıllarda, daha çok yeni 3D gıda yazıcı sistemlerinin geliştirilmesi ve gıdaların 3D yazıcılarda işlenebilmesi için uygun formülasyonların belirlenmesine odaklanıldığı görülmektedir. Son yıllarda, belirli bir ihtiyaca uygun içerik ve yapıda gıda üretmek için 3D yazıcılar kullanılan veya alternatif hammaddeler ve tekniklerden yararlanılarak yeni gıdalar üretilirken 3D yazıcılardan yararlanılan spesifik çalışmalar da ortaya çıkmaya başlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** 3D yazıcılar, gıda uygulamaları, 3D gıda yapıları, bireyselleştirilmiş tasarım

### 3D printers and food applications

#### Abstract

3D printing is a production technology in which complex structures of solids have been formed through the deposition of materials layer by layer and this technology has become very popular in recent years. 3D printers were first invented to create 3D complex structures in one step by using materials such as ceramics, metals and polymers. In the food sector, the aim is not to reduce the production process to a single step. The main purpose of adapting 3D printing technology to food sector is to produce 3D food structures in desired geometry, specific textures and nutritional content in a certain purpose, in desired taste, aroma and color. When the studies on 3D food printing are examined, it is observed that, in the early years, the focus is on the development of new 3D food printer systems and the determination of suitable formulations for processing of food in 3D printers. In recent years, specific studies, in which 3D printers are used to produce new food in desired textures and nutritional content for certain purpose or to produce food by using alternative raw materials and techniques, have started to emerge.

**Keywords:** 3D printers, food applications, 3D food structures, personalized design

### GİRİŞ

Yaşlı, çocuk ve sporcular gibi özel insanların belli ihtiyaçlarını karşılamak için gıdaların tasarlanmasına olan ihtiyaç, bileşenlerin işlenebildiği ve fiziksel ve kimyasal yapıların oluşturulduğu yeni teknolojilere olan ihtiyacı ortaya çıkarmıştır. Bu teknolojilerden biri de materyallerin katman katman birleştirilmesiyle katı formdaki kompleks yapıların oluşturulduğu 3 boyutlu (3D) yazıcılardır (Godoi ve ark., 2016, Wegrzyn ve ark., 2012).

3D yazıcıların çoğu uygulaması gıda sektörü dışındadır. 3D yazıcılar aslında seramik, metal, polimer gibi maddelerin işlenerek 3 boyutlu kompleks yapıların tek aşamada oluşturulması için icat edilmiştir. Gıda sektöründe ise amaç üretim sürecini tek basamağa indirmek değildir. 3D yazıcı teknolojisinin gıda sektörüne adapte edilmesindeki amaç kompleks geometride, belli tekstürde ve belirli bir amaca uygun besinsel içerikte, istenilen tat, koku ve renkte 3 boyutlu yapıların oluşturulmasıdır. Bu teknoloji “Bireyselleştirilmiş Tasarım” gibi genel ifadeyle özetlenebilmektedir (Godoi ve ark., 2016, Wegrzyn ve ark., 2012).

Gıda sektöründe, gıda yapımında kullanılabilecek ilk 3D yazıcı Cornell Üniversitesi araştırmacıları tarafından üretilen Fab@Home isimli açık kaynaklı, sıvı formdaki gıdalar için uygun olan 3D yazıcıdır. Daha sonraki dönemlerde ise hem yeni 3D yazıcıların geliştirilmesi hem de bunların gıda uygulamalarına adapte edilmesi yönünde birçok çalışma yapılmıştır (Godoi ve ark., 2016).



### 3D ÜRETİM TEKNOLOJİLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİPLERİ

3D üretim teknolojisinde 3 boyutlu yapı kesitler halinde alt kısmından başlayarak katman katman üretilir ve üretim sırasında veya daha sonraki bir aşamada bu katmanlar bir araya getirilir. Kullanılan materyale bağlı olarak farklı 3D basım teknikleri kullanılmaktadır. Sıvı bazlı (akışkan) materyallerin 3D yazıcı ile işlenmesinde ekstrüzyon ve inkjet teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikte ekstrüzyon nozzle'ı veya püskürtmeli bir başlık ile katman katman istenilen şekle göre bir tortu/birikinti oluşturulur. Gerekli tüm materyaller tek bir akışla gelebildiği gibi, iki veya daha fazla akışla materyaller bir araya gelip karışarak aktif yapıyı oluşturabilir. Toz bazlı materyaller işlenirken katmanların birbirlerine bağlanmasında bir ısı kaynağı (lazer veya sıcak hava) veya partikül bağlayıcı kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinin işlenmesinde ise bioprinting denilen teknikten yararlanılmaktadır (Godoi ve ark., 2016, Wegrzyn ve ark., 2012).

#### Ekstrüzyon İşlemi

Bu teknik önceleri plastik materyaller için kullanılırken son yıllarda gıda uygulamalarına da adapte edilmiştir. Bu teknikte hareketli nozzle sıcak-erimiş haldeki polimeri soğumuş veya soğumakta olan bir önceki katmanın üzerine ekstrüde etmektedir. Önceleri plastikler için kullanılan bu teknik artık gıdalar için de kullanılmaktadır. Ekstrüzyon işleminde akışkan haldeki gıda silindirik yapı (ekstrüder) içine doldurulur. Hidrolik pistonlar ile bu akışkan gıda nozzle'dan dışarı itilir. Daha önceden belirlenen 3D modele göre silindirin hareket eder ve peş peşe gelen katmanlar oluşturulur. Ekstrüzyon işleminde kullanılan materyale bağlı olarak katmanların birbirine yapışması materyalin reolojik özelliğiyle, soğutma sonucu katılma ile veya hidrojel oluşumu ile sağlanır (Godoi ve ark., 2016, Wegrzyn ve ark., 2012).

#### Akışkan (Yumuşak) Materyallerin Ekstrüzyonu

Bu teknikte hamur, et hamuru ve yumuşak yapıdaki peynir gibi ekstrüde edilebilir ve kendi yapısını koruyan katmanlar oluşturabilen ürünlerle 3D yapılar oluşturulur. Bu teknikte materyalin viskozitesi ekstrüzyona izin verecek kadar düşük, üretim sonrası kendi yapısını destekleyecek kadar da yüksek olmalıdır. İstenilen reolojik özellikleri sağlamak için reolojik düzenleyiciler ve çeşitli katkı maddeleri kullanılabilir. Çeşitli çalışmalarda bu teknik kullanılarak kek, kurabiye, makarna, pizza, et püresinden burger gibi ürünler üretilmiştir (Godoi ve ark., 2016).

#### Erime İle Ekstrüzyon

Erime ile ekstrüzyon özellikle 3D çikolata üretimi için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte materyal erime noktasının çok az üzerine ısıtılır, böylece ekstrüzyon sonrası materyal hemen katı formuna döner ve bir sonraki katman için hazır hale gelir. Kendi yapısını koruyan katmanların üretildiği çikolata formülasyonunun bulunması kakao yağının gösterdiği kompleks kristalizasyon davranışından dolayı en önemli sorundur. Çikolata için en iyi erime, tekstür ve raf ömrü özellikleri için doğru polimorfik formun üretilmesi çok önemlidir. 3D çikolata üretimi için araştırmacılar tarafından bu tekniğin kullanıldığı çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Düzgün bir 3D çikolata yapısının oluşması için önemli faktörlerin nozzle çapı, nozzle'ın üretim zeminine uzaklığı ve eksen hareketleri olduğu belirtilmiştir (Godoi ve ark., 2016, Sun ve ark., 2015).

#### Hidrojel Oluşturan Ekstrüzyon

Hidrojel oluşturan materyallerin ekstrüzyonunda materyalin reolojik özellikleri ve jel oluşum mekanizması oldukça önemlidir. İlk başta ekstrüde edilecek çözelti viskoelastik yapıda olmalı, daha sonra ise bir sonraki tabaka ekstrüde edilmeden önce kendi yapısını destekleyen bir jele dönüşmelidir. Hidrojel oluşum mekanizması 3 kategoriye ayrılmaktadır; kimyasal çapraz bağlanma, iyonotropik çapraz bağlanma, kompleks koerservat oluşumu. Kimyasal çapraz bağlanma yöntemi reaktiflerin çoğunun zararlı olması sebebiyle gıdalarda tercih edilmez. İyonotropik bağlanma özellikle mikroenkapsülasyon olmak üzere gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin aljinat kalsiyum iyonlarının varlığında çapraz bağlanma yaparak, iyonotropik jel oluşur. Polianyon ve polikasyonlardan birinin diğerine bağlanmasıyla da kompleks koerservat jel oluşur. Hidrokolloidler de diğer gıda bileşenleriyle birlikte jel oluşumunda kullanılabilir (Godoi ve ark., 2016).

#### Püskürtmeli (İnkjet) Yazıcılar

Püskürtmeli yazıcı teknolojisinde nozzle'dan damlacıklar halinde çıkan materyal istenilen noktada biriktirilerek 3D yapılar oluşturulur. Püskürtmeli yazıcılarda genelde termal ve piezoelectric (basınçsal elektrik) başlıklar kullanılır. Termal püskürtmeli yazıcılarda yazıcı başlığı elektrikle ısıtılarak oluşturulan basınç (darbe) nozzle'dan damlacığın itilmesini sağlar. Piezoelectric başlıklı yazıcılarda ise yazıcı başlığının

içinde piezoelectric kristali bulunur ve bu kristal ses dalgaları oluşturarak materyalin damlacıklar halinde ayrılmasını sağlar. Bu yazıcılar düşük viskoziteli ürünleri işleyebilmektedir, bu nedenle kompleks gıda yapılarının oluşturulması zordur. Çikolata, sıvı hamur, reçel gibi ürünler işlenebilir (Godoi ve ark., 2016, Sun ve ark., 2015).

### **Toz Bağlama Teknolojisi**

Gıda uygulamalarında sıklıkla karşılaşılan bir tekniktir. Selective laser sintering (SLS) (Lazer ile bağlama), selective hot air sintering and melting (SHASAM) (Sıcak hava ile bağlama) ve liquid binding (sıvı ile bağlama) olmak üzere 3 kategoride incelenebilmektedir. SLS ve SHASAM tekniğinde toz katmanları ısı kaynağı olarak kullanılan infrared lazer ve sıcak hava ile bir araya getirilip bağlanmaktadır. Sıvı ile bağlama tekniğinde ise faz değişimi olmamakta, toz tabakası üzerine dökülen sıvı bağlayıcılar ile tozlar bir araya getirilip bağlanmaktadır. Toz bağlama teknolojisi bağlanmadan kalan tozların ortamdan uzaklaştırıldığı ek bir basamak gerektirmektedir (Godoi ve ark., 2016, Wegrzyn ve ark., 2012).

### **Selective Laser Sintering (Lazer ile Bağlama) (SLS)**

SLS teknolojisi daha çok metal tozlarını işlemede kullanılsa da gıdalarda kullanıma da adapte edilmiştir. SLS tekniğinde toz partikülleri birbirine bağlamak, yapıştırmak, için güç kaynağı olarak lazer kullanılır. Lazer daha önceden belirlenen modele göre belirli bölgede toz partikülleri tarayarak bu partikülleri birbirine bağlar, birleştirir. Daha sonra yeni bir toz partikül tabakası üste serilir ve istenilen model elde edilene kadar bu işlem devam eder. 2 boyutlu olarak elde edilen her bir katman birbirini kesecek, bağlantı oluşturacak şekilde basılır, katmanlar bağlantı noktalarından birleşerek 3 boyutlu yapıyı oluşturur. Gıdalarda bu teknikle tozların birbirine bağlanması gıda içeriklerindeki yağ, şeker gibi maddelerin erimesi sonucu ortaya çıkar. Materyalin erimesi hem tozları, hem de bir önceki tabakayla yeni oluşan tabakayı birbirine bağlar (Godoi ve ark., 2016, Sun ve ark., 2015).

Materyalin lazer absorpsiyonunun lazer dalga boyuna bağlı olması ve tozların bir araya gelmesinde lazer enerji yoğunluğunun etkisinden dolayı uygun lazer seçimi tozların birleştirilmesi ve 3 boyutlu yapının oluşturulmasında oldukça önemlidir (Godoi ve ark., 2016).

### **Liquid Binding (Sıvı ile Bağlama) (LB)**

Sıvı ile bağlama tekniğinde, tozları birbirine bağlayan sıvı madde yazıcı başlığından toz tabakası üzerine önceden belirlenen modele göre damlatılır. Sıvı bağlayıcılar hem tozları birbirine bağlar, hem de bir önceki tabakayla yeni oluşan tabakayı bağlantı noktalarından birbirine bağlar. Sıvı bağlayıcılar su, süt, alkol, gam içeren çözelti, nişasta çözeltisi gibi sıvı veya sıvı çözelti olabilir. Sıvı bağlayıcıların toz partikülleri bağlanması çözünme-bağlanma veya partikül yüzeyinde çapraz bağlama oluşturarak gerçekleşir (Godoi ve ark., 2016, Sun ve ark., 2015).

### **Selective Hot Air Sintering and Melting (Sıcak Hava ile Bağlama) (SHASAM)**

SLS teknolojisine çok benzer bir teknolojidir. Bu teknikte sıcak hava düşük hızda dar bir aralıktan geçirilir ve toz partikülleri bir araya getirilir. İlk başta ince tabaka halinde toz partiküller yayılır daha sonra önceden belirlenen modele göre sıcak hava ile partiküller birleştirilir daha sonra yeni toz tabakası yayılır ve işlem istenen 3D model oluşana kadar devam eder. SLS tekniğinde olduğu gibi bu teknikte de iki boyutlu olarak basılan her bir tabaka birbirini kesecek, bağlantı oluşturacak şekilde basılır, katmanlar birleşerek 3 boyutlu yapıyı oluşturur (Godoi ve ark., 2016, Sun ve ark., 2015).

### **Bio-printing (Bio-Basım)**

Bio-printing doku(et) oluşturmada kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte canlı hücre kültürleri ve biyolojik materyaller tabaka tabaka yüzeyde biriktirilir. Bu amaçla daha çok püskürtmeli yazıcılar, mikroekstrüzyon yazıcıları ve lazer destekli yazıcılar kullanılmaktadır. Etik nedenlerden dolayı et yemeyen topluluklarda kabul görmesi beklenen bir tekniktir. Gelecekte, dini kısıtlamalardan dolayı et yemeyen veya güvenli, sağlıklı ete ulaşımı zor olan toplumlar için oldukça önemli bir teknoloji olması beklenmektedir (Godoi ve ark., 2016).

Bir çalışmada 3D yazıcı teknolojisi ile yenilebilir domuz eti üretilmiştir. Bu çalışmada çok hücreli silindirik yapılar yapıtaşı olarak kullanılmıştır. Bu yapılar kendiliğinden yapışkan bir özelliğe sahiptir. Taze olarak hazırlanmış çok hücreli bu agregatlar yazıcı nozzle'ı vasıtasıyla yenilebilir destek yapısı(agaroz çubukları)

içine damlalar halinde biriktirilmiştir. Daha sonra oluşturulan bu model olgunlaşması için bioreaktörlere bırakılmıştır (Godoi ve ark., 2016).

### 3D YAZICILARIN GIDA UYGULAMALARI İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Literatür incelendiğinde, 3D gıda yazıcıları ile ilgili çalışmaların daha çok yeni 3D yazıcı sistemlerinin geliştirilmesi, gıdaların 3D yazıcılara adaptasyonu ve 3D yazıcılarda işlemeye uygun formülasyonların geliştirilmesi üzerine odaklandığı görülmektedir. Son yıllarda bu ana çalışma konularından daha farklı çalışmalara da sıkça rastlanmaktadır. Bu bölümde 3D yazıcıların gıda uygulamaları ile ilgili çalışmalardan bazı örnekler anlatılacaktır.

Cornell Üniversitesinden araştırmacılar akışkan gıdalarda kullanıma uygun, açık kaynaklı Fab@Home isimli gıda yazıcı sistemini geliştirmişlerdir. 3D yazıcıların gıda uygulamalarına adaptasyonu için geliştirilen ilk sistem olan Fab@Home ekstrüzyon tekniğini kullanmaktadır (Malone ve Lipson, 2007). Grood ve Grood (2011) ise, çikolata, sıvı hamur, peynir gibi nispeten sıvı gıdaların damla damla üst üste biriktirilmesiyle 3 boyutlu yapıların oluşturulduğu bir tür püskürtmeli 3D yazıcı geliştirmiş ve patent almışlardır. Foodjet (2019) isimli firma ise püskürtmeli gıda yazıcı sistemini bir marka haline getirmiş ve pnömatik membran nozzle-jet sistemini kullanarak, hareketli nesnelere üzerinde ince bir tabaka halinde şekiller oluşturmayı başarmışlardır. CandyFab (2019) ise, Evil Mad Scientist Laboratuvarlarında, 2006-2009 yılları arasında yapılan çalışmalarla geliştirilen, şeker bazlı gıdaların ısı ile eritilip bağlanması tekniğine dayanan bir 3D gıda yazıcı sistemidir. Diaz ve ark. (2017), Powder Bed Printing ismini verdikleri bir sıvı ile bağlama metodu geliştirmişlerdir. Bu üretim metodunda, gıda bazlı sıvı bağlayıcı suda çözünür protein ve/veya hidrokolloidten oluşan toz yatağına püskürtülmektedir.

Lipton ve ark. (2010) yaptıkları çalışma ile kurabiye ve et pürelerinin formülasyonlarını modifiye ederek bu malzemelerden elde edilen 3 boyutlu yapıların şekillerinin pişirme boyunca aynı kalmalarını sağlamışlardır. Yapılan çalışmada 3D yazıcı sistemi olarak Fab@Home kullanılmıştır. Kurabiye hamurunda, şeker, yağ, yumurta sarısı ve un gibi bileşenlerin miktarları modifiye edilmiş ve pişirme sırasında, hamurun stabilitesini korumasını sağlayan uygun formülasyon geliştirilmiştir. Hindi eti püresi içinse katkı maddesi olarak transglutaminaz kullanılmış ve pişirme sırasında genel olarak şeklin korunduğu görülmüştür.

Başka bir çalışmada (Periard ve ark., 2007), yine Fab@Home gıda yazıcı sistemiyle kek hamuru, işlenmiş peynir, çikolata ve fıstık ezmesi gibi gıdalar kullanılarak 3 boyutlu yapılar oluşturulmuştur.

Bir çalışmada (Lille ve ark., 2018), sağlıklı ve özelleştirilmiş ürünler elde etmek amacıyla, ekstrüzyona dayalı 3D yazıcı teknolojisinin protein, nişasta ve lif bakımından zengin malzemelerden yapılan gıda ezmeleri için uygulanabilirliği denetlenmiştir. Bu amaçla nişasta, selüloz nanofiber, süt tozu, yulaf ve faba fasulyesi proteini bazlı ezmelerin ve bunların karışımlarının basılabilirliği, basılan desenin düzgünlüğü ve stabilitesinin, ekstrüzyon kolaylığı ve düzgünlüğü gibi parametreler incelenerek değerlendirilmiştir. Basım için nScrypt 3D basım sistemi kullanılmıştır. Sonuçlara göre, en düzgün ve stabil şekil, yarım yağlı süt tozu bazlı ezme ile elde edilmiştir. %10 nişasta + %15 yağsız süt tozu, %30 çavdar kepeği, % 35 yulaf proteini ve % 45 faba fasulyesi proteini içeren ezmelerin de başarılı baskı sonuçları verdiği görülmüştür. Reolojik ölçümler, baskıdan sonra şekil stabilitesinin ezmenin yield stresine bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Fırında kurutma işleminin en çok başarılı olduğu numunelerin başlangıç katı madde içeriği yüksek olanlar olduğu (<% 50) görülmüştür.

Zhang ve ark. (2018) yaptıkları çalışma ile probiyotik içeren tahıl bazlı gıdaların 3D yazıcı kullanılarak üretilebilirliğini araştırmıştır. Gıdaların basılmasında ekstrüzyon tekniğini baz alan ByFlow 3D gıda yazıcısı kullanılmıştır. Geometrik dizayn için Slic3r yazılımı kullanılmıştır. Probiyotik olarak Lactobacillus plantarum WCFS1 kullanılmıştır. Farklı su miktarı, buğday unu tipi ve kalsiyum kazeinat miktarına sahip hamur formülasyonları basılabilirlik açısından değerlendirilmiştir. Hamur içeriğinin, basılabilirlikle ilişkili olan reolojik özellikleri ve mikroyapıyı etkilediği söylenmektedir. Daha yüksek viskoelastik modülü, daha yüksek kayıp faktörü, daha yüksek viskozite ve yield stresine sahip hamur formülasyonunun, hem iyi baskı sonuçları hem de baskı sonrasında yeterli stabilite gösterdiği belirtilmiştir. Probiyotik içeren hamurlar iki farklı alan/yüzey oranına sahip yapıda basılmıştır. Bunlar 9,20 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> ile bal peteği şekli ve 7,25 cm<sup>2</sup>/cm<sup>3</sup> ile konsentrik şekildedir. Basılan yapılar 145, 175 ve 205 °C sıcaklıklarda pişirilmiştir. Eşit sürelerde pişirilen ürünlerde probiyotiklerin varlığını sürdürmesi bakımından iki yapı arasında fark görülmemiştir. Ancak, alan/hacim oranındaki artışın pişirme işlemini hızlandırdığı görülmüştür. Bu nedenle, pişirme son noktası olarak %6 nem oranına kadar düşüş baz alındığında (145 °C'de), "bal peteği" yapısındaki canlı probiyotik sayısının 106 CFU/g'ı aştığı ve bu miktarın konsentrik yapıdaki probiyotik sayısından 2 log daha fazla olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada (Derossi ve ark., 2018), 3-10 yaş arası çocuklar için gerekli olan %5-10 enerji, kalsiyum, demir ve D vitamini içeren meyve bazlı atıştırılmalıklar 3D yazıcı sistemiyle üretilmeye çalışılmış ve basım parametreleri olan basım hızı ve akış seviyesinin basılabilirliğe etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, muz, beyaz fasulye, yağsız süt tozu, limon suyu, kuru mantar, askorbik asit ve pektin çözeltisi basıma uygun oranlarda karıştırılmıştır. 3D basım için Clay ekstrüder kitiyle donatılmış Delta 2040 isimli 3D yazıcı sistemi kullanılmıştır. Boyutsal ve mikro-yapısal özelliklerin materyalin akışından önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür. Düşük akışta baskı yapıldığında, atıştırılmalıkların iç yapısının düzensiz ve gözeneklilik oranının yüksek olduğu görülmüştür. Akış hızı arttıkça, akış hatları birbirine yapıştığı için iç yapının kalınlığı artmıştır. Bunun sonucunda gözeneklilik azalmış, yapısal boyutlar ve hacim artmıştır. Ağırlık artış hızının hem baskı hızından hem de akış seviyesinden etkilendiği ve % 130'luk bir akışla ve 70mm/s'lik bir baskı hızında maksimum 0.00362 g/s hıza ulaşıldığı söylenmektedir.

Yang ve ark., (2018a) limon suyu jel sistemini kullanarak 3D yazıcı yardımıyla yeni gıda yapıları oluşturmaya çalışmışlardır. Çalışmada, jel sistemini oluşturmak için patates nişastası kullanılmış, farklı nişasta oranlarının (10, 12,5, 15, 17,5 ve 20g/100g) jelin reolojik ve mekanik özelliklerine etkisi incelenmiş ve uygun basım için en iyi nişasta oranı belirlenmeye çalışılmıştır. 15 ve 17,5 g/100g nişasta oranının daha iyi bir ağız hissi (sertlik, esneklik, yapışkanlık) oluşturduğu görülmüştür. Yüksek nişasta oranlarında yüksek viskozitede, katı davranışlı ve zayıf akışkanlığa sahip, basılmaya uygun olmayan materyal elde edilirken, düşük nişasta oranlarında düşük viskozitede, sıvı davranışlı, daha akışkan, ekstrüzyon kontrolünün zor olduğu bir materyal edilmiştir. Sonuç olarak en uygun nişasta oranı 15g/100g olarak belirlenmiştir. Çalışmada, ayrıca, basım parametrelerinin (nozzle yüksekliği, nozzle çapı, ekstrüzyon hızı ve nozzle hareket hızı) basılan ürünlerin kalitesi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. 1 mm nozzle çapı baz alındığında, 24 mm<sup>3</sup>/s ekstrüzyon hızı ve 30 mm/s nozzle hareket hızı, düzgün görüntüde, daha pürüzsüz yüzeyde, daha az kusurlu, daha az bozulmuş ve hedef geometriye uygun 3D yapıların basılması için en uygun parametreler olarak belirlenmiştir. Uygun parametrelerin belirlenmesinde çizgi testi ve silindir testi (silindirik şekil değerlendirme için uygun bir şekil olarak görülmüştür) uygulanmış, belirlenen optimum parametrelerle daha kompleks şekiller basılmıştır.

Gıdaların basılabilir forma dönüştürülmesinde kıvam artırıcıların kullanılması yaygın bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada (Azam ve ark., 2018), gam arabik, guar gam, karragenan ve ksantan gam gibi farklı gam çeşitleri kullanılarak D vitamini ile zenginleştirilmiş portakal konsantresi-buğday nişastası karışımı hazırlanmış ve kullanılan gamların reolojik özelliklere ve 3D basım işlemine etkileri incelenmiştir. 3D basım işlemi için, SHINNOVE-D1 isimli, ekstrüzyon bazlı 3D yazıcı sistemi kullanılmıştır. Gam eklenmesi, karışımın görünür viskozitesinde, depolama modülünde (G') ve kayıp modülünde (G'') bir artışa neden olurken, sadece gam arabik görünür viskoziteyi ve depolama modülünü azaltmıştır. Basılabilirlik ve mekanik stabilitenin değerlendirilmesinde, üçgen, kare ve silindir şeklinde ve belli ölçülerde basılmış 3 boyutlu yapıların bozulma oranı baz alınmıştır. Nesnelere basıldıktan 1 saat sonra boyutta meydana gelen değişiklikler dijital cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Karragenan içeren karışım kullanılarak basılan nesnelere hedef geometriyle maksimum uygunlukta olduğu ve sahip olduğu uygun G' değerinden dolayı iyi taşıma kapasitesine sahip olduğu, bu nedenle zamanla oluşan çökmenin önlediği görülmüştür. Aynı zamanda, karragenan kullanılarak basılan nesnelere pürüzsüz bir yüzeye, düzgün bir mikroyapıya ve en iyi çiğneme özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, karragenan eklenmiş karışım en iyi 3D gıda basım özelliklerini göstermiştir.

Yang ve ark. (2018b), hamur içeriğindeki değişikliklerin 3D yazıcı ile basılan nesnelere üzerindeki etkisini incelemişlerdir. 3D basım işleminde PORIMY marka 3D yazıcı sistemi kullanılmıştır. Daha iyi şekle sahip nesnelere elde etmek için, daha yüksek ekstrüde edilebilirlik, jel kuvveti, elastikiyet ve daha düşük esneklik gibi fiziksel özelliklere sahip psödoplastik bir jele ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Sakkaroz, tereyağı ve un miktarları arttıkça, jel kuvvetinin, elastikiyetin ve viskozitenin arttığı, sünme özelliğinin azaldığı görülmüş ve tüm bu özelliklerin ürün şeklinin oluşmasını ve korunmasını sağladığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, sakkaroz, tereyağı ve un miktarları belirli bir eşik değerini aştığında, malzemenin basılabilirliğinin bozulduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, 3D yazıcı ile basılmış en iyi hamur şekli 100 gramında 29 g su, 6,6 g sakkaroz, 6 g tereyağı, 48 g un ve 10,4 g yumurta içeren formülasyonla elde edilmiştir.

3D yazıcılar kullanılarak protein bazlı ürünlerin elde edildiği çeşitli çalışmalar da vardır. Liu ve ark. (2019), yumurta akı proteini, jelatin, mısır nişastası ve sakkaroz karışımı kullanarak 3 boyutlu yapılar üretmiş ve yumurta akı protein miktarının, karışımın reolojik, tekstürel ve mikroyapısal özellikleri ve basılabilirlik üzerine etkisi incelenmiştir. Başka bir çalışmada (Liu ve ark., 2018), 3D yazıcı sistemi ile süt proteini bazlı yapılar üretilmeye çalışılmış ve peynir altı suyu proteini izolatu konsantrasyonunun, süt protein konsantrasyonunun baskı performansı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Chen ve ark. (2019), 3D yazıcı kullanarak soya proteini izolatu

bazlı ürünler elde etmeye çalışmış, soya protein izolatu, sodyum aljinat ve jelatin ile oluşturulan karışımlarının reolojik özellikleri, basılabilirliği ve tekstürü incelenmiştir.

Forgacs ve ark. (2014) yaptıkları çalışma ile 3D yazıcı teknolojilerinden yararlanarak yenilebilir domuz eti üretmişlerdir. Bu çalışmada, 3 hücre tipinden (kas hücreleri, fibroblastlar, adipositler) oluşan uygun biyomürekkep karışımı hazırlanmış, bu karışım yapıtaşı olarak kullanılmıştır. Bu yapılar kendiliğinden yapışkan bir özelliğe sahiptir. Taze olarak hazırlanmış hücresel bu agregatlar yazıcı başlığı vasıtasıyla yenilebilir destek yapısı (agarose çubukları) içine damlalar halinde biriktirilmiştir. Daha sonra oluşturulan bu model olgunlaşması için bioreaktörlere bırakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda laboratuvar ortamında oluşturulan bu yenilebilir etlerin etik nedenlerden, dini kısıtlamalardan dolayı et yemeyen topluluklarda kabul görmesi beklenmekte, özellikle güvenli, sağlıklı ete ulaşımı zor olan toplumlar için önemli bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, hayvan yetiştiriciliğinin olumsuz yanlarından olan hava ve su kirliliğine de çözüm olacağı düşünülmektedir.

Soares ve ark. (2011) tarafından yürütülen “insects au gratin” isimli proje, böcek tüketmenin yeni yollarını arayan ve böceklerin besleyici ve çevresel yönlerini insan gıdası olarak değerlendiren bir çalışmadır. Bu çalışmada böcek tozları yağ, krem peynir gibi gıdalarla veya su, jelleştirici ajan ve aroma vericilerden oluşan yapıyla karıştırılıp, 3D yazıcı ile kompleks yapılar üretilmiştir. Başka bir çalışmada (Severini ve ark., 2018), buğday unundan hazırlanan hamur öğütülmüş un kurdu ile zenginleştirilmiş ve bu hamurdan 3D yazıcı ile atıştırmalıklar üretilmiştir. Temel mikroyapısal özellikler, genel kalite ve beslenme özellikleri, formülasyonun, pişirme zamanı ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. 200°C sıcaklıkta 22 dakika pişirme istenilen ürün yapısının oluşturulması için optimum şartlar olarak belirlenmiştir. %10 ve %20 oranında böceklerle zenginleştirilmiş atıştırmalıkların, toplam esansiyel amino asit içeriğinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Bir çalışmada (Kouzani ve ark., 2017), disfaji (yutkunma zorluğu) rahatsızlığına sahip insanlar için ton balığı, pancar, bal kabağı gibi gıdalar püre haline getirilmiş, daha sonra, püre halindeki gıdalar 3D yazıcılar yardımıyla gerçek görüntüsünde, göze hoş gelecek şekilde basılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Azam RSM, Zhang M, Bhandari B, Yang C 2018. Effect of different gums on features of 3D printed object based on vitamin-D enriched orange concentrate. *Food Biophysics*, 13: 250-262.
- CandyFab 2009. CandyFab printing systems. Available at: <https://candyfab.org/> [Erişim 29.05.2019].
- Chen J, Mu T, Goffin D, Blecker C, Richard G, Richel A, Haubruge E 2019. Application of soy protein isolate and hydrocolloids based mixtures as promising food material in 3D food printing. *Journal of Food Engineering*. (Accepted Manuscript).
- Derossi A, Caporizzi R, Azzollini D, Severini C 2018. Application of 3d printing for customized food. A case on the development of a fruit-based snack for children. *Journal of Food Engineering*, 220: 65-75.
- Diaz JV, Noort MWJ, Van Bommel KJC 2017. Method for the production of an edible object by powder bed (3d) printing and food products obtainable therewith. Google Patents.
- Godoi FC, Prakash S, Bhandari BR 2016. 3D printing technologies applied for food design: status and prospects. *Journal of Food Engineering*, 179: 44-54.
- Grood JPW, Grood PJ 2011. Method and device for dispensing a liquid. Google Patents.
- FoodJet 2019. FoodJet printing systems. Available at: <https://www.foodjet.com/> [29.05.2019]
- Forgacs G, Marga F, Jakab KR 2014. Engineered comestible meat. Google Patents.
- Kouzani AZ, Adams S, Whyte DJ, Oliver R, Hemsley B, Palmer S, Balandin S 2017. 3D printing of food for people with swallowing difficulties. *DesTech Conference Proceedings, The International Conference on Design and Technology*, 23-29.
- Lille M, Nurmela A, Nordlund E, Metsa-Kortelainen S, Sozer N 2018. Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *Journal of Food Engineering*, 220: 20-27.
- Lipton J, Arnold D, Nigl F, Lopez N, Cohen D, Noren N, Lipson H 2010. Multimaterial food printing with complex internal structure suitable for conventional post-processing. *21st Annual International Solid Freeform Fabrication Symposium - an Additive Manufacturing Conference, SFF 2010*, 809-815.

- Liu Y, Liu D, Wei G, Ma Y, Bhandari B 2018. 3D printed milk protein food simulant: improving the printing performance of milk protein concentration by incorporating whey protein isolate. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 49: 116-126.
- Liu L, Meng Y, Dai X, Chen K, Zhu Y 2019. 3D printing complex egg white protein objects: properties and optimization. *Food and Bioprocess Technology*, 12: 267-279.
- Malone E, Lipson H 2007. Fab@Home: The personal desktop fabricator kit. *Rapid Prototyping Journal*, 13: 245-255.
- Periard D, Schaal N, Schaal M, Malone E, Lipson H 2007. Printing food. 18th Solid Freeform Fabrication Symposium, SFF 2007, 564-574.
- Severini C, Azzollini D, Albenzio M, Derossi A 2018. On printability, quality and nutritional properties of 3D printed cereal based snacks enriched with edible insects. *Food Research International*, 106: 666-676.
- Soares S, Kupfer P, Nicholls B, Spears K, Walters P, Southerland D 2011. Insects au gratin. Available at: <http://www.susanasoares.com> [29.05.2019].
- Sun J, Peng Z, Zhou W, Fuh JYH, Hong GS, Chiu A 2015. A review on 3D printing for customized food fabrication. *Procedia Manufacturing*, 1: 308-319.
- Wegrzyn TF, Golding M, Archer RH 2012. Food layered manufacture: A new process for constructing solid foods. *Trends in Food Science and Technology*, 27: 66-72.
- Yang F, Zhang M, Bhandari B, Liu Y 2018a. Investigation on lemon juice gel as food material for 3D printing and optimization of printing parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 87: 67-76.
- Yang F, Zhang M, Prakash S, Liu Y 2018b. Physical properties of 3D printed baking dough as affected by different compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 49: 202-210.
- Zhang L, Lou Y, Schutyser MAI 2018. 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. *Food Structure*, 18, 14-22

## İyonize radyasyon uygulanan NRK-52E hücre hattında vitamin c'nin apoptotik yolağa etkisi

Osman Yılmaz<sup>1\*</sup>, Sedat Çetin<sup>2</sup>, Veysel Yüksek<sup>3</sup>, Semiha Dede<sup>2</sup>, Taylan Tuğrul<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Van, Türkiye

<sup>2</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, Türkiye

<sup>3</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, Türkiye

<sup>4</sup> Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, Van, Türkiye

\*osman\_40\_5@hotmail.com

### Özet

Bu çalışmada, NRK-52E hücre serisinde, iyonize radyasyon ile indüklenen apoptotik yolda Vitamin C'nin olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. NRK-52E böbrek epitelyal hücreleri, %10 FBS, %1 L-Glutamin (2mM) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında çoğaltıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı. Çalışma grupları; Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 grup oluşturuldu. İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. 24 saat inkübe edilen hücrelerde total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak, RT-PZR ile hedef genlerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kontrol genine göre tüm gruplarda Kaspaz 3 ekspresyonu olmamıştır. Kaspaz 8'in İyonize radyasyon grubunda 1,5 kat, Vitamin C ve Vitamin C+İyonize Radyasyon gruplarında yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiştir. İyonize Radyasyon+Vitamin C grubunda ise yaklaşık ½ kat oranında azaldığı saptandı. Kaspaz 9 geninde ise, İyonize Radyasyon, İyonize Radyasyon+Vitamin C ve Vitamin C gruplarında önemli bir değişiklik tespit edilmedi. Bcl-2 genine bakıldığında, İyonize Radyasyon grubunda 3,5 kat, Vitamin C+İyonize Radyasyon grubunda, 2 kat artış gösterdiği belirlendi. İyonize Radyasyon+Vitamin C ve sadece Vitamin C gruplarında ise, herhangi bir değişiklik görülmedi. Sonuç olarak, verilen iyonize radyasyonun dozunun çalışılan apoptotik enzimleri etkilediği, fakat artış katsayılarının çok fazla olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte, Vitamin C'nin iyonize radyasyona bağlı gelişen apoptotik yolda koruyucu ve terapötik rolünün daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için, uygulanan iyonize radyasyon miktarı ve süresi artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Sözcükler:** Hücre kültürü, İyonize Radyasyon, Vitamin C

### The effect of vitamin c on apoptotic pathway in ionizing radiation-induced NRK-52E cell line

#### Abstract

In this study, it was aimed to investigate the possible protective effect of Vitamin C on the ionized radiation-induced apoptotic pathway in the NRK-52E cell line. The NRK-52E renal epithelial cells were proliferated in RPMI 1640 medium that contained 10% FBS, 1% L-Glutamine (2mM) and 1% Penicillin/Streptomycin. In the previous determined studies, the proliferation-enhancing concentration of Vitamin C (100 µM) was used. In this study, Control, Ionizing Radiation, Vitamin C, Ionizing Radiation + Vitamin C, Vitamin C + Ionizing Radiation, including 5 group was created. The ionizing Radiation groups were received 8 Gy ionizing radiation. Total RNA and cDNA isolation were performed in 24 hour incubated cells and expression levels of target genes were determined by RT-PCR. According to the control gene, Caspase 3 was not expressed in all groups. It was found that Caspase 8 increased 1.5 times in the Ionizing Radiation group and about 3 times increased in the Vitamin C and the Vitamin C + Ionizing Radiation groups. In the Ionizing Radiation + Vitamin C group was found about ½ times decreased. In the Caspase 9 gene, no significant changes were detected in the Ionizing Radiation, the Ionizing Radiation + Vitamin C and the Vitamin C groups. It was detected that Bcl-2 gene was increased 3,5 times in the Ionizing Radiation group and two times in the Vitamin C + Ionizing Radiation group. In the Ionizing Radiation + Vitamin C and the Vitamin C groups were not found a change. As a result, it was determined that the applied dose of ionized radiation effected the studied apoptotic enzymes, but the increase coefficients were not too high. However, we think that the amount and duration of ionized radiation should be increased in order to better understand the protective and therapeutic role of Vitamin C in the apoptotic pathway due to ionizing radiation.

**Keywords:** Cell Culture, Ionizing Radiation, Vitamin C

#### GİRİŞ

İyonize radyasyonun temel etki mekanizması, DNA'da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne neden olmasıdır. DNA'daki bu ölümcül hasarın oluşmasında direkt ve indirekt etki olmak üzere iki temel mekanizma vardır. Hasar, DNA molekülünün fırlatılmış bir elektron ile direkt iyonizasyonu sonucu meydana gelebilir.

Radyasyonun bu direkt iyonize etkisi hasarın bir bölümünden sorumludur. Asıl hasar yapan olaylar indirekt mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bilindiği gibi vücudumuzun % 80'nini su oluşturmaktadır. Radyoterapi alan hastalarda iyonize radyasyonun etkisine bağlı olarak su moleküllerinin parçalanması sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ölümcül DNA hasarına sebep olmaktadır (Taysi ve ark. 2008; Karslıoğlu ve ark, 2005). İyonize radyasyon sonucu serbest radikaller oluşmaktadır. Bu serbest radikaller yaşam için gereklidir. Serbest radikallerin üretimi ve detoksifikasyonu vücutta çok hassas bir denge ile kontrol edilmektedir. Bu moleküllerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı arasında denge bozulmadığı sürece organizma bundan etkilenmemektedir. Bu denge bozulduğunda, oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizma oksidatif strese maruz kalır. Bunun sonucunda, hücrel metabolizma işleyişi bozulur, hücrel yaşlanma, inflamatuvar hasarlar, oluşan moleküler yıkım ile birçoğu yaşamsal öneme sahip organlarda doku ve hücre hasarı meydana gelir (Halliwell, 1994., Ofluoğlu, 2007).

Vitaminler canlı organizmanın metabolik faaliyetlerinin normal seyrinde devam edebilmesi için oldukça önemli moleküllerdir. Bununla birlikte enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak görevleri olan vitaminler, spesifik hücrel fonksiyonların sürdürülmesi için de gereklidir (Gürdöl ve Ademoğlu, 2013; Ferrier, 2014).

Vitamin C (askorbik asit)' nin temel fonksiyonu, birkaç farklı reaksiyonda indirgeyici ajan olmasıdır. Bununla birlikte Askorbatın, enzimatik reaksiyonlarda elektron verici olarak direkt etki göstermesi, kolajenin prolin ve lizin kalıntılarının hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak bir role sahip olması, demir ve bakır içeren hidroksilasyon reaksiyonlarında spesifik rolünün olması, normal bağ dokularının bakımı gibi fonksiyonları bulunmaktadır, aynı zamanda yara iyileşmeleri için gereklidir. (Gürdöl ve Ademoğlu, 2013; Ferrier, 2014).

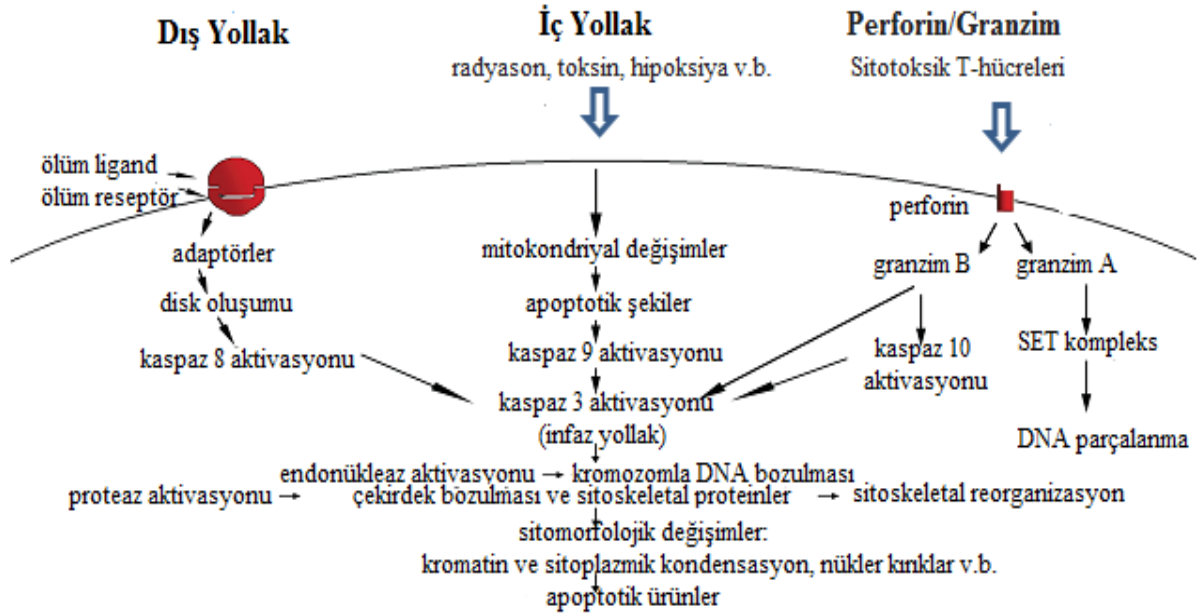
Vitamin C (askorbik asit) eksikliği, diş eti kanamaları, ağrı ve süngerimsi diş etleri, diş kayıpları, yara iyileşmesinde gecikme, hasas kan damarları, şişkin eklemeler, bitkinlik ve demir absorpsiyonun azalmasının sebep olduğu mikrositik anemi gibi semptomlarla karakterize bir hastalık olan skorbut hastalığı ile sonuçlanmaktadır. (Ferrier, 2014). Vitamin C, bitkilerde (çok yapraklı sebzeler, bezelye, yeşil fasulye, biber, domates, turunçgiller, muz gibi bitkiler) ve hayvansal dokularda (böbrek üstü bezi, karaciğer ve süt gibi hayvansal dokular) oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır.(Sözbilir Bayşu ve Bayşu, 2008).

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen Apoptozis ise, canlının kendi otonom mekanizması tarafından düzenlenen; yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerin enerji kullanılarak iz bırakmadan öldürülmesidir. Bu durum, organizmanın normal gelişimi sırasında meydana gelen fizyolojik hücrel bir süreçtir. Yunanca'da "ağaçların yapraklarını dökmesi" anlamına gelmektedir (Kaya ve ark., 2012).

Hücrenin apoptoz veya nekroza gidip gitmeyeceği uyarıcı derecesi ve/veya uyarıcı tipi ile belirlenir. Radyasyon, sıcaklık, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar, düşük dozlarda apoptozisi indükleyebilir. Fakat, buna benzer uyaranlar, yüksek dozlarda nekrozise sebep olabilir. (Kaya ve ark., 2012).

Apoptozis mekanizması (Şekil 1), oldukça kompleks ve karmaşık enerji bağımlı moleküler kaskat olaylarını içermektedir. Yapılan araştırmalar dış yolak (ekstrinsik) ve iç yolak (intrinsik) ya da mitokondriyal yol olarak iki ana apoptotik yolunun olduğunu, bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğu ve bir yolda rol alan moleküllerin diğer yoldakini etkilediğini göstermiştir. Ayrıca bu iki yola ilave olarak, T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümü içeren bir yol daha vardır (Kaya ve ark., 2012).





Şekil 1. Apoptozis yolları (Elmore, 2007)

Omurgalılarda apoptotik yolda etkili olan proteinler Kaspazlar olarak adlandırılırken; apoptozisi düzenleyici proteinler ise, Bcl-2 ailesi olarak tanımlanmaktadır (Kaya ve ark., 2012).

Bu çalışmada, NRK-52E hücre serisinde, iyonize radyasyon ile indüklenen apoptotik yolda Vitamin C'nin olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

#### MATERYAL METOT

Çalışmada NRK-52E rat böbrek epitelyal hücre hattı ( ATCC®CRL-1571™) kullanıldı.

Tablo 1. NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri.

Organizma	Sıçan
Doku	Böbrek epitelyal
Morfoloji	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
Yüzey tutulumu	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Besiyeri	DMEM high glukoz, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin
Besi yeri yenileme süresi	Haftada 2-3 defa
Pasaj metodu	0.25% tripsin, 0.02% EDTA
Ayırma oranı	1:3-1:4
Biyogüvenlik düzeyi	1

Hücreler *in vitro* koşullarda RPMI 1640 medyumda; %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatör ortamında haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak çoğaltıldı. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup> lik kültür flasklarına sayıları 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekimi yapıldı.

Çalışma grupları; Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Vitamin –C gruplarına daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı (Yüksek, 2017).

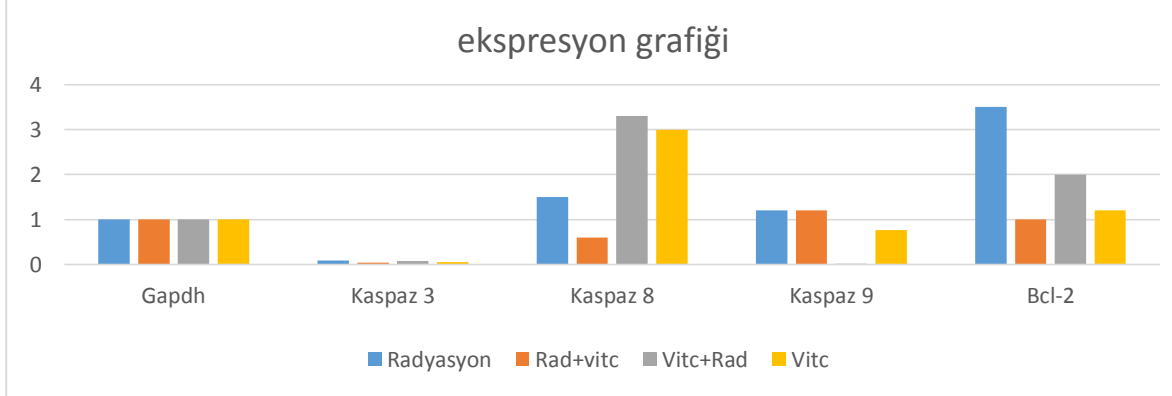
İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Işınlamalar, Cobalt-60 Teleterapi cihazında, gamma radyasyonu verilerek gerçekleştirildi. Hücreler flaskların tabanında bulunduğu için, build-up bölgesindeki doz düşüşünden dolayı 1 cmlik boluslar kullanıldı, flask içindeki sıvı dikkate alınarak ışın eşmerkezi uygun derinliğe yerleştirildi. Oluşturulan deney gruplarında 24 saat inkübe edilen hücrelerden total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak gerçek zamanlı PCR ile apoptotik genlerin (Bcl-2, Cas3, Cas8, Cas9) ekspresyon düzeyleri tespit edildi.

Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak Gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrarlı Gerçek Zamanlı PCR yapıldı ve bir CT (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi. Ekspresyon analizlerinde  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülasyonu kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonunun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

## BULGULAR

**Tablo 2.** Real Time - PCR sonuçları

	Radyasyon	Rad+vitc	Vitc+Rad	Vitc
GAPDH(Kontrol geni)	1	1	1	1
Kaspaz 3	0,09	0,04	0,08	0,05
Kaspaz 8	1,5	0,6	3,3	3
Kaspaz 9	1,2	1,2	0,02	0,76
Bcl-2	3,5	1	2	1,2



**Şekil 2.** Real Time - PCR sonuçları- Ekspresyon Grafiği

Yukarıdaki Tablo 2 ve Şekil 2'ye bakıldığında, kontrol genine (GAPDH) göre tüm gruplarda Kaspaz 3 ekspresyonunun olmaması tespit edilmiştir. Kaspaz 8'in İyonize radyasyon grubunda 1,5 kat, Vitamin C ve Vitamin C+İyonize Radyasyon gruplarında yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiştir. İyonize Radyasyon+Vitamin C grubunda ise yaklaşık 1/2 kat oranında azaldığı saptandı. Kaspaz 9 geninde ise, İyonize Radyasyon, İyonize Radyasyon+Vitamin C ve Vitamin C gruplarında kontrol genine göre neredeyse önemli bir değişiklik tespit edilmedi. Antiapoptotik gen olan Bcl-2 genine bakıldığında, İyonize Radyasyon grubunda 3,5 kat, Vitamin C+İyonize Radyasyon grubunda, 2 kat artış gösterdiği belirlendi. İyonize Radyasyon+Vitamin C ve sadece Vitamin C gruplarında ise, herhangi bir değişiklik görülmedi.

## TARTIŞMA

İyonize radyasyonun temel etki mekanizması, DNA'da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne neden olmasıdır. Bunun sonucunda, hücre metabolizması işleyişi bozulur, hücre yaşlanma, inflamatuvar hasarlar, oluşan moleküler yıkım ile birçoğu yaşamsal öneme sahip organlarda doku ve hücre hasarı meydana gelir (Halliwell, 1994; Ofluoğlu, 2007)

Apoptozis, düzenlenmiş hücre ölümlerinin bir aktivitesidir. Apoptozis yolları; Kaspaz ailesi aktivasyonu, nükleozomal DNA kırıkları, hücre ölüm miktarları ve kromatin kondensatı gibi bir seri biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler içermektedir (Güney ve ark., 2007). Bununla birlikte Antiapoptotik bir gen olan Bcl-2 geni ise, Apoptozu düzenleyici proteinlerdendir (Kaya ve ark., 2012).

Vitamin C antioksidan savunma sisteminde ve apoptozisde merkezi rol oynar (Chen ve ark., 2005; Serbecic ve Beutelspacher, 2005) Genel olarak, Vitamin C en önemli plazma antioksidanıdır. Bu yüzden Vitamin C in vitro antioksidan deneylerinde antioksidan seçenek olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kang ve ark., 1998). Yapılan deneysel diyabetik çalışmalarda da Vitamin C'nin kan glukoz düzeyini değiştirmeden böbrek dokusunda iyileştirici etkileri görülmüştür (Lee ve ark., 2007).

## SONUÇ

Verilen iyonize radyasyon dozunun Kaspaz 8 ekspresyonunda düşük miktarda bir artışa neden oldu. Bu da iyonize radyasyonun Kaspaz enzim sisteminde reseptör yollağı kullandığı fakat Kaspaz 3'te artış meydana getirmediği ve hücreyi apoptozise götürmediği tespit edilmiştir. Kaspaz 8'in artışıyla birlikte bir antiapoptotik olan Bcl-2 enzimin ekspresyonunda bir artış meydana gelmiştir. İyonize radyasyon sonrası verilen vitamin C'nin Kaspaz 8'i azalttığı teröpatik olarak verilen Vitamin C'nin iyonize radyasyon verildikten sonra genel itibarıyla sonuçları değiştirmedeği hatta Kaspaz 8'in artışına neden olduğu ortaya konuldu.

Sonuç olarak, verilen iyonize radyasyonun dozunun çalışılan apoptotik enzimleri etkilediği, fakat artış katsayılarının çok fazla olmadığı tespit edildi. Bununla birlikte, Vitamin C'nin iyonize radyasyona bağlı gelişen apoptotik yolakta koruyucu ve terapötik rolünün daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için, uygulanan iyonize radyasyon miktarı ve süresi artırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Bayşu Sözbilir N, Bayşu N 2008. Biyokimya, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Chen L, Jia RH, Qui CJ, Ding G 2005. Hyperglycemia inhibits the uptake of dehydroascorbate in tubular epithelial cell. *Am J Nephrol*, 25: 459-465.
- Elmore S 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 4, 495-516.
- Ferrier DR 2014. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 6nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Güney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N 2007. Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 5-6, 467-74.
- Gürdöl F, Ademoğlu E 2013. Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Halliwell B 1994. Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*.52:253-265.
- Kang SA, Jang YJ, Park H 1998. In vivo dual effects of vitamin C on Paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res.*, 28: 93-107.
- Karslıoğlu I, Ertekin MV, Taysi S, Kocer I, Sezen O, Gepdiremen A, Koc M and Bakan N 2005. Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. *J Radiat Res*. 46:277-282.
- Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z 2012. Apoptozis (Derleme). *Mustafa Kemal Üni Tıp Derg*, 3, 11, 27-37.
- Lee EY, Lee MY, Hong SW, Chung CH, Hong SY 2007. Blockade of oxidative stress by vitamin C ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic rats. *Yonsei Med J.*, 48: 847-855.
- Ofluoğlu FE 2007. Ratlarda beyin L-arjinin metabolizması üzerine kafeinin etkileri. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Serbecic N, Beutelspacher SC 2005. Vitamins inhibit oxidant induced apoptosis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol*, 49: 355-362.
- Taysi S, Memisogullari R, Koc M, Taylan A, Aslankurt M, Gümüştekin K, Al B, Ozabacigil F, Yilmaz A ve Ozder HT 2008. Melatonin reduces oxidative stress in the rat lens due to radiation-induced oxidative injury. *Int J Radiat Biol*. 84 : 803-808.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S 2017. The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. *Fluoride*, 50(3), 300–313.

## Ab-initio Study of Physical Properties of TbMn<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

Murat Aycibin<sup>1\*</sup>, Arife G. Imer<sup>1</sup>, Abdulkadir Korkut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Science, Physics Department, Van, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [murataycibin@yyu.edu.tr](mailto:murataycibin@yyu.edu.tr), aycibin@gmail.com

### Abstract

This is part of a systematic study on physical properties of the ThCr<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>-type rare earth intermetallic, carried out by theoretical method. REM<sub>2</sub>X<sub>2</sub> compounds (where X = Si and Ge) crystallize in the body-centered tetragonal structure with space group 14/mmm. The Wien2k code was employed to obtain physical properties of TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub>, therefore, the band structures, total and partial densities of states are presented and discussed in the context of the available experimental data and theoretical calculations. Our calculations show that compound has metallic characteristic.

**Keywords:** Electronic band structure, Density of state, Density functional theory, Wien2k

### INTRODUCTION

REM<sub>2</sub>X<sub>2</sub> compounds (where Re= rare earth, M is 3d or 4d metal, and X = Si and Ge) crystallize in the body-centered tetragonal structure of ThCr~Si<sub>2</sub>-type with space group I4/mmm (Ban and Sikirica, 1965). The RE, M and Si or Ge atoms occupy the 2(a), 4(d) and 4(e) positions, respectively. The characteristic behavior of REM<sub>2</sub>X<sub>2</sub> compounds may be ferromagnets or antiferromagnets according to magnetic measurements (Narasimhan et al. 1975, 1976)(Szytula and Szott, 1981).

TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> compound belongs to REM<sub>2</sub>X<sub>2</sub> family and there are a few studies devoted on TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> compound or TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> compound with doping element. These studies have been performed experimentally. Polycrystalline sample of TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> was measured for magnetic order and it shows ferromagnetic ordering at low temperature (Narasimhan et al., 1975), and antiferromagnetic ordering connected with Mn sublattice at high temperatures (T<sub>N</sub> = 413 K) (Szytula and Szott, 1981). According to the magnetic data obtained on a single crystal the magnetization axis is parallel to the c-axis (Shigeoka, 1983). The saturation magnetic moment is 5.6 μ<sub>B</sub> i.e. smaller than the theoretical value expected for the free Tb<sup>3+</sup> ion. Using neutron diffraction method, the crystal and magnetic structure of TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> were determined (Leciejewicz and Szytula, 1985). The understand high pressure effect on magnetic phase transition and related anomalies in some compounds including TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub>, Arnold *et al.* performed experimental study (Arnold et al., 1998). The specific heat of TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> was measured (Wada et al., 1995). Purwanto et al. performed Neutron-diffraction and magnetometric measurements to observed ordering temperature variation for magnetic moments behavior (Purwanto et al. 1995). However, we could not come cross with any theoretical studies devoted on determining electronic structure of compound.

In this article, we used computational method to obtained electronic band structure of TbMn<sub>2</sub>Ge<sub>2</sub> (TMG). We hope that this work can be guide for researches who like to do more research on compound.

### MATERIALS AND METHODS

All calculation were performed with Wien2K (Blaha et al. 2018 ) software which is written in the framework of Density functional Theory (DFT) and uses Linearized Augmented Plane Wave (LAPW) (Andersen, 1975). To run Wien2k, some initial parameters, lattice constant, space group and atomic positions, are required. We obtained needed parameters from Leciejewicz work (Leciejewicz and Szytula, 1985). The compound electronic configuration is Tb [Xe] 4f<sup>9</sup> 6s<sup>2</sup>, Mn [Ar] 3d<sup>5</sup> 4s<sup>2</sup> and Ge [Ar] 3d<sup>6</sup> 4s<sup>2</sup>. The cut off energy was taken -9 Ry and 648 high symmetry k points were generated in 17x17x16 grid for the density in Brillion zone (BZ). For exchange-correlation effect in Wien2k, , the generalized gradient approximation (GGA) using the Perdew-Burke-Ernzerhof (Perdew, 1996) was used.

## RESULTS and DISCUSSION

First task for investigation is to obtain the best theoretical lattice constant. For this aim, volume optimization calculation was run. The Birch-Murnaghan equation of state (Birch, Murnaghan, 1947) was used to fit data to obtain lattice constant and other physical constant.

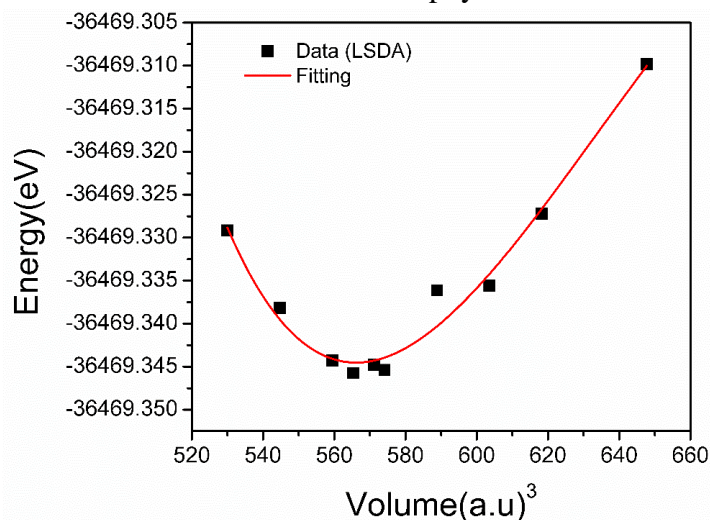


Figure-1 Total energy versus unit cell volume for TMG

**Table 19.** Calculated ground state lattice constants of TMG

Lattice constant (Å)	Theoretical	Experimental (Leciejewicz work)
a	3.9518	4.006
b	3.9518	4.006
c	10.728	10.075

Due to magnetic structure of compound, spin polarize calculation was performed. Figure 2 show spin up and down cases.

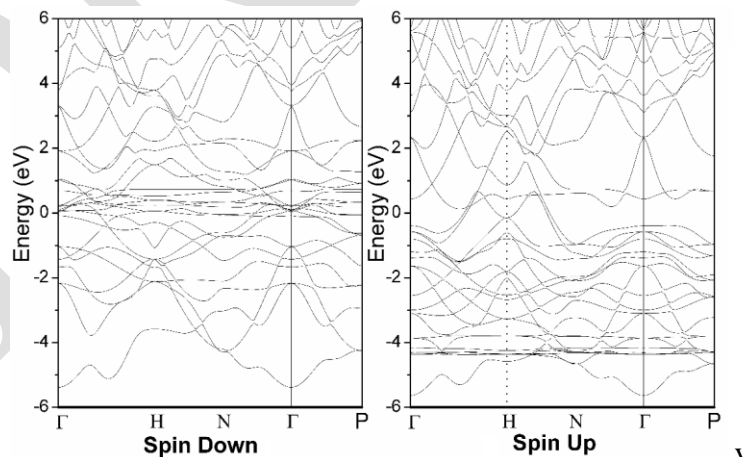


Figure-2 Calculated electronic band structure of TMG for spin up and down cases

It is obvious from figure that there is no gap between valence and conduction band which implies that compound has metallic character. Therefore, no need to perform calculation for determining optical properties. The electronic density of states (DOS) for spin up and don cases was shown in figure 3.

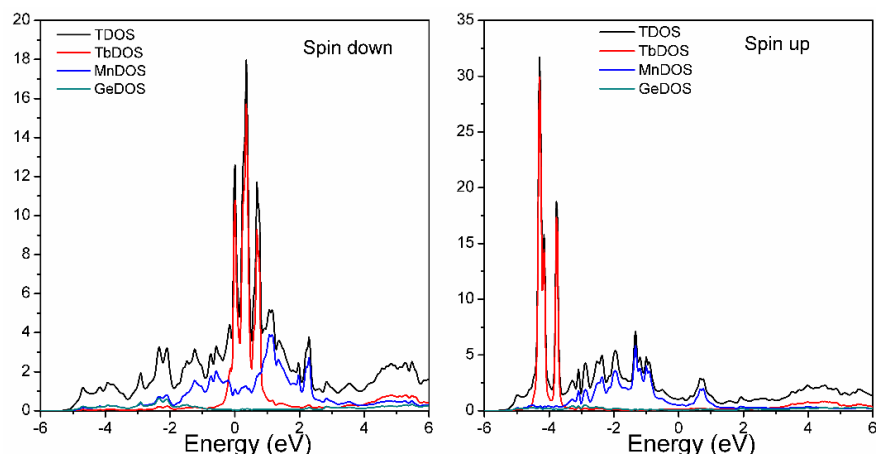


Figure-2 Calculated density of state of TMG for spin up and down cases

## CONCLUSION

In this paper, we performed theoretical study to obtain electronic band structure of  $\text{TbMn}_2\text{Ge}_2$  compound. According to our result, compound is classified as a metal. Magnetic moment of compound is calculated  $9.3959 \mu_B$ .

## REFERENCE

- Ban, Z, and Sikirica, M., Acta Cryst. 18,594 (1965).  
Narasimhan, K.S.V.L., Rao, V.U.S., Wallace, W.E., and Pop, I., AIP Conf. Proc. 29,594 (1975).  
Narasimhan, K.S.V.L., Rao, V.U.S., Bergner, R.L., and Wallace, W.E., J. Appl. Phys. 64, 4597 (1976).  
Szytula, A., and Szott, I., Solid State Commun. 40, 199(1981).  
Shigeoka, T., Fujii, H., Fujiwara, H., Yagasaki, K., and Okamoto, T., J. Magn. Magn. Mater. 209 (1983): 31-34  
Leciejewicz, J., Szytula, A., Magnetic phase transition in  $\text{TbMn}_2\text{Ge}_2$ . Solid State Communications, Vol. 49, No. 4, (1984):pp. 361-364.  
Morellon, L., Arnold, Z., Kamar, J., Ibarra, M.R., Algarabel, P.A., The magnetic phase transitions and related volume changes in  $(\text{Nd}_{1-x}\text{Tb}_x)\text{Mn}_2\text{Ge}_2$  compounds. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 177-181 (1998) :1085-1086  
Wada, H., Yamaguchi, H., Shiga, M., Calorimetric study of  $\text{RMn}_2\text{Ge}_2$  compounds (R = La, Gd, Tb and Dy). Journal of Magnetism and Magnetic Materials 152 (1996) :165-173  
Purwanto, S., Ohashi, M., Onodera, H., Morii, M., Funahashi, S., Yamauchi, H., Yamaguchi, Y., The effects of dilution on the competing exchange state in  $(\text{Tb}, \text{Y})\text{Mn}_2\text{X}_2$  (X = Ge, Si). Physica B 213&214 (1995): 318-320  
Blaha, P., Schwarz, K., Madsen, G. K. H., Kvasnicka, D., Luitz, J., Laskowski, R., Tran, F., and Marks, L. D., WIEN2k, An Augmented Plane Wave + Local Orbitals Program for Calculating Crystal Properties (Karlheinz Schwarz, Techn. Universität Wien, Austria), 2018. ISBN 3-9501031-1-2  
Andersen, O.K., Linear methods in band theory. Physical Review B, 1975. 12(8): p. 3060-3083.  
Perdew, J.P., K. Burke, and M. Ernzerhof, Generalized gradient approximation made simple. Physical Review Letters, 1996. 77(18): p. 3865-3868.  
Birch, F., Finite Elastic Strain of Cubic Crystals. Physical Review, 1947. 71(11): p. 809-824.  
Murnaghan, F.D., Birch-Murnaghan equation of state. Proc. Nat. Acad. Sci, 1947. 50: p. 697.

## Fonksiyonel Organik Malzeme Bileşenli Hibrit Aygıtın Elektriksel Parametrelerinin Belirlenmesi

Arife Gencer Imer<sup>1\*</sup>, Murat Aycibin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Van, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:agencerimer@yyu.edu.tr

### Özet

Bu çalışma, organik malzeme bileşenli hibrit cihazın üretilmesi ve elektriksel parametrelerinin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır. Hibrit elektronik cihazı hazırlamak için, organik malzemenin başlangıç çözeltisi, önceden temizlenmiş silikon alttaş üzerine, yaygın olarak kullanılan, kolay ve ucuz bir kaplama tekniği olan dönel kaplama yöntemi ile kaplanmıştır. Daha sonra,  $10^{-5}$  Torr basınç altında termal buharlaştırma yöntemiyle gölge maskesi kullanılarak üst metal kontaklar oluşturulmuştur. Üretilen örneğin akım voltaj ölçümleri karanlıkta oda sıcaklığında yapılmıştır. İdealite faktörü, engel yüksekliği ve seri direnç gibi temel elektriksel parametreler akım-voltaj verileri kullanılarak belirlenmiştir. Ek olarak, bu elektriksel parametreleri hesaplamak ve onaylamak için Norde fonksiyonu kullanılmıştır. Son olarak, elde edilen sonuçlar yardımıyla, organik ara yüzey katmanının, cihazın elektriksel parametreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışma, fonksiyonel organik arayüzey katman varlığı nedeniyle engel yüksekliğini değiştirmenin/ayarlamının mümkün olabilirliğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Engel Yüksekliği, Organik Arayüzey

### Determination of the Electrical Parameters of Hybrid Device Based on Functional Organic Material

#### Abstract

This study was focused on the production of hybrid material with organic material components and determination of its electrical parameters. In order to prepare the hybrid electronic device, the precursor solution of the organic material was coated on the pre-cleaned silicone substrate by a spin coating method, which is a widely used, easy and inexpensive coating technique. Then, the top metal contacts were formed using a shadow mask by thermal evaporation under  $10^{-5}$  Torr pressure. The current voltage measurements of the fabricated sample were made at room temperature in the dark. Fundamental electrical parameters of prepared device such as ideality factor, barrier height and series resistance were determined using current-voltage data. In addition, Norde function was used to calculate and confirm these electrical parameters. Finally, with the help of the obtained results, the effect of organic interfacial layer on the electrical parameters of the functional organic based device was investigated. This study reports the possibility of modifying /controlling the barrier height due to the presence of a functional organic interfacial layer.

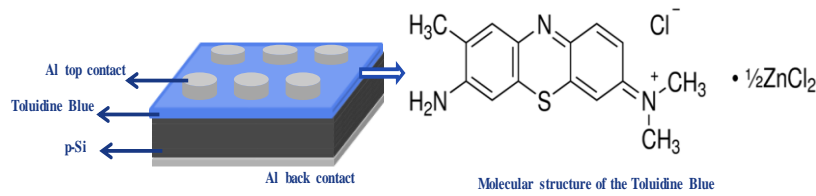
**Keywords:** Barrier Height, Organic Interlayer.

### GİRİŞ

Son zamanlarda fonksiyonel organik arayüzey bileşenli hibrit aygıtlar, optoelektronik teknolojisinde organik ışık yayan diyot, organik tabanlı güneş hücreleri, fotodetektör, fotodiyot, optik sensörler ve güneş hücreleri gibi geniş uygulamaları nedeniyle yarıiletken endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, fonksiyonel organik tabanlı aygıtlar, yapısal esnekliği, kolay sentezi ve düşük üretim maliyeti nedeniyle çok çeşitli uygulama alanlarında dikkatleri üzerine çekmektedir (Gencer Imer ve ark. 2017, Imer ve Ocak 2016, Güler ve ark. 2009). Çok sayıda araştırma, Schottky diyotlarının elektrik ve optoelektrik özelliklerinde, metal ve yarıiletken arayüzeyine organik bir ara tabaka varlığında geleneksel metal yarıiletken yapılara kıyasla aygıt performansında iyileşme elde edildiğini belirtmektedir (Imer ve ark. 2017, 2014) Bu çalışmada, moleküler formülü ( $C_{15}H_{16}ClN_3S \cdot 0.5ZnCl_2$ ) şeklinde olan toludin mavisi (TB) solusyonu organik arayüzey tabakası olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın ilk amacı, metal yarıiletken temas bölgesinde organik ara yüzey TB tabakası olan hibrit aygıtların üretilmesidir. İkincisi, engel yüksekliği, seri direnci, idealite faktörü gibi temel elektriksel parametreleri belirlemek ve cihazın parametrelerini oda sıcaklığında akım-voltaj (I-V) ölçümleri ile belirlemek ve karşılaştırmaktır. Sonuncusu, arayüzey organik tabakanın aygıt performansına etkisini araştırmaktır.

## MATERYAL VE METOT

Al/TB/p-Si heteroeklemin üretimi için, p-Si altlık ((100) yönelim ve 1-10 ohm-cm öz direnç) kimyasal olarak RCA yöntemi ile temizlenmiştir (Gencer Imer ve ark. 2016). Ohmik kontak yapımı için alüminyum (Al) metal altlığın mat tarafına termal yöntemle buharlaştırılmıştır. Elde edilen yapı N<sub>2</sub> atmosferinde 3 dakika boyunca 570 ° C'de tavlansmıştır. TB ince filmlerin kaplanması için, TB metil alkolde çözülmüş ve 1x10<sup>-2</sup> mol/L TB'nin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, dönel kaplama yöntemiyle 1 dakika boyunca 2000 rpm'lik bir dönme hızı ile silikon altlığın ön yüzüne kaplanmıştır. Daha sonra, elde edilen TB/p-Si yapısı üzerine, 0.8 mm çapında dairesel noktalar şeklindeki bir gölge maske kullanılarak üst kontaktlar oluşturulmuştur. Diyotun I-V ölçümleri, karanlıkta Keithley 2400 voltaj kaynağı kullanılarak oda sıcaklığında yapılmıştır. Şekil 1'de üretilen aygıtın şematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1.

Si hibrit aygıtın şematik gösterimi ve Toluidin mavisinin moleküler yapısı

Al/TB/p-

## BULGULAR ve TARTIŞMA

I-V ölçümleri en yaygın ve etkili tanı yöntemlerinden biridir. Şekil 2'de Al/TB/p-Si hibrit aygıtı için yarı logaritmik I-V karakteristikleri verilmiştir. Engel yüksekliği ve idealite faktörü termiyonik teoriden belirlenebilir. Bu teoriye göre ideal olmayan durum için akım denklemi aşağıdaki gibi ifade edilir (Gencer Imer ve ark. 2017, Kılıçoğlu ve ark. 2014).

$$I = AA^* T^2 \exp\left(-\frac{q\phi_b}{kT}\right) \exp\left[\left(\frac{q(V - IR_s)}{nkT}\right) - 1\right] \quad (1)$$

burada, I<sub>0</sub> doyma akımıdır ve

$$I_0 = AA^* T^2 \exp\left(-\frac{q\phi_b}{kT}\right) \quad (2)$$

A etkin kontak alanıdır, A \* Richardson sabiti,  $\phi_b$  diyotun engel yüksekliği (V = 0'da), q elektronik yük, k Boltzmann sabiti, T Kelvin cinsinden sıcaklıktır. n, boyutsuz olan ve yarı logaritmik I-V grafiğinin doğrusal kısmının eğiminden hesaplanan bir idealite faktörüdür.

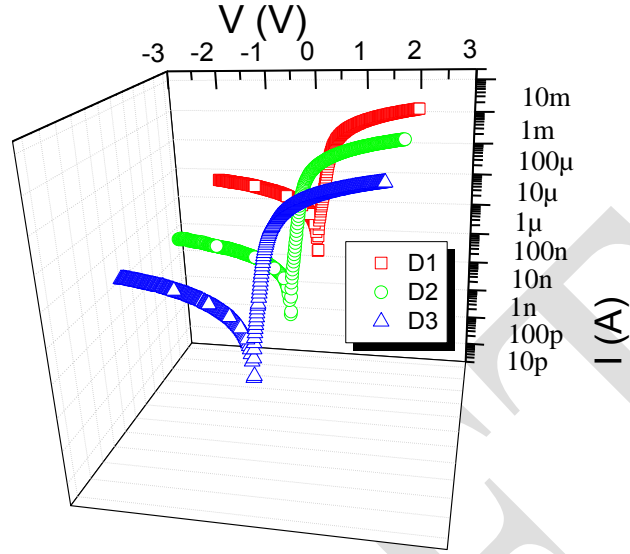
$$n = \frac{q}{kT} \frac{dV}{d \ln(I)} \quad (3)$$

Aynı şekilde, engel yüksekliği de,

$$\phi_b = \frac{kT}{q} \ln\left(\frac{AA^* T^2}{I_0}\right) \quad (4)$$



Her iki diyot için  $\phi_b$  ve  $n$ , 4 ve 5 denklemlerinden elde edildi. Al/TB/p-Si hibrit aygıtın engel yükseklik değerlerinin ortalaması 0.729 eV ve idealite faktörü değerlerinin ortalaması da 1.41 olarak belirlendi. Geleneksel Al/p-Si metal yarıiletken aygıtla kıyasla engel yüksekliği, organik arayüzey tabakasının eklenmesiyle belirgin bir şekilde artmıştır.



Şekil 2. Al/TB/p-Si hibrit aygıtı için yarı logaritmik I-V karakteristikleri

Ayrı bir metot olan Norde yöntemiyle, seri direnç ve engel yüksekliği değerleri tekrar hesaplandı, ve karşılaştırıldı. Norde fonksiyonu aşağıdaki eşitlikle ifade edilir (Gencer İmer ve Ark. 2016).

$$F(V) = \frac{V}{\gamma} - \frac{kT}{q} \ln \left[ \frac{I(V)}{AR * T^2} \right] \quad (5)$$

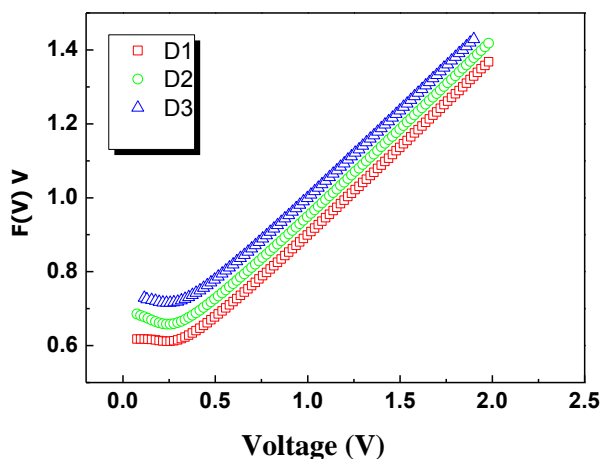
Burada,  $\gamma$  idealite faktöründen büyük en küçük tam sayıdır. Seri direnç ve engel yüksekliği değerleri aşağıdaki eşitlikler yardımıyla bulunur (Kılıçoğlu ve ark. 2014). Elde edilen sonuçlar Tablo 1 de listelendi.

$$\phi_b = F(V_0) + \frac{V_0}{\gamma} - \frac{kT}{q} \quad (6)$$

Burada,  $F(V_0)$  Norde fonksiyonun minimum değeridir.

$$R_s = \frac{kT(\gamma - n)}{qI_{\min}}$$

(7)



Şekil 3. Al/TB/p-Si hibrit aygıtı için F(V)-V karakteristikleri

Tablo 1. Al/TB/p-Si hibrit aygıtın I-V ve F-V kullanılarak elde edilen elektrik parametreleri

Aygıt	İdealite faktör (n)	Engel Yüksekliği $\Phi_b$ (eV)	Seri Direnç $R_s$ ( $\Omega$ )	Engel Yüksekliği $\Phi_b$ (eV)
D1	1.301	0.751	740	0.774
D2	1.420	0.719	1250	0.749
D3	1.522	0.716	950	0.760

## SONUÇ

Bu çalışmada, organik bileşenli hibrit aygıtlar üretildi. MIS hibrit yapı elde etmek için metal yarıiletken ekleme arayüzey katman olarak toludin mavisi kullanıldı. Üretilen aygıtlar içinoda sıcaklığında karanlıkta I-V ölçümleri yapıldı. İdealite faktörü ve engel yüksekliği gibi önemli elektriksel parametreler I-V ölçümlerinden elde edildi. Al/TB/p-Si yapısının bariyer yüksekliğinin değeri, Al/p-Si aygıtından daha yüksek olduğu görüldü. Bu, üretilen aygıtın performansını iyileştirmek için arzu edilen bir etkidir. I-V'den elde edilen sonuçları doğrulamak ve seri direnç değerlerini belirlemek için Norde yöntemi kullanıldı ve sonuçlar arasında iyi bir uyum bulunduğunu rapor edildi. Elde edilen sonuçlar, TB fonksiyonel boya tabanlı hetero-yapının arzu edilen iyileşmeyi sağladığı ve mikroelektronik cihaz uygulamaları için uygunluğunu göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Gencer Imer A, Tombak A, Korkut A and Ocak Y.S. 2017. Effect of Illumination on the Photovoltaic Parameters of Al/p-Si Diode with an Organic Interlayer Prepared by Spin Coating Method Spin Kaplama Yöntemiyle Hazırlanan Organik Arayüzeyi İçeren Al/p-Si Diyotunun Fotovoltaik Parametreleri Üzerine Aydınlanmanın Süleyman Demirel Univ. J. Nat. Appl. Sci. 153: 7-13.
- Gencer Imer A, Temirci C, Gülcan M and Sönmez M 2014. Electrical characteristics of organic/inorganic Pt(II) complex/p-Si semiconductor contacts Mater. Sci. Semicond. Process. 28: 31-41
- Güler G, Güllü Ö, Karataş Ş and Bakkalolu Ö F 2009 Analysis of the series resistance and interface state densities in metal semiconductor structures J. Phys. Conf. Ser. 153: 274485-94
- Imer A G, Tombak A and Korkut A 2016. Electrical and photoelectrical characteristic investigation of a new generation photodiode based on bromothymol blue dye J. Phys. Conf. Ser. 707: 456852-63
- Imer A G and Ocak Y S 2016. Effect of Light Intensity and Temperature on the Current Voltage Characteristics of Al/SY/p-Si Organic-Inorganic Heterojunction J. Electron. Mater. 45: 5347-55
- Kilicoglu T, Tombak A, Ocak Y S and Aydemir M 2014. Electrical and photoelectrical characterization of a TTF/p-InP organic-inorganic heterojunction Microelectron. Eng. 129: 91-5

## ***Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının kimyasal bileşenleri ve radikal giderim aktiviteleri**

Begüm Hazar ÇİFTÇİ<sup>1\*</sup>, Meltem TAŞ<sup>1</sup>, Gülşen TEL-ÇAYAN<sup>2</sup>, M. Emin DURU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 48121, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Muğla, Türkiye

\*begumhazargokcan@gmail.com

### **Özet**

*Achillea* cinsi *Asteraceae* familyasının bir üyesi olup, 140 türü ile dünyada doğal yayılış göstermektedir. Türkiye’de ise 27’si endemik olmak üzere 48 türünün yayılış gösterdiği bilinmektedir. *Achillea* türleri Anadolu’da “civan perçemi, pire otu, yılan çiçeği, sarı çiçek, çetüğe, kılıç otu, sarılık otu, ayvadene, tatarcı otu” yaygın isimleri ile halk arasında bilinmektedir. *Achillea* türleri Anadolu’da uzun yıllardır geleneksel tedavide; sarılık, yara iyileştirme, iştah açıcı, diş ağrılarında, şeker hastalığına karşı, antiinflamatuvar ve insektisit olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Fethiye Çameli yolu üzerinde toplanan *Achillea nobilis* subsp. *denissima* toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yöntemi ile elde ettiğimiz uçucu yağın kimyasal bileşenleri ve radikal giderim aktiviteleri araştırıldı. Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi ile yapılan analizlerde toplam 45 bileşen tespit edildi. Bu bileşiklerden 43 tanesinin yapısı pik çakıştırma yöntemi, kütle analizleri ve kütüphane verileri kullanılarak aydınlatıldı. Elde edilen sonuçlar literatürlerle karşılaştırıldı. Buna göre uçucu yağda piperiton (%33,08), kamfor (%5,85), askaridol (%5,81), krisantenon (%5,62), trans-2,7-Dimethyl-4,6-octadien-2-ol (%5,14), ökaliptol (%4,87), terpinolen (%4,29), p-Simen (%3,89),  $\alpha$ -Pinen (%3,05) ana bileşenlerdir. Uçucu yağın radikal giderim aktivitesi DPPH serbest radikal giderimi ve ABTS katyon radikali giderim aktivite yöntemleri ile belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, 100  $\mu$ g/ml konsantrasyonda, ABTS katyon radikal giderimi %67,9 iken aynı konsantrasyonda DPPH serbest radikal gideriminin %64,3 olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** *Achillea nobilis* subsp. *denissima*, uçucu yağ, piperiton, radikal gideri aktivitesi.

### **Chemical components and radical scavenging activities of *Achillea nobilis* subsp. *denissima* essential oil**

#### **Abstract**

The genus *Achillea* is a member of the *Asteraceae* family and has a natural distribution in the world with 140 species. The genus *Achillea* is a member of the *Asteraceae* family and has a natural distribution in the world with 140 species. There are 48 species of *Achillea* in Turkey and 27 of these species are endemic. *Achillea* species are known among the people in Anatolia with their common names “civan perçemi, pire otu, yılan çiçeği, sarı çiçek, çetüğe, kılıç otu, sarılık otu, ayvadene, tatarcı otu”. *Achillea* species have been used in traditional treatment in Anatolia for many years and have been used as jaundice, wound healing, appetizing, toothache, diabetes, antiinflammatory and insecticide.

The above-ground parts of *Achillea nobilis* subsp. *denissima* species used in this study were collected from Fethiye Çameli road. The chemical components and radical removal activities of the essential oil carried from the above-ground parts by hydrodistillation method were investigated. In the studies carried out by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, 45 components were detected and 43 of them were identified by using peak matching method, mass analysis and library data. The results were compared with the literature. Accordingly, piperitone (33.08%), camphor (5.85%), ascaridol (5.81%), chrysanthenone (5.62%), trans-2,7-Dimethyl-4,6-octadiene- 2-ol (5.14%), eucalyptol (4.87%), terpinolene (4.29%), p-cymene (3.89%),  $\alpha$ -pinene (3.05%) are the major components in the essential oil. The radical scavenging activity of the essential oil was established by DPPH free radical scavenging and ABTS cation radical scavenging activity methods. According to the results, ABTS cation radical scavenging was 67.9% and DPPH free radical scavenging was 64.3% in 100  $\mu$ g/ml concentration.

**Keywords:** *Achillea nobilis* subsp. *denissima*, essential oil, piperitone, radical scavenging activity

### **GİRİŞ**

Dünyada çiçekli bitki tür sayısının yaklaşık 422.000 olarak bilinmektedir (Schippmann ve ark., 2006). Ülkemizdeki fitocoğrafik bölgelerde ise 12.000 kadar çiçekli bitki türü yetişmektedir. Avrupa'nın florostik açıdan en zengin ülkelerinde bile bu rakam 5.000 civarındadır. Tüm Avrupa kıtasında doğal olarak yetişen bitki türü sayısı 12.000'dir. Bitki bakımından en zengin komşumuz olan İran'da ise 8.000 civarında bitki türü yetişmektedir. Ülkemizdeki endemik bitki türü sayısı yaklaşık 4.000 kadardır. Avrupa kıtasındaki ülkelerin toplamında ise endemik bitki türü sayısı 2.700 civarındadır. Avrupa'nın en çok endemik türe sahip ülkesi ise yaklaşık 800 tür ile Yunanistan'dır (Şirin ve Ertuğrul, 2015).

Uçucu yağ, bitkilerin çeşitli droglarında farklı yöntemlerle elde edilen; oda sıcaklığında sıvı halde olan, renksiz veya açık sarı renkli, uçucu, kuvvetli kokulu, yağimsı karışımlardır. Açıkta bırakıldıklarında, oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden "uçucu yağ", güzel kokulu olmaları ve parfümeride kullanılmaları nedeniyle "esansiyel yağ" gibi isimlerle anılırlar (Ceylan, 1983).

Uçucu yağlar, böceklerde yaralanmalara karşı antiseptik özellik ajan olarak kullanılır. Ayrıca, böcekleri kovucu veya cezbedici özelliğinden dolayı da bitkilerde tozlaşmaya yardımcı olur. Akdeniz gibi sıcak iklimlerde uçucu yağca zengin bitkilerin uçucu yağlarının hızla buharlaşarak yüzeylerin soğumasını sağladığı ve bitkinin su kaybını önlediği bilinmektedir (Duru ve ark., 2002).

*Achilleae* cinsi Asteraceae familyasının bir üyesidir. Asteraceae, Türkiye florasında hem tür hem de cins bakımından en zengin familyasıdır. En çok endemik tür de Asteraceae'de bulunmaktadır. Toplam 446 endemik tür içeren Asteraceae'nin endemizm oranı %37,3'dür. Türkiye'de 48 *Achillea* türü bulunmaktadır ve bunlardan 27'si endemiktir (Zonuz, 2016).

*Achillea* türleri, antimikrobiyal, antifungal, antiviral etkiye sahiptir ve antioksidan etkileri bilinmektedir. Özellikle radikal giderimlerinin fazla olduğu kanıtlanmıştır (Baser ve ark., 2001). Ayrıca antidiyabetik ve antihiperglisemik etkiye de sahiptir (Saeidnia ve ark., 2011). Bitkilerin toprak üstü kısımlarının ülserle karşı kullanılabilmesi ve oksidatif stres üzerine olumlu etkiler gösterdiği *in vivo* testlerle kanıtlanmıştır (Konyalioglu, ve Karamenderes, 2005). İnsektisidal etki, özellikler de larvasidal etki gösterdiği bilinmektedir (Tabanca ve ark., 2011). Yara iyileştirici etkilerinin olduğu da rapor edilmiştir (Ozdemir ve Alpınar, 2015).

Anadolu'da ve dünya genelinde *Achillea* türleri yaygın olarak halk tıbbında kullanılmaktadır. Anadoluda, *A. millefolium* antianemik, antispazmotik, diüretik ve hemoroitte; *A. grandifolia* erkeklerde hormonal bozukluklarda ve ülserde (Ozdemir ve Alpınar, 2015); *A. biebersteinii* apsenin olgunlaşmasında, sarılıkta, gaz sancısında (Sezik ve ark., 1997), romatizmada, sinüzitte, diş ağrısında, menstrüel ağrılarda (Polat ve ark., 2013); *A. wilhelmsii* bronşitte (Yeşilada ve ark., 1995) kullanılmaktadır. Dünyanın birçok yerinde geleneksel tıpta *Achillea* türleri; *A. erba-rotta* konjüktivitte ve gözde batmalarında. *A. millefolium* Hindistan'da diş ağrısında (Shah ve ark., 2015); *A. moschata* Valfurva-İtalya'da gripte ve hafızayı güçlendirici olarak kullanılmaktadır (Dei Cas ve ark., 2015)

*Achillea* türlerinin üzerine yapılan araştırmaların çok büyük bir kısmı onların uçucu yağ bileşenleri ve aktiviteleri üzerinedir. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, *Achillea* türlerinin uçucu yağlarında 1,8-sineol, kamfor (Toker ve ark., 2003), karyofilenoksit, linalool, p-simen, chrysanthenon, piperiton ve ascaridol'un ana bileşenler olduğu rapor edilmiştir (Turkmenoglu ark., 2015). Bu araştırmada, bugüne kadar, kimyasal içeriği ve tıbbi aktiviteleri bakımından üzerine hiçbir araştırma yapılmamış ve ülkemize endemik olan *Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının kimyasal içeriği ve radikal giderimi aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmamıza konu olan *Achillea nobilis* subsp. *denissima*, Muğla bölgesinde doğal olarak yetişen endemik bir türdür. Bu çalışmada kullanılmak üzere bu tür, Fethiye-Çameli yolu üzerinde, Kuru köyü civarında, 1500 m rakımda toplandı.

### Uçucu Yağ Eldesi

Bitkinin toprak üstü kısımları gölgede kurutulduktan sonra Clevenger distilasyon aparatında yaklaşık üç saat damıtılarak uçucu yağ elde edildi. Analizi yapılana kadar azot gazı altında karanlıkta saklandı.

## Gaz Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (GC-MS) Analizi

*Achillea nobilis* subsp. *denissima* türünün uçucu yağ bileşenlerinin karakterizasyonu için Varian 2100 GC-MS cihazı kullanıldı. Bileşenlerin aydınlatılması için pik çakıştırma yöntemi, kütle analizleri ve kütüphane verileri kullanıldı. GC-MS analiz şartları çizelge 1’de verilmiştir

Çizelge 1. GC-MS Analiz Şartları

Kolon	: DB-1 kapiler kolon (30 m x 0.25mm, 0.25µm)
Taşıyıcı Gaz	: He
Enjeksiyon sıcaklığı	: 250°C
Kolon sıcaklığı	: Fırın sıcaklığı 60°C de 5 dakika bekletildi. 280°C’ye 4°C/dk hızla çıkarıldı ve 280°C’de 15 dakika bekletildi.
Split Oranı	: 1:50
İyon Kaynağı sıcaklığı	: 150 °C
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle aralığı	: 28-450 m/z
Scan aralığı	: 0.01
Enjeksiyon miktarı	: 0.2µL

## DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

*Achillea nobilis* subsp. *denissima*’nın uçucu yağının serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Öztürk ve ark, 2014). Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbansı ölçüldü. Ekstrenin absorbans değeri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

## ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

*Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının katyon radikali giderim aktiviteleri ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) kullanılarak belirlendi (Re ve ark., 1999). Katyon radikalının oluşması için karışım 16 saat karanlıkta bekletildi. Oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyondan sonra 734 nm’de absorbansları ölçüldü. Ekstrenin absorbans değeri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{ABTS}^+ \text{ Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

## BULGULAR ve TARTIŞMA

*Achillea nobilllis* subsp. *denissima* türünün uçucu yağından Varian 2100 GC-MS cihazı kullanılarak yapılan analizlerde 45 tane bileşik tespit edildi. Bu bileşikler Tablo 1’de gösterilmiştir. Referans maddelerle pik çakıştırma yöntemi, her bir bileşiğin kütle analileri, kütüphane verileri ve literatürlerden yararlanarak tespit edilen bileşiklerden 43 tanesinin teşhisi tam olarak gerçekleştirildi. Buna göre, uçucu yağın %98,54’ünün yapısı aydınlatıldı. *Achillea nobilllis* subsp. *denissima* uçucu yağında, piperiton (%33,08), kamfor (%5,85), askaridol (%5,81), chrysanthenon (%5,62), trans-2,7-Dimethyl-4,6-octadien-2-ol (%5,14), ökaliptol (1,8-

sineol) (%4,87), izosiklositral (%4,85), terpinolen (%4,29), p-simen (%3,89),  $\alpha$ -pinen (%3,05) majör bileşiklerdir.

**Tablo 1.** *A.Nobillis* subsp. *denissima* Uçucu Yağının Kimyasal Bileşenleri

Pik no	Bileşik adı	<i>A.nobillis</i> subsp. <i>denissima</i> uçucu yağ miktarı (%)	Teşhis Yöntemi
1	Santolina triene	0,37	GC, GC-MS
2	$\alpha$ -Pinene	3,05	GC, GC-MS
3	Camphene	0,98	GC, GC-MS
4	$\beta$ -Pinene	0,37	GC, GC-MS
7	Terpinolen	4,29	GC, GC-MS
8	p-Cymene	3,89	GC, GC-MS
9	Eucalyptol (1,8-Cineole)	4,87	GC, GC-MS
10	Limonene	0,29	GC, GC-MS
11	trans-2,7-Dimethyl-4,6-octadien-2-ol	5,14	GC-MS
12	$\gamma$ -Terpinen	0,43	GC, GC-MS
14	Linalool	0,84	GC, GC-MS
15	Chrysanthenone	5,62	GC-MS
16	$\alpha$ -Campholenal	0,47	GC-MS
17	cis- $\beta$ -Terpineol	0,86	GC-MS
18	Camphor	5,85	GC, GC-MS
19	trans-Pinocarveol	0,58	GC, GC-MS
20	1-Terpineol	0,46	GC-MS
21	cis-Verbenol	0,38	GC, GC-MS
22	Verbenone	0,58	GC, GC-MS
23	Borneol	1,39	GC, GC-MS
24	Isocyclocitral	4,85	GC-MS
25	Lavandulol	0,40	GC-MS
26	Terpinen-4-ol	1,07	GC, GC-MS
27	$\alpha$ -Terpineol	1,38	GC, GC-MS
28	Isopulegol	0,40	GC, GC-MS
29	Grandisol	2,94	GC-MS
30	Ascaridol	5,81	GC-MS
31	Piperitone	33,08	GC, GC-MS
33	trans-Carveol	1,20	GC, GC-MS
34	Cumic alcohol	0,07	GC-MS
35	Isobornil asetat	0,12	GC, GC-MS
36	Pipertoneoxide	2,12	GC-MS
37	$\beta$ -Terpinil asetat	1,05	GC, GC-MS
38	Isoeugenol	0,12	GC-MS
39	cis-Jasmone	0,23	GC, GC-MS
40	trans-Jasmone	0,83	GC, GC-MS
41	$\beta$ -Cubebene	0,78	GC-MS
42	Carvylpropionate	0,30	GC, GC-MS
43	Caryophyllene oxide	0,18	GC, GC-MS
44	$\delta$ -Eudesmol	0,11	GC-MS
45	$\beta$ -Eudesmol	0,26	GC-MS

Uçucu yağın DPPH serbest radikal giderimi ve ABTS katyon radikali giderim aktivite testlerinde elde edilen sonuçlara göre; *Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının ABTS katyon giderimi aktivitesinde IC<sub>50</sub> değeri 45,14±0,23 hesaplanırken, DPPH serbest radikal giderimi için ise 53,77±0,41 olarak hesaplandı. Kullanılan standartlara bakıldığında BHA'nın ABTS katyon giderimi için IC<sub>50</sub> değeri 12.80±0.50; DPPH serbest radikal giderimi için IC<sub>50</sub> değeri 19.70±0.18 bulunmuştur. α-tokoferol için ise ABTS katyon giderimi için IC<sub>50</sub> değeri 38.75±0.23; DPPH serbest radikal giderimi için IC<sub>50</sub> değeri 34.50±0.47 bulundu. *Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının özellikle doğal bir antioksidan olan α-tokoferole yarışır düzeyde aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Achillea nobilllis* subsp. *denissima* uçucu yağının kimyasal bileşenleri ve radikal giderim aktiviteleri de 2 yöntemle göre belirlenmiştir. Uçucu yağın ana bileşenleri ile bu güne kadar *Achillea* türlerinin uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri uyum içindedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen radikal giderim aktiviteleri ile bu güne kadar *Achillea* türlerinin radikal giderimleri benzerlik göstermektedir (Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010; Turkmenoglu ark., 2015; Baser ve ark., 2001). Bu çalışmada elde edilen aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, *Achillea nobilis* subsp. *denissima* uçucu yağının her iki radikal giderim aktivitesi için orta derecede antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Uçucu yağın bir karışım olarak bulunduğu düşünüldüğünde standartlarla yarışabilir durumda olduğu görülmüştür ve uçucu yağın antioksidan olarak kullanılabilmesi kanaatini oluşturmaktadır.

## SONUÇ

Bu araştırmayla ülkemizde endemik olan *Achillea nobilllis* subsp. *denissima* türünün uçucu yağının bileşenleri ve radikal giderim aktiviteleri belirlendi. Uçucu yağın ana bileşenleri diğer *Achillea* türleri üzerinde yapılan araştırma sonuçlarıyla tamamen uyum içindedir. Uçucu yağ ve bu bitkinin diğer metabolitlerinin çeşitli aktiviteleri üzerine bu çalışmanın dışında başka bir çalışmanın yapılmadığı literatürden anlaşılmaktadır. Geleneksel tıpta kullanılan bu türlerin biyoaktif bileşenlerinin araştırılmasına ve eczacılık sanayinde değerlendirilebilme potansiyelinin ortaya çıkarılmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Baser, K.H.C., Demirci, B., Duman, H., (2001). Composition of the Essential Oils of Two Endemic Species From Turkey: *Achillea lycaonica* and *A.ketenoglu*, *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 37, No. 3.
- Cakilcioglu, U., Khatun, S., Turkoglu, I., and Hayta, S. (2011). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazig-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 469-486.
- Ceylan, A. 1983. Tıbbi Bitkiler-II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No:481, Bornova-İzmir.
- Dei Cas, L., Pagni, F., and Fico, G. (2015). Tradition of use on medicinal species in Valfurva (Sondrio, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 113-134.
- Duru, M.E., Cakır, A., Harmandar, M., (2002). Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey., *Flavour and fragrance journal*, 17, 2, pp.95-98.
- Konyalioglu, S., Karamenderes, C., (2005). The protective effects of *Achillea* L.species native in Turkey against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes, *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 221-227.
- Özdemir, E., and Alpınar, K. (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde - Turkey). *Jornal of Ethnopharmacology*, 166, 53-65.
- Öztürk, M., Tel, G., Öztürk, .F.A., Duru, M.E., (2014) The cooking effect on two edible mushrooms in Anatolia: fatty acid composition, total bioactive compounds, antioxidant and anticholinesterase activities. *Records of Natural Products*,8,2, pp.189-194.
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Kaltalioglu, K., Uluşan, M. D., and Türkmen, Z. (2015). An ethnobotanical study on medicinal plants in Espiye and its surrounding (Giresun-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 163, 1-11.
- Re, R., Pellegrini, N., Protrggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Madicine*, 26: 1231-1237.

- Saeidnia S., Gohari AR., Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F., (2011). A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *DARU* 19, 3.
- Schippmann, U.W.E., Leaman, D., Cunningham, A.B., 2006. A Comparison Of Cultivation And Wild Collection Of Medicinal And Aromatic Plants Under Sustainability Aspects, *Frontis*, 17, 75-95.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., and Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in east anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdir provinces. *Economic Botany*, 51(3), 195-211.
- Shah, A., Bharati, K. A., Ahmad, J., and Sharma, M. P. (2015). New ethnomedicinal claims from Gujjar and Bakerwals tribes of Rajouri and Poonch districts of Jammu and Kashmir, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 166, 119-128.
- Şirin, E. ve Ertuğrul, K. (2015). Büyük Eğri Dağı (Mut, İçel) Ve Çevresinin Endemik Bitkileri, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 40: 50-58.
- Tabanca, N., Demirci, B., Gurbuz, I., Demirci, F., Becnel, J. J., Wedge, D. E., and Baser, K. H. C. (2011). Essential oil composition of five collections of *Achillea biebersteinii* from central Turkey and their antifungal and insecticidal activity. *Natural Product Communications*, 6(5), 701-706.
- Toker, Z., Ozen, H. C., Clery, R. A., & Owen, N. E. (2003). Essential oils of two *Achillea* species from Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 15(2), 100-101.
- Türkmenoglu, F.P., Agar, O.T., Akaydin, G., Hayran, M., & Demirci, B. (2015). Characterization of volatile compounds of eleven *Achillea* species from Turkey and biological activities of essential oil and methanol extract of *A. hamzaoglu* Arabaci et Budak, *Molecules* 20, 11432-11458.
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., and Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(3), 133-152.
- Zonuz, N., Bazı *Achillea* L. (Asteraceae) türlerine ait tohumlarda ağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas (2016).



## Biyomedikal uygulamalar için *Inula viscosa* metanol ekstresi içeren polivinil alkol-niştasta hidrojel

Meltem TAŞ<sup>1\*</sup>, Pınar TERZİOĞLU<sup>2</sup>, Selçuk KÜÇÜKAYDIN<sup>3</sup>, M. Emin DURU<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla, Türkiye

<sup>2</sup> Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Lif ve Polimer Müh. Bölümü, Bursa, Türkiye

<sup>3</sup> Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Muğla, Türkiye

\*tasmeltem@hotmail.com

### Özet

*Inula viscosa* ülkemizde bilinen adıyla kanser otu diğer adıyla yapışkan andız otu Asteraceae familyasına ait çok yıllık tıbbi bir bitkidir. Özellikle halk arasında yara iyileştirmede, solunum yolları enfeksiyonlarında ve ülser gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar antiseptik gibi tıbbi aktiviteye sahiptir. Bu çalışmada, *Inula viscosa* ekstresi içeren polivinil alkol-niştasta hidrojel yara örtüsü uygulamaları için geliştirildi. Çalışmanın ilk kısmında, *Inula viscosa* yapraklarının metanol ile ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen ekstrenin radikal giderim aktiviteleri (DPPH ve ABTS) ve üreaz enzim inhibisyon aktiviteleri test edildi. Metanolün oldukça yüksek radikal giderim (sırasıyla, IC<sub>50</sub>: 42,5 µg/ml ve 10,4 µg/ml) aktivitesine sahip olduğu aynı zamanda 200 µg/ml konsantrasyonda %60,3 oranında üreaz enzimini inhibe ettiği belirlendi. Halk arasında yara iyileştirme ve bazı dermatolojik rahatsızlıklarda geleneksel olarak kullanılan *I.viscosa* yapraklarının metanol ekstresi, yüksek aktiveye sahip olduğu için bu ekstrenin biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere hidrojel üretiminde değerlendirilebileceğini göstermektedir. Bu amaçla, çalışmanın ikinci kısmında, elde edilen hidrojel *in vitro* antiüreaz aktiviteleri test edildi. *Inula viscosa* ekstresinin tek başına gösterdiği aktiviteyi hidrojele eklendiğinde de gösterdiği belirlendi. Hidrojel yapısal karakterizasyonu FTIR ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, *Inula viscosa* ekstresi içeren hidrojel yanık bezi, uzun süreli yatan hastalarda yara örtüsü gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliği göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyolojik aktivite, Kompozit hidrojel, Yara iyileştirme

### *Inula viscosa* methanol extract loaded polyvinyl alcohol-starch hydrogels for biomedical applications

#### Abstract

*Inula viscosa* is a perennial medicinal plant belonging to the Asteraceae family which is known as “kanser otu” or “yapışkan andız otu” in our country. Especially, it is traditionally used for wound healing and the treatment of diseases such as respiratory infections and ulcers. It has medicinal activity such as antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory antiseptic. In the present study, *Inula viscosa* methanol extract loaded polyvinyl alcohol-starch hydrogels were prepared as novel wound dressings. At first, the obtained hexane and methanol extract of *Inula viscosa* was explored using radical scavenging (DPPH and ABTS) and urease enzyme inhibition methods. When both extracts were compared, it was determined that methanol extract had very high radical scavenging ability (IC<sub>50</sub>: 42.5 µg/mL and 10.4 µg/mL respectively) along with the urease enzyme inhibition by 60.3% at 200 mg / mL concentration. In the next step, the biological activities and structural evaluation of hydrogels were investigated. The results showed that the *Inula viscosa* incorporated PVA/starch hydrogels can be effectively applied for burn wounds and other potential wound healing applications.

**Keywords:** Biological activity, Composite hydrogel, Wound healing

## GİRİŞ

Hidrojeller, özellikle yara iyileştirme uygulamaları için biyomalzemeler olarak büyük dikkat çeken çapraz bağlı hidrofilik polimerlerdir. Hidrojeller, sulu ortamda bırakıldıklarında çözünmeyen, suyun büyük miktarını bünyesinde tutarak şişme özelliği gösteren, çok sayıda hidrofilik gruplar içeren, üç boyutlu-ağ yapılı polimerlerdir. Su sever olmaları nedeniyle “hidrofil polimerler” olarak da adlandırılırlar. Çapraz bağlı polimerdeki su sever grupların fazla sayıda olması daha fazla şişmeye sebep olur. Yapılarında çok fazla su tutabilme özelliğine sahip hidrojeller ayrıca yumuşak ve esnek yapıda olmaları dolayısıyla canlı dokularla çok büyük benzerlikler göstermektedirler. Hidrojeller; kontak lenslerde, yara örtülerinde, ilaç salımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hidrojel örtüler; kuru yara yüzeyine uygulandıklarında, yarayı nemlendirerek yaranın iyileşmesi için nemli yara ortamı yaratmaktadırlar. Bu örtüler, yara yüzeyine yüzeysel olarak ilaç kullanılmasına da olanak sağlamaktadır. Ayrıca; ağrı dindirici özelliğe sahiptirler ve yaranın ısısını düşürerek serinletici bir etki yaratırlar (Koyutürk ve ark., 2016).

Polivinil alkol (PVA), biyoyumlu hidrojellerin hazırlanması için yaygın olarak kullanılan ideal bir biyobozunur polimerdir. Fakat PVA'nın yetersiz elastiklik, sert membran ve çok sınırlı hidrofiliklik gibi özellikleri yara sarıcı polimerik malzeme olarak tek başına kullanımını kısıtlamaktadır (Kamoun ve ark. 2015). Bu yüzden, özel uygulamalar için özelliklerinin geliştirilmesi için PVA'nın farklı polimer ile harmanlanması gerekmektedir. Polimerler arasında, nişasta, bu amaç için değerlendirilebilen düşük maliyetli, modifikasyonu kolay ve biyoyumlu bir polisakkarittir. Öte yandan, doğal biyoaktif ekstrelerin hidrojel sistemine dahil edilmesi biyoaktif malzemelerin eldesi için güncel yaklaşımlar arasındadır.

Ekolojik denge içinde bitkiler dünya hayatının devam etmesi için doğal bir unsur olarak canlı hayatında önemli bir yere sahiptir. İnsanlar çok eski zamanlardan beri bitkilerden gıda, kozmetik ve tedavi amaçlıda yararlanmışlardır. Son yıllarda, bitkilerin sağlık alanında etkin bir şekilde kullanımlarına yönelik yeni yöntem geliştirme ve araştırmalara olan ilgi dünya çapında artmaktadır. Tıbbi bitkiler, günümüzde birçok hastalığa karşı kullanılan ilaçların doğal kaynağıdır (Vital, 2010). Bitkilerin elde edilen flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin, berberin, kinin gibi etken maddeler kimyasallar enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Njume ark., 2009; Hussain, 2011). Bitkiler, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antikanser gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Antioksidan içeren bileşiklerin yara iyileşmesi ve dokuların oksidatif hasardan korunması için faydalı olacağı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kumar, 2007). Asteraceae familyasında yer alan *Inula* L. cinsi içerdiği yaklaşık 100 tür ile Asya, Afrika, Avrupa ve yaygın olarak da Akdeniz Bölgesinde yayılış göstermektedir. *Inula* türleri genellikle çok yıllık bitkilerdir. Türkiye'de 7'si endemik 27 tür bulunmaktadır. *Inula* türleri içerik bakımından incelendiğinde; terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler), flavonoidler, glukolipitler ve antranilik asit türevi gibi kimyasal bileşikler içermektedir. (Zhao ve ark., 2006) *Inula* cinsinin dünyada yaygın olmasının yanısıra, birçok türü geleneksel halk ilacı olarak kullanılmaktadır ve antibakteriyel, antiproliferatif, hepatoprotektif, antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuvar gibi etkilere sahiptir (Gökbulut, 2011). *Inula* cinsinin bir türü olan tıbbi bir bitki olan *Inula viscosa* (L) Ation, ülkemizde de “yapışkan andız otu” olarak bilinmektedir ve Akdeniz ve çevresinde yayılış göstermektedir. Dayanıklı, uzun ömürlü aromatik bir bitkidir (Mohammad ve ark.,2015) *I. viscosa* uzun yıllardır geleneksel tıpta dünyanın çeşitli bölgelerinde farklı kullanım amaçları vardır (Çelik ve ark., 2010). Özellikle yara tedavisinde, diüretik, antiinflamatuvar, ateş düşürücü, antiseptik, romatizmal ağrıların giderilmesinde, kas gevşetici olarak (Özkan ve ark., 2015) ve diyabetik hastalıklarda (Yaniv ve ark., 1985) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, *Inula viscosa* metanol ekstresi içeren PVA-nişasta hidrojellerin yenilikçi biyomalzemeler olarak geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, öncelikle *Inula viscosa* bitkisinin farklı ekstrelerinin aktiviteleri incelenerek hidrojel üretimi için uygun ekstre belirlendi. Hidrojellerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu ve üreaz enzim inhibisyonu aktivitesini incelendi.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Inula viscosa*, Muğla ve civarından çiçeklenme döneminde tarafımızca toplandı ve metanol ile oda şartlarında ekstraksiyonu yapıldı. Kimyasal olarak PVA (ZAG Kimya), nişasta (Piyale) sitrik asit (Hocahanım) ve glutraldehit kullanıldı.

## Ekstrelerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

### DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

*Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin serbest radikali giderim aktivitesi DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) serbest radikali kullanılarak belirlendi. 500 µg ile 4000 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren ekstrenin üzerine etanolde çözülmüş %0,004'lük DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansı ölçüldü. Ekstrenin absorbans değeri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

$A_{\text{Kontrol}}$  kontrolün absorbansı,  $A_{\text{Örnek}}$  örneğin absorbansıdır.

### ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

*Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin katyon radikali giderim aktivitesi ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) kullanılarak belirlendi. 7 mM ABTS 2.45 mM K<sub>2</sub>SO<sub>8</sub> ile etkileştirilerek 5 ml ABTS radikali oluşturuldu. Katyon radikalının oluşması için karışım 16 saat karanlıkta bekletildi. Bu radikal çözeltisinden 1 mL alınarak absorbansı 0,700' e etanol ile seyreltilerek ayarlandı. 500 µg ile 4000 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine etanolde hazırlanmış ABTS çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyondan sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Ekstrenin absorbans değeri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{ABTS}^+ \text{ Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

$A_{\text{Kontrol}}$  kontrolün absorbansı,  $A_{\text{Örnek}}$  örneğin absorbansıdır.

### Üreaz Enzim İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

*Inula viscosa*'nın methanol ekstresinin üreaz enzimi inhibisyon aktivitesi indefenol metodu kullanılarak reaksiyon sonucunda oluşan amonyağın ölçülmesiyle spektroskopik olarak belirlendi. Substrat olarak üre kullanıldı ve 96 kuyucuklu mikropalakaların her bir kuyucuğuna farklı konsantrasyonlardaki örneklerden 10 µL, 25 µL üreaz enzimi çözeltisinden ve 50 µL üre ilave edildi ve kontrol olarak 10 µL saf su kullanıldı. 30 °C de 15 dk inkübasyona bırakılıp daha sonra fenol ve sodyumnitropurissit içeren fenol reaktifinden 45 µL, sodyumhidroksit ve sodyumhipokloröz içeren alkali reaktifinden 70 µL eklenip 50 dakika sonra 630 nm'de absorbansı ölçüldü.

### Polivinil Alkol/Nişasta Hidrojelin Hazırlanması

PVA, ve nişasta esaslı hidrojel döküm yöntemi ile hazırlandı. Nişasta (1g) saf suda (20 mL) jelleştirildi. Polivinil alkol (4 g) saf suda (20 mL) manyetik karıştırıcıda, 70 °C'de iki saat karıştırıldıktan sonra jelleşen nişastaya ilave edildi. Homojen bir çözelti elde etmek için karışım 50 °C'de 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra 1 mL %10'luk methanol ekstresi ve sitrik asit çözeltisi (0.5 g/10 mL saf su) ilave edildi. Tüm karışım 10 dakika daha karıştırıldıktan sonra çapraz bağlayıcı olarak gluteralehit (25µL) ilave edildi. Polimer çözeltisi cam petri kalıba (9 cm) dökülerek, etüvde 50°C'de 3 saat kurutuldu. Polimer hidrojel ağzı kilitli plastic torbalarda analize kadar saklandı. Kontrol numunesi olarak ekstre içermeyen PVA-nişasta hidrojel numunesi hazırlandı.

### Hidrojellerin Şişme Davranışları

Jellerin şişme davranışlarını belirlemek için, şişme kapasiteleri (su absorpsiyon kapasiteleri) belirlendi. Öncelikle bilinen miktarda hidrojel oda sıcaklığında (25 °C) saf su içeren behere tamamen daldırıldı ve hidrojel dengeye gelinceye kadar, bekletildi. Hidrojel belli zaman aralıklarında saf sudan çıkarıldı ve yüzey suyu hafifçe süzgeç kağıdı ile alındıktan sonra tartıldı. Hidrojelin şişme değeri ( $Qt$ ) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$Q_t = (W_t - W_0) / W_0$$

Burada,  $Q_t$   $t$  anındaki şişme değerini (g H<sub>2</sub>O/ g jel),  $W_t$  ve  $W_0$  sırasıyla  $t$  anındaki şişmiş ve başlangıçtaki kuru hidrojel tartımındadır (g).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

*Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin ABTS ve DPPH yöntemleri ile elde edilen antioksidan aktivite sonuçları Tablo 1'de özetlenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre metanol ekstresi ABTS katyon radikali giderimi bakımından yüksek aktivite göstermiştir.

**Tablo 1.** *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin radikal giderim aktivitesi

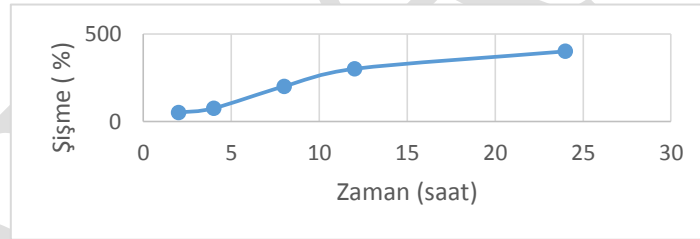
ABTS	IC <sub>50</sub> : 10,4 µg/mL
DPPH	IC <sub>50</sub> : 42,5 µg/mL

Bu çalışmada *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin üreaz enzim inhibisyon aktivitesi araştırıldı (Tablo 2).

**Tablo 2.** *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin üreaz enzim inhibisyon aktivitesi

Üreaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi (% İnhibisyon)				
Kod	25µg/ml	50µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
<i>Inula viscosa</i> Metanol	19,86	31,25	47,95	60,19

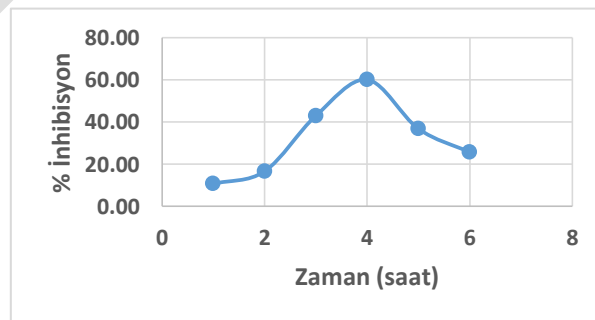
*Inula viscosa* metanol ekstresi- PVA-niştasta hidrojelın şişme davranışının zamanla arttığı, 24 saat sonunda ise maksimum düzeye ulaştığı görülmüştür (Şekil 1).



**Şekil 1.** *Inula viscosa* metanol ekstresi- PVA-niştasta hidrojelın zamana göre şişme değerleri

**Tablo 3.** *Inula viscosa* metanol ekstresi-PVA-niştasta hidrojelın üreaz enzim inhibisyon aktivitesi

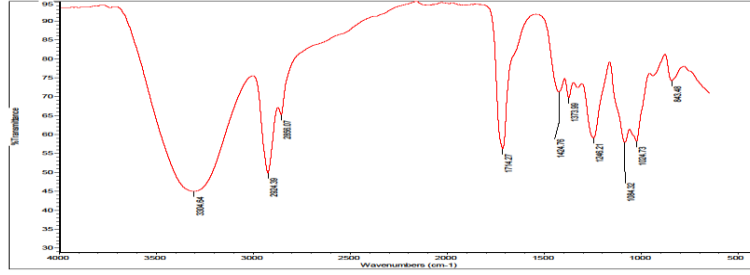
Üreaz Enzim İnhibisyon Aktivitesi (% İnhibisyon)						
Kod	1 saat	2 saat	4 saat	8 saat	12 saat	24 saat
İVM	10.65	16.58	43.01	60.12	36.78	25.67



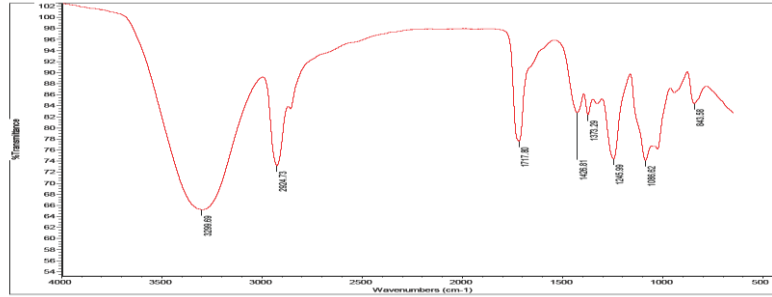
**Şekil 2.** *Inula viscosa* metanol ekstresi- PVA-niştasta hidrojelın üreaz enzim inhibisyon aktivitesinin zamanla değişimi

## PVA-Nişasta Hidrojellerin IR Spektrumları

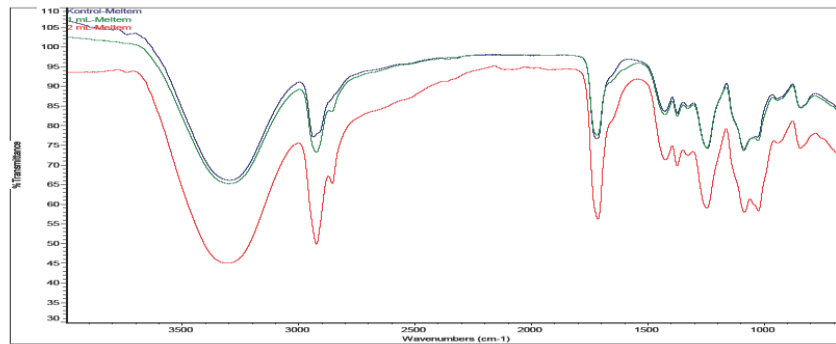
IR spektrum (Termo) cihazı kullanılarak 5000-500  $\text{cm}^{-1}$  aralığında elde edilen *Inula viscosa* metanol ekstresinin, *Inula viscosa* metanol ekstresi-Pva-nişasta ve Pva-nişasta hidrojellerinin IR spektrumu şekil 3-5'te verilmektedir. Spektrumlarda 3300  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pik serbest hidroksillerin O-H gerilmesini temsil etmektedir. PVA-nişasta hidrojeline ait IR spektrumu incelendiğinde 2924  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik CH gruplarını gösterirken 1426  $\text{cm}^{-1}$  ve 1086  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler sırasıyla aromatik ve alifatik aminlere ait C-C ve C-N gerilmelerini temsil etmektedir (Abirami ve ark., 2019). 842  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik granüler nişastadaki - C - O - C - halka titreşimidir (Das ve ark., 2010). *Inula viscosa* metanol ekstresi-Pva-nişasta ve Pva-nişasta hidrojellerinin IR spektrumu karşılaştırıldığında bazı pik yerlerindeki kucuk kaymalar ve band şiddetlerindeki değişimler ekstrenin hidrojelin yapısına başarılı bir şekilde dahil olduğunu gostermektedir.



şekil 3. *Inula viscosa* metanol ekstresinin IR spektrumu



şekil 4. *Inula viscosa* metanol ekstresi-PVA-nişasta hidrojelin IR spektrumu



şekil 5. *Inula viscosa* metanol ekstresi-Pva-nişasta ve Pva-nişasta hidrojellerinin IR spektrumu

## SONUÇ

Bu çalışmada, *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin radikal giderimi ve üreaz enzimi bakımından yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. *Inula viscosa* ekstresi- PVA- nişasta hidrojelin 2-8 saat arasında salımının logaritmik bir artışla gerçeşleştiği, 8. saatte en yüksek salıma sahip olduğu, hidrojellerin suda şişme davranışları incelendiğinde 24 saatte bozunmaya başladığı belirlendi. IR spektrumu sobuçlarına göre *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin 2800 ve 1050 titreşim bantlarında Pva-nişasta hidrojeli ile etkileştiği görüldü.Yapılan bu çalışmada, *Inula viscosa*'nın metanol ekstresinin biyopolimer esaslı malzemelerde

biyoaktif madde olarak kullanılabilmesi, PVA-nişasta hidrojellerin bitkisel biyoaktif bileşiklerle birlikte yara örtüsü olarak değerlendirilebileceği kanaati oluşmuştur. Bu yaklaşımla, ülkemizin geleneksel tıpta kullanılan bitkisel ürünlerin biyomalzemede kullanımı konusundaki çalışmaların artırılmasına ihtiyaç olduğu düşünölmektedir. Elde edilen sonuçlar, *Inula viscosa*'nın PVA / nişasta hidrojellerinin yanık yaraları ve diğer potansiyel yara iyileşme uygulamaları için etkili bir şekilde uygulanabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Abirami M, Shayanthi S S, Rajendran R 2019. Synthesis and Characterization of PVA Based Sericin Film for Antibacterial Wound Dressing. *IJPSR.*,10(2): 875-880.
- Das K, Ray D, Bandyopadhyay N R, Gupta A, Sengupta S, Sahoo S 2010. Preparation and characterization of cross-linked starch/poly(vinyl alcohol) green films with low moisture absorption. *Ind. Eng. Chem. Res.*,49:2176–2185.
- Gökbulut A 2011. Türkiye'de yetişen bazı *Inula L.* türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar, Ankara Ü niversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü, Farmakoknozi anabilim dalı, Doktora tezi
- Hussain T, Arshad M, Khan S, Satar H, Qureshi MS 2011. *In vitro* screening of methanol plant extracts for their antibacterial activity. *Pak. J. Bot.*, 43:531-538.
- Kamoun EA, Chen X, Eldin MSM, Kenawy ERS 2015. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, *Arab. J. Chem.* 8:1–14.
- Koyutürk A, Soyaslan D 2016. Yara ve yanık tedavisinde kullanılan örtüler, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Özel Sayı 1: 58-65.
- Kumar B 2007. Ethnopharmacological approaches to wound healing: Exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 103–113.
- Al-Masri M I, Sharawi S M, Barakat R M 2015. Effect of clammy *inula (inula viscosa)* plant extract in combination with a low dose of the fungicide iprodione on botrytis cinerea *in vitro* and *in vivo*, *American Journal of Plant Sciences*, 6: 1519-1526.
- Njume C, Afolayan AJ, Ndip RN 2009. An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of Helicobacter pylori Infections. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 3:685-699.
- Vital PG, Velasco JRN, Demigillo JM, Rivera WL 2010. Antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of Ficus septica Burm and Sterculia foetida L. leaf extracts. *J. Med. Plants Res.*, 4:058-063.
- Zhao YM, Zhang ML, Shi QW, Kiyota H 2006. Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chem Biodivers.*, 3:371-384.

## Lipofilik ve Hidrofilik Antioksidan Bileşiklerinin Nano-Mangan Dioksit Esaslı Aktivite Ölçümü

Kader Can<sup>1,2\*</sup>, Ayşem Arda<sup>2</sup>, Reşat Apak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul, Türkiye.

\*Sorumlu yazar e-mail: [kader.can@ogr.iu.edu.tr](mailto:kader.can@ogr.iu.edu.tr)

### Özet

Serbest radikaller kanser, kardiyovasküler hastalık, katarakt, bağışıklık sistemi azalması, beyin fonksiyon bozukluğu gibi pek çok hastalıklara neden olacak potansiyele sahip olması nedeniyle son yıllarda tehlike arz eden bir konu haline gelmiştir. Günümüzde bir çok doku hasarı ve hastalıklara neden olan bu serbest radikallerin stabilize edilmesinde veya devre dışı bırakılmasında görev alan antioksidanlar büyük bir öneme sahiptir. Son yıllarda toplam antioksidan aktivite/kapasite tayini için birkaç yeni analitik yaklaşım denenmiştir ve genel olarak antioksidanların tayininde düşük maliyetleri, kolay kullanımları, analitin hızlı tayin edilebilmesi ve yüksek hassasiyet gibi avantajları nedeniyle nanoparçacık temelli sensörler kullanılmıştır. Bu nedenle bu çalışması kapsamında antioksidan bileşiklerin dolaylı aktivite ölçümü için mangan dioksit nanopartikül temelli spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin prensibi; mangan dioksit nanopartiküller ile kromofor bir reaktif olan 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) arasında meydana gelen redoks tepkimesi sonucu oluşan TMB<sup>+</sup> katyonunun (nano prob) hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar varlığında renk şiddetinde ( $\lambda_{max}=650$  nm) meydana gelen azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır. Geliştirilen yöntemin güvenilirliği ve hassasiyetini tanımlayan lineerlik, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım parametreleri test edilerek yöntemin validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile çalışılan antioksidanların tayin sınırları (LOD)  $1,23 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> ile  $1,71 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> arasındadır. Geliştirilen yöntemde çeşitli antioksidan bileşiklerin trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri hesaplanılarak elde edilen sonuçlar orijinal ABTS yöntemi sonuçlarıyla Spearman korelasyon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Hazırlanan ikili ve üçlü sentetik karışımlara geliştirilen nanoproba uygulanarak teorik olarak beklenen aktivite değerleri ile deneysel olarak bulunan değerler (mM TR) değerlendirilmiştir. Son olarak yeşil çay ve portakal suyu örneklerine saf antioksidan bileşiklerin uygun konsantrasyonlarda katkıları yapılarak geliştirilen yöntem ile antioksidan miktar tayinleri yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mangan dioksit nanopartikül (MnO<sub>2</sub>NP), antioksidan aktivite, kolorimetrik sensor, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)

### Measurement of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Activity Based on Nano-Manganese Dioxide

#### Abstract

Free radicals have become the subject of many investigations in recent years, as they have the potential to cause many diseases such as cancer, cardiovascular disease, cataract, immune system reduction, and brain dysfunction. Nowadays, antioxidants that are involved in stabilizing or disabling these free radicals, which cause many tissue damage and diseases, are of great importance. In recent years, several new analytical approaches have been tried for total antioxidant activity / capacity determination and nanoparticle based sensors have been used in the determination of antioxidants in general due to their low costs, easy usage, rapid determination of analyte and high precision. For this reason, a manganese dioxide nanoparticle based spectrophotometric method was developed for the indirect activity measurement of antioxidant compounds. The developed method is based on the measurement of the decrease in the color intensity ( $\lambda_{max}=650$  nm) of TMB<sup>+</sup> cation (nano probe) in the presence of hydrophilic and lyophilic antioxidants. TMB<sup>+</sup> cation is obtained via redox reaction between manganese dioxide particles and a chromophore reactant: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) under pen air. The linearity, repeatability and recovery parameters that define the reliability and precision of the developed method were tested and the method was validated. Limit of detection (LOD) thresholds of the antioxidants worked with the developed method are in the range of  $1.23 \times 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> and  $1.71 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. In the developed method, the results of various antioxidant compounds as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values were calculated and the results were compared with those of the original ABTS method using the Spearman rank correlation test. The developed nano probe was applied to the binary and ternary synthetic mixtures and the experimental and theoretical

activity values (mM TR) were evaluated. Finally, the antioxidant amount was determined by the method developed by standard addition of the pure antioxidant compounds in appropriate concentrations to the green tea and orange juice samples.

**Keywords:** Manganese dioxide nanoparticles (MnO<sub>2</sub>NP), antioxidant activity, colorimetric sensor, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)

## GİRİŞ

Aerobik organizmalarda normal oksijen metabolizması sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikaller, dış orbitalin de bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olup son derece reaktif olan atom ya da moleküllerdir. Çevre kirliliği, radyasyon, kirli sular, pestisitler ve canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi birçok etmen kaçınılmaz olarak serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Diplock, 1998). Serbest radikaller, dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron (ları) bulunan yüksek oranda reaktif atomlar veya moleküllerdir (Chandrasekaran ve ark., 2017) Hücreler sürekli olarak serbest radikalleri ve metabolik işlemlerin bir parçası olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir (Leeuwenburgh ve Heinecke, 2001). ROS serbest radikalleri ve radikal olmayan türleri içerir. Serbest radikaller eşleşmemiş bir elektron taşır ve kararsız ve reaktifdir. Bunlar arasında hidroksil radikali olan süperoksit, nitrik oksit ve en reaktif ve toksik ROS bulunur. Radikal olmayan oksidanlar, çeşitli kimyasal reaksiyonlar yoluyla dokularda serbest radikaller oluşturan hidrojen peroksit, singlet oksijen ve ozonu içerir (Borek, 1993).

Oksidatif gerilim, söz konusu reaktif oksijen/azot türlerinin (ROS/RNS) lipid, protein, DNA gibi biyolojik makromoleküllerin oksidatif modifikasyonu sonucu doku hasarına yol açarak organizmanın antioksidatif savunmasını bastıran ve birçok hastalığın temeli olan hücre ölümü hızlandıran patolojik bir durumdur. ROS ve RNS, insanlar için vücut içi dengeyi (homeostaz) ve sağlığı korumak açısından gereklidir, ancak kontrolsüz ve fazla ROS/RNS, kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma dahil çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli rol oynar (Apak ve ark., 2016). İnsan organizması aşırı ROS ve RNS seviyelerini dengelemek ve oksidatif gerilimi gidermek için 'antioksidatif savunma sistemleri' olarak adlandırılan savunma sistemleri geliştirmiştir. Antioksidan savunma sistemleri; serbest radikallerin ilk üretiminin engellenmesi, oksidanları daha az toksik bileşiklere dönüştürme, ikincil toksik metabolitlerin üretiminin bloke edilmesi, ikincil oksidanların zincir yayılımının engellenmesi gibi birçok işlevi vardır. Çeşitli hastalıklara yol açabilen oksidatif gerilim ile mücadele etmenin en önemli yollarından biri de radikal süpürücü bileşiklerce zengin gıdaların mevcut olduğu bir beslenmedir. Birçok çalışma meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oluşumunu engellediğini belirtmiştir.

Gıda numunelerinde antioksidan kapasite ve total fenolik içeriğini değerlendirmek için son yıllarda birkaç yeni analitik yaklaşım denenmiştir. Son zamanlarda, genel olarak araştırma kaynaklarının kullanımını modernleştirmek amacıyla duyarlı, hızlı, kolay, nispeten ucuz cihaz gerektiren ve küçük hacimlerle çalışmaya imkan sağlayan yöntemlere özel ilgi gösterilmektedir. Bu bakımdan nanoyapılar birkaç polifenolik bileşik sensöründe ve algılama stratejisinde kullanılmıştır. Farklı bilimsel makaleler ve incelemeler (Del Carlo ve ark., 2008; Hayat ve ark., 2014; Alarcon-Angeles ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2017), bu malzemelerin avantajlarını ve iyileştirmelerini vurgulayan bu nano-temelli yaklaşımın kullanımını ortaya koymuştur. Nanoyapılar ve işlevselleştirilmiş nanoyapılar, daha yüksek hassasiyet, kararlılık ve seçicilik sergileyen biyoalgılama performansını geliştirmek için katalitik araçlar, immobilizasyon platformları ve optik veya elektroaktif sensörler olarak kullanılmaktadır. Gıda antioksidanları için prob olarak kullanılan nanoparçacıkların çoğu uygulamaları altın (Au), gümüş (Ag), magnetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) titanya (TiO<sub>2</sub>) ve mangan dioksit (MnO<sub>2</sub>) nanoparçacıkları ve kuantum dotların (QD) kullanımı ile ilişkilidir (Pérez-López ve ark., 2011).

Literatürde metal oksit nanopartikül esaslı ile antioksidan aktivite tayini için spektrofotometrik tayin yöntemleri mevcuttur ancak bu yöntemlerin tayin hassasiyeti düşüktür ve hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidan tayini için seçimli değildir. Bu bağlamda geliştirilecek nanopartikül temelli antioksidan tayin yönteminin bu açığı kapatmada son derece önemli olacağı düşünülmektedir. Literatürlerdeki mevcut olan bu eksikleri gidermek amacıyla antioksidan aktivite ölçümü için hızlı, maliyeti düşük ve kolay uygulanabilir mangan dioksit nanopartikül temelli bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Antioksidanların aktivite ölçümü için geliştirilen yöntemin tayin prensibi, sentezlenmiş mangan dioksit nanopartiküller ve kromofor bir reaktif olan 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) arasında meydana gelen redoks tepkimesi sonucu oluşan mavi



renkli TMB kationunun (nano prob) hidrofilik, lipofilik ve tiyollu antioksidanların varlığında mavi renginin azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Kullanılan Cihazlar**

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; Shimadzu AUX320 marka analitik terazi, Millipore Direct-Q 8UV marka ultra saf su cihazı, Wiseclean ultrasonik banyo, pH ayarlamaları için kullanılan Mettler Toledo Seven Compact pH metre, Wisd WiseBath su banyosu, IKA YellowLine MSH Basic manyetik karıştırıcı ısıtıcı, DAIHAN WiseVen vakum etüvü absorbans ölçümlerinin yapılması için kullanılan Hellma SUPRASIL 10 mm ışımaya yollu kuartz küvet, absorbans ölçümleri ve spektrumların eldesi için Shimadzu UV-1800 marka UV spektrofotometredir.

### **Kimyasal Maddeler**

Kullanılan kimyasal maddeler; potasyum permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ), 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), L-askorbik asit (AA),  $\alpha$ -tokoferol (TOC), trolox (TR), sitrik asit, sodyum sitrat, etil alkol (EtOH) (Sigma-Aldrich, HPLC saflıkta) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

### **Çözeltilerin Hazırlanması**

Çalışma boyunca kullanılan antioksidanlardan askorbik asit çözeltisi ultra saf suda,  $\alpha$ -tokoferol çözeltisi ise HPLC saflıktaki etanol de hazırlanmıştır. Hazırlanan antioksidan çözeltileri uygun stoklarda hazırlanmış ve gereken bütün seyreltmeler hazırlanan stok çözelti üzerinden yapılmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden ultra saf suda hazırlanan 4 °C'de, HPLC saflıktaki etanol de hazırlanan stok çözelti ise -18°C'de saklanılarak muhafaza edilmiştir.

### **Antioksidan Aktivite Tayini İçin Mangan Dioksit Nanopartikül Esaslı Sensörün Geliştirilmesi**

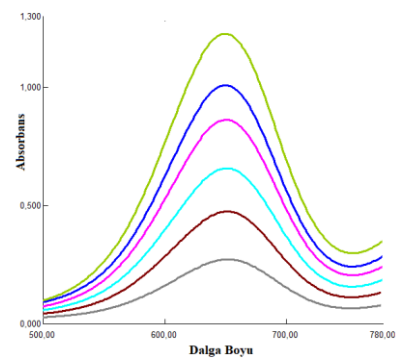
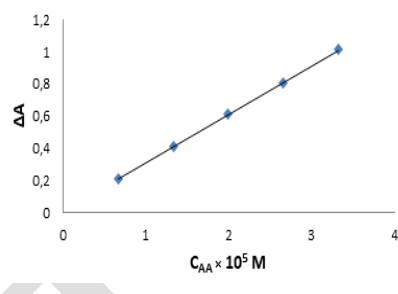
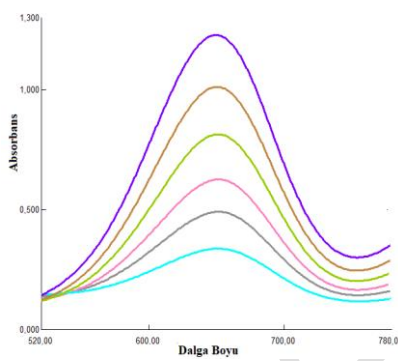
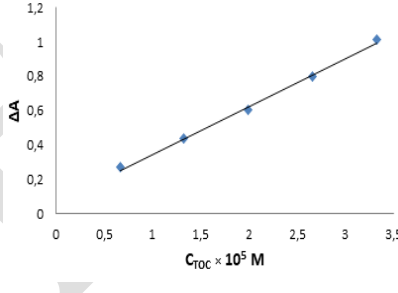
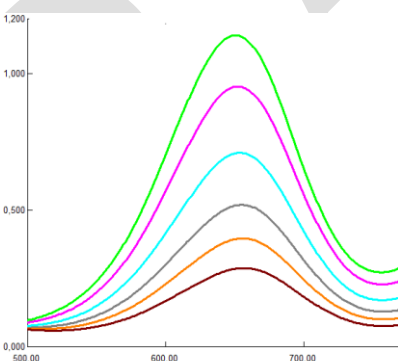
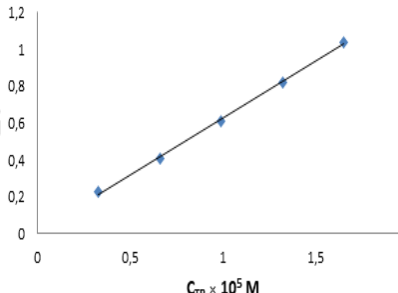
Mangan dioksit nanopartikül temelli sensörün geliştirilmesi için bir deney tüpüne 0,05 g  $\text{MnO}_2$ -NPs, 2 mL sitrat tamponu ve 0,2 mL TMB eklendi ve son hacim 3 mL olacak şekilde etil alkol ile tamamlama yapıldı.  $\text{MnO}_2$  nanopartikülleri TMB reaktifinin oksidasyonuna neden olduğundan son durumda berrak mavi çözelti (prob) oluşur. Geliştirilen  $\text{MnO}_2$  nanopartikül esaslı antioksidan tayin yönteminde, hazırlanan prob çözeltisinden deney tüpü içerisine 2 mL alınır ve üzerine her bir antioksidan farklı çalışma aralığında olacak şekilde eklenilir ve 30 dakika oda koşullarında bekletildi. 30 dakika sonunda prob ve antioksidan arasında meydana gelen redox tepkimesi sonucu meydana gelen okside antioksidanlar varlığında örnek çözeltisinin absorbansında bir azalma gözlemlendi. Absorbanstaki bu azalış,  $\Delta A$ , uygun reaksiyon süresi sonunda UV/görünür bölge spektrofotometresinde 650 nm dalga boyunda referans çözeltiye karşı absorbans ölçümü yapıldı.

## **BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **Geliştirilen Yöntemin Askorbik Asit, $\alpha$ -Tokoferol ve Troloks Bileşiklerine Uygulanması**

Geliştirilen yöntemin çalışılan antioksidanlara uygulanarak her bir antioksidan için çalışma aralıkları belirlendi ve kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol ve troloks'a ait doğru denklemleri oluşturulup, LOD değerleri hesaplanmıştır. Antioksidan bileşiklerinin geliştirilen yöntem ve ABTS yöntemine göre bileşiklerin troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri hesaplanmıştır. TEAC değerleri antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayılarının troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısına oranı şeklinde hesaplanmıştır.

**Tablo 29.** Antioksidan bileşiklerinin görünür alandaki kalibrasyon spektrumları ve kalibrasyon grafikleri.

Gıda Antioksidanları	Görünür Alan Bölgesindeki Kalibrasyon Spektrumları	Kalibrasyon Grafikleri
Askorbik Asit		
α-Tokoferol		
Troloks,		

**Tablo 2.** Antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, LOD değerleri, antioksidan bileşiklerinin geliştirilen yöntem ve ABTS yöntemine göre TEAC değerleri.

Gıda Antioksidanları	Doğru Denklemleri ve Korelasyon Katsayıları	LOD (M)	TEAC (Geliştirilen Yöntem)	TEAC(ABTS)
Askorbik Asit (AA)	$\Delta A = 1.02 \times 10^4 c + 0.0875$ $r = 0.9985$	$1,23 \times 10^{-9}$	0,81	1,03
$\alpha$ -Tokoferol ( $\alpha$ -TOC)	$\Delta A = 2.87 \times 10^3 c + 0.0624$ $r = 0.9967$	$1,71 \times 10^{-7}$	0,72	1,02
Troloks (TR)	$\Delta A = 2.31 \times 10^4 c + 0.1062$ $r = 0.9983$	$3,08 \times 10^{-8}$	1,0	1,0

### Geliştirilen Yönteme Uygulanarak İkili ve Üçlü Sentetik Karışımlar Uygulanarak Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Değerlerinin Bulunması

Tablo 3’de verildiği konsantrasyonlarda hazırlanan antioksidan çözeltilerden farklı kombinasyonlarda hazırlanan ikili ve üçlü sentetik karışımların geliştirilen yöntem uygulanarak teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri bulunmuş ve % hataları hesaplanmıştır.

**Tablo 3.** İkili sentetik antioksidan karışımlarının teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri.

İkili ve Üçlü Antioksidan Sentetik Karışımlar	Beklenen Kapasite Değerleri (M TR)	Bulunan Kapasite Değerleri (M TR)	%Hata
$1 \times 10^{-4}$ M Askorbik Asit $1 \times 10^{-4}$ M $\alpha$ -Tokoferol	$1,29 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-5}$	1,34
$1 \times 10^{-4}$ M Askorbik Asit $1 \times 10^{-4}$ M $\alpha$ -Tokoferol $1 \times 10^{-4}$ M Troloks	$1,53 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-5}$	1,64

### Standart Katkı Yöntemi ile Yeşil Çay (Camellia sinensis) ve Portakal Suyunun Geliştirilen Yönteme Uygulanması

Standart katkı metoduyla yeşil çay ekstraktına ve portakal suyuna askorbik asit katkıları yapılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TAK) hesaplanmıştır. Deneysel çalışma sonucu elde edilen absorbans farkından yararlanılarak, troloks eşdeğeri cinsinden derişim hesabı denklem 1’e göre hesaplanmıştır.

$$TAK = \frac{mM \text{ Troloks eşdeğeri} \times \text{örnek hacmi (L)} \times \text{Seyrelme Faktörü}}{\text{örnek miktarı}} \quad (1)$$

**Tablo 0.** Yeşil çay ve portakal suyunun troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri.

Örnek	TAC
Yeşil Çay (Camellia sinensis)	0,39 mmol Tr/g
Portakal suyu	0,65 mM Tr

## SONUÇ

Geliştirilen yöntemde askorbik asit,  $\alpha$ -tokferol ve troloks bileşiğine ait spektrumlarda (bkz. Tablo 1) görüldüğü gibi maksimum absorpsiyon elde edilen dalgaboyu 650 nm olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde askorbik asit,  $\alpha$ -tokferol ve troloks bileşiğine ait kalibrasyon doğruları oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrularından yararlanılarak elde edilen antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri bulunmuştur (bkz. Tablo 2). Askorbik asit  $\alpha$ -tokferol ve troloks bileşiğinin geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD değerleri  $1,23 \times 10^{-9}$  ile  $1,71 \times 10^{-7}$  M arasındadır. Çalışılan antioksidan bileşiklerin sentetik çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda geliştirilen yöntem uygulandığında teorik olarak beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite değerlerinin (mM TR) birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (bkz. Tablo 3).

## KAYNAKLAR

- Alarcon-Angeles G, Álvarez-Romero G.A, Merkoçi A 2016. Emerging nanomaterials for analytical detection. *Compr. Anal. Chem.*, 74: 195–246.
- Borek C 1993. Molecular mechanisms in cancer induction and prevention. *Environmental health perspectives*, 101(3): 237-245.
- Chandrasekaran A, Idelchik M. D. P. S, Melendez J. A 2017. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox biology*, 11: 91-102.
- Del Carlo M, Compagnone D 2008. Recent advances in biosensor technology for food safety. *Agro Food Ind. Hi-Tech*, 19: 32–35.
- Diplock A.T, Charuleux J.L, Crozier-Willi G, Kok F.J, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80(1): 77-112.
- Hayat A, Catanante G, Marty J 2014. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors*, 14(12): 23439-23461.
- Leeuwenburgh C, Heinecke J. W 2001. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medicinal chemistry*, 8(7): 829-838.
- Pérez-López B, Merkoçi A 2011. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22(11): 625-639.
- Wang Y.T, Lu A.H, Zhang H.L, Li W.C 2011. Synthesis of nanostructured mesoporous manganese oxides with three-dimensional frameworks and their application in supercapacitors. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(13): 5413-5421.
- Zhu C, Yang G, Li H, Du D, Lin Y 2014. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures. *Analytical chemistry*, 87(1): 230-249.

## Magnetit nanoparçacıklar varlığında nitroaromatik enerjetik madde trinitrotoluenin spektroskopik tayini

Batuhan Yardımcı<sup>1,2\*</sup>, Ayşem Arda<sup>2</sup>, Jülide Hızal Yücesoy<sup>3</sup>, Reşat Apak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul, Türkiye.

<sup>3</sup>Yalova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya ve Süreç Mühendisliği Bölümü, Yalova, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:batuhanyardimci@hotmail.com

### Özet

Bu çalışmada nanopartiküllerin küçük boyut ve geniş yüzey alanı özelliklerinden yararlanılarak ve bu özellikler doğrultusunda nanopartikülleri modifiye ederek, çevresel ortamdaki patlayıcı kalıntıların eser analizi karmaşık matrislerde duyarlı ve seçimli patlayıcı analizi için basit, ucuz ve hassas kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Magnetit nanopartiküllerin yüzeyi organik amin bileşiği ile fonksiyonelleştirilmiştir. Organik amin ile modifiye edilmiş magnetit nanopartiküller nitroaromatik enerjetik maddelerden trinitrotoluenin (TNT) Meisenheimer anyonu oluşumuna dayanan tayinine imkan sağlamıştır. Geliştirilen sensörün TNT için belirtme sınırı 0,1 ppm düzeyindedir.

**Anahtar Kelimeler:** Enerjetik Madde, Magnetit Nanoparçacık, Kolorimetrik Sensör

### Abstract

In this study, by using the small size and large surface area properties of the nanoparticles and modifying the nanoparticles in accordance with these properties, a simple, inexpensive and sensitive colorimetric method for sensitive and selective explosive analysis of explosive residues in complex environments has been developed. The surface of the magnetite nanoparticles was functionalized with the organic amine compound. Organic amine-modified magnetite nanoparticles allowed the determination of trinitrotoluene (TNT) from nitroaromatic energetic substances based on the formation of Meisenheimer anion. The specification limit of the developed sensor for TNT is 0,1 ppm.

**Keywords:** Energetic Material, Magnetite Nanoparticle, Colorimetric Sensor

### GİRİŞ

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılmasıyla beraber nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Nanoteknoloji ve nanoyapılı materyaller her geçen gün bilimde önemli rol oynamasının yanı sıra araştırma ve geliştirmede, günlük yaşamda kullanımı giderek artan nanoyapılı materyal temelli ürünler piyasada yerini almaktadır. Nanoteknoloji malzeme ve imalat sektöründe, tıp ve sağlık sektöründe, elektronik ve bilgisayar teknolojilerinde, havacılık ve uzay araştırmalarında, savunma sektöründe, çevre ve enerji alanında, biyoteknoloji ve tarım alanlarında kullanım alanlarına sahiptir. Materyallerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, büyüklükleri nanometre ölçülerinde oldukları zaman çok büyük değişikliklere uğramaktadır. Nanoteknoloji özellikli sensörler, geleneksel sensörlere göre daha iyi hassasiyet ve seçicilik, daha düşük üretim maliyetleri ve güç tüketimi ve iyileştirilmiş stabilite gibi önemli avantajlar sunar (Yang ve ark., 2006). Magnetit nanoparçacıklar amaca yönelik olarak polimerler, sürfaktanlar küçük moleküller, biyomoleküller gibi organik ve silika, metaller, metaloksit/metalsülfid gibi inorganik bileşiklerle modifiye edilmektedir (Wu ve ark., 2008). Magnetit nanoparçacıkların bu özelliklerinden dolayı biyolojik ve kimyasal uygulama alanlarında yer almaktadır (Ghazanfari ve ark., 2016). Magnetit nanoparçacıklar manyetik alanda yönlendirilebildiklerinden magnetit nanaoparçacıklara tutturulmuş ilaç dokuya enjekte edilerek istenilen bölgeye taşınmaktadır (Son ve ark., 2005). Magnetit nanoparçacıklar teşhis yönteminde ve moleküler görüntülemeye de etkin rol oynamaktadır (Majewski ve ark., 2007). Magnetit nanopartikülün diğer ilginç uygulaması hyperthermia tedavisidir. Radyoterapi ve kemoterapi dışında kullanılan bir yöntemdir ve magnetit nanoparçacıklar değişen manyetik alana mauz bırakıldıklarında manyetik histerisis kayıplarıyla ısınarak tümör hücrelerinin bozulmasını sağlar (Giustini ve ark., 2010). Çevresel ve kriminolojik amaçlarla toprakta ve patlama sonrası

enkazında patlayıcı kalıntılarının eser analizi giderek önem kazanmakta ve karmaşık matrislerde duyarlı ve seçimli patlayıcı analizine olan ihtiyaç artmaktadır. Mevcut nitro bazlı patlayıcıların analiz yöntemlerinden bazıları gaz ve sıvı kromatografisi (Moore, 2004), kütle spektrometresi (Hakansson ve ark., 2000), iyon mobilite spektroskopisi (Wallis ve ark., 2005), enzimatik analizler (Smith ve ark., 2008) ve elektrokimyasal sensörlerdir (Ho ve ark., 2018). Ancak mevcut yöntemlerdeki fazla enstrümantasyon gereksinimi, karmaşık prosedürler, yüksek algılama sınırları gibi nedenlerden dolayı nitroaromatik patlayıcıların basit ve hassas analizinin yapılması zordur. Fakat daha basit ve kolay yöntemlerden biri TNT ile primer amin arasında donör/akseptör etkileşiminden yararlanarak primer amin ile modifiye edilmiş nanoparçacıkların TNT ile meisenheimer kompleks oluşturmasıyla spesifik renk tepkimelerine dayanan kolorimetrik yöntemler mevcuttur (Ular ve ark., 2018). Bu çalışmada magnetit nanoparçacıklar organik amin (OA) bileşiği ile modifiye edilerek primer aminlerin TNT ile meisenheimer kompleksi oluşturmasından yararlanarak kolorimetrik sensör geliştirilmiştir. Analitik Kimyada modifiye edilmiş magnetit nanopartiküller kullanılarak TNT tayininde SERS (Mahmoud ve ark., 2013), voltametrik (Alizadeh, 2014), florometrik (Zou ve ark., 2013) yöntemleri kullanılmıştır. Modifiye magnetit nanoparçacık kullanılarak kolorimetrik TNT sensörü ilk defa bizim tarafımızdan literatüre kazandırılacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; çözeltilerin hazırlanması aşamasında wisd marka Vorteks cihazı, Shimadzu AUX320 marka terazi, nanoparçacık sentezi ve modifikasyonu aşamasında, IKA C-MAG manyetik karıştırıcı ısıtıcı, Hettich Universal 320 santrifüj, Wisd WiseBath su banyosu, absorbands ölçümleri ve spektrum çizimleri için Shimadzu UV-1800 marka spektrofotometre kullanılmıştır.

Patlayıcı madde çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan HPLC saflıkta etanol ve aseton, magnetit nanopartikül sentezinde ve modifiye edilmesinde kullanılan etilen glikol, organik amin Sigma-Aldrich, Demir (iii) klorür heksahidrat ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), Sodyum asetat ( $CH_3COONa$ ), Sodyum Hidroksit ( $NaOH$ ) Merck markadır. Çalışma için kullanılan; TNT(Saf) Makine Kimya Endüstrisi Kurumundan temin edilmiştir.

### Modifiye Magnetit Nanoparçacıkların Sentezi

Organik amin ile modifiye magnetit nanoparçacıklarının sentezi için Songvorawit ve çalışma arkadaşlarının (Songvorawit ve ark., 2011) literatürde belirttiği şekilde tek basamaklı poliol yöntemi uygulanmıştır ve sentez sonrası magnetit nanoparçacıklar ultra saf su ile yıkanarak vakum etüvünde 75 °C sıcaklıkta kurumaya bırakılmıştır.

### Çözeltilerin Hazırlanması

Ağırlıkça %1,6'lık organik aminle modifiye edilmiş magnetit nanopartikül dispers edilerek stok çözelti elde edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki TNT çözeltileri aseton solventinde hazırlanmıştır.

### Süre ve sıcaklık Optimizasyonu

Örnekler ve şahit 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda belli sürelerle (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dk.) bekletilip, santrifüj edildikten sonra şahite karşı örneklerin absorbandsları alınmıştır. En uygun süre 10 dk. olarak belirlenmiştir. Daha sonra sıcaklık optimizasyonu yapılmıştır. Her bir örnek farklı sıcaklıklarda 10 dk. boyunca su banyosunda bekletildikten sonra örneklerin absorbandsları okunmuştur. En uygun sıcaklık 55 °C olarak belirlenmiştir.

### Modifiye Magnetit Sensör ile TNT Miktarının Tayini için Önerilen Prosedür

Stok çözeltiler hazırlandıktan sonra aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

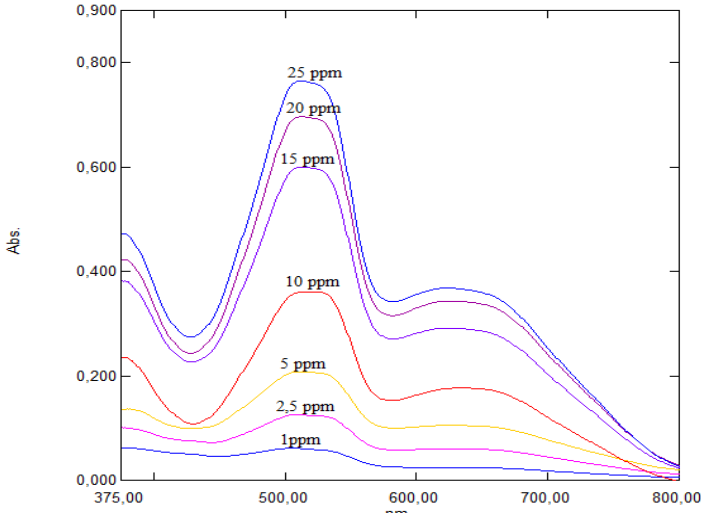
Örnekler: 0,5 mL dispers edilen organik amin ile modifiye edilmiş magnetit + 0,5 mL farklı konsantrasyonlardaki (2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ppm) TNT çözeltileri (asetonda çözülmüş)

Şahit: 0,5 mL dispers edilen organik amin ile modifiye edilmiş magnetit + 0,5 mL aseton.

Örnekler ve şahit 55 °C sıcaklıktaki su banyosunda belli sürelerle 10 dk. bekletilip, dışarıdan miknatıs tutularak magnetit nanoparçacığın çökmesi sağlanmış ve üst fazların şahite karşı  $\lambda_{maks.}=512$  dalga boyunda absorbandsları alınmıştır (şekil 1).

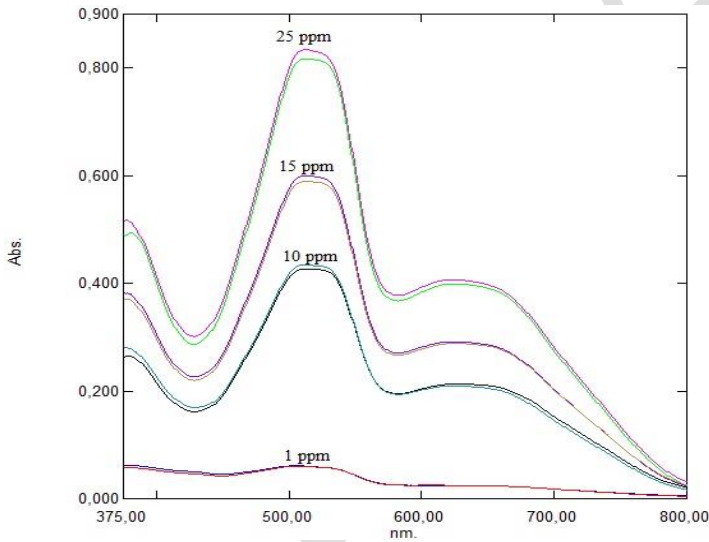
## BULGULAR ve TARTIŞMA

OA ile modifiye edilmiş magnetit nanoparçacık süspansiyonunun TNT miktarının tayini için uygulanan prosedüre göre farklı konsantrasyondaki TNT'ye karşı absorpsiyon spektrumları Şekil 1'de gösterilmiştir. Son konsantrasyonu 5 ppm ile 50 ppm aralığındaki TNT 'ye karşı absorbans spektrumları alınmıştır.



Şekil 1. OA ile modifiye edilmiş magnetit nanoparçacık süspansiyonunun farklı konsantrasyondaki TNT'ye karşı absorpsiyon spektrumları.

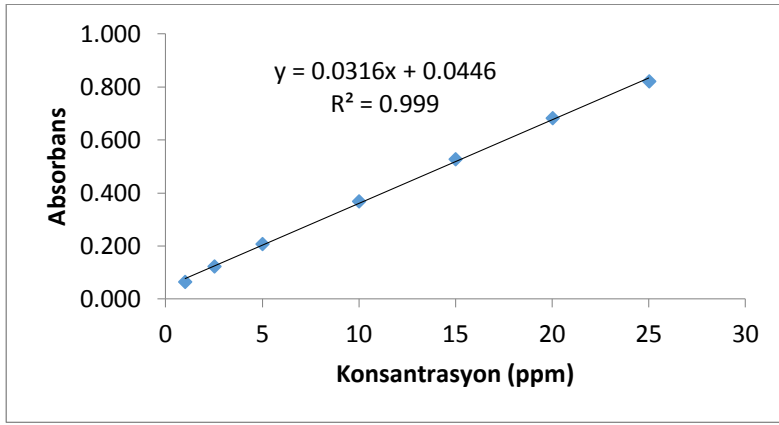
Modifiye magnetit sensör ile TNT miktarının tayini için önerilen prosedür gün içinde tekrarlanarak sensörün tekrarlanabilirliği Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. OA bileşiğiyle modifiye edilmiş magnetit nanoparçacık süspansiyonunun farklı konsantrasyondaki TNT'ye karşı absorpsiyon spektrumlarının tekrarlanabilirliği.

Her gün Çalışmada gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğin belirlenebilmesi için gün içi farklı örneklerin ve farklı günlerde yöntem uygulanıp absorbans ölçümleri yapılarak kalibrasyon eğrisi Şekil 4'deki gibi oluşturulmuştur.

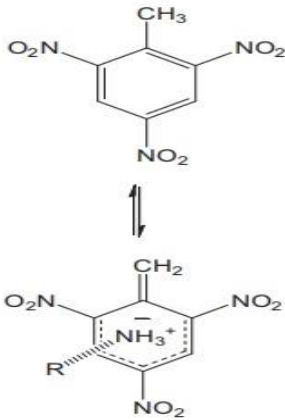
$A = 0,0316C_{TNT} + 0,0446$  kalibrasyon doğru denklemi elde edilir.



Şekil 3. Kalibrasyon eğrisi

### Sensörün Çalışma Prensibi

OA ile modifiye olmuş magnetit nanoparçacıkta bulunan elektronca zengin primer aminin ortaklaşmamış elektron çiftleri, nitro (-NO<sub>2</sub>) grubunun elektron çekici etkisinden dolayı benzen halkası elektronca fakir olan TNT bileşiği ile yük transfer etkileşimine girerek Meisenheimer kompleksini oluşturur ve bu kompleks görünür bölgede renk oluşturarak kolorimetrik ölçümlere olanak sağlar (Ular ve ark., 2018; Hughes ve ark., 2015).



Şekil 4. Meisenheimer kompleks yapısı (Hughes ve ark., 2015)

### SONUÇ

TNT gibi nitroaromatik patlayıcılar askeri alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca patlama olaylarında patlayıcı kalıntılarında çok düşük miktarlarda TNT bulunmaktadır. Bu bağlamda seçimli, düşük maliyetli, kolay uygulanabilen magnetit nanoparçacık esaslı yük transferine dayanan kolorimetrik sensör geliştirilmiştir. Poliol Tekniği ile tek basamakta OA bileşiği ile modifiye olmuş magnetit nanoparçacık sentezlenmiştir. Meisenheimer kompleksinin görünür bölgede renk vermesi ilkesinden yararlanarak TNT'ye karşı seçimli sensör geliştirilmiştir. OA ile modifiye edilmiş magnetit nanoparçacık süspansiyonunun farklı konsantrasyondaki TNT'ye karşı absorpsiyon spektrumları gün içinde ve günler arası alınarak tekrarlanabilir olduğu gözlemlenmiştir. TNT için elde edilen absorbans değerleri ile oluşturulan çalışma denklemi  $A = 0,0316C_{TNT} + 0,0446$  ( $r=0,9995$ ) şeklindedir. Geliştirilen sensörün TNT için belirtme sınırı 0,1 ppm düzeyindedir. Bu çalışma modifiye olmuş magnetit nanoparçacığın TNT'ye karşı seçimli kolorimetrik sensör olmasıyla bir ilktir.

### KAYNAKLAR

Alizadeh T 2014. Preparation of magnetic TNT-imprinted polymer nanoparticles and their accumulation onto magnetic carbon paste electrode for TNT determination. Biosensors and Bioelectronics, 61: 532–540.



- Ghazanfari M.R. Kashefi M. Fatemeh S. Jaafari M.R. 2016. Perspective of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Role in Biomedical Applications, 1-33.
- Giustini A. J. Petryk A. A. Cassim S. M. Tate J. A. Baker I. & Hoopes P. J 2010. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia In Cancer Treatment. *Nano Life*, 1:17–32.
- Hakansson K. Coorey R.V. Zubarev R.A. Talrose, V.L 2000. Hakansson, P. Low-mass ions observed in plasma desorption mass spectrometry of high explosives. *J. Mass Spectrom*, 35: 337–346.
- Ho M.Y. D'Souza N. Migliorato P 2012. Electrochemical aptamer-based sandwich assays for the detection of explosive. *Anal. Chem.* 84: 4245–4247.
- Hughes S. Dasary S.S. R. Begum S. Williams N. & Yu, H 2015. Meisenheimer complex between 2,4,6-trinitrotoluene and 3-aminopropyltriethoxysilane and its use for a paper-based sensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 5: 37–41.
- Majewski P. Thierry B 2007. Functionalized magnetite nanoparticles—synthesis, properties, and bio-applications. *Solid. State and Materials Sciences*, 32:3, 203-215.
- Moore, D.S 2004. Instrumentation for trace detection of high explosives. *Rev. Sci. Instrum.* 75: 2499–2512.
- Smith R.G. D'Souza, N. Nicklin S. A 2008. Review of biosensors and biological inspired systems for explosives detection. *Analyst*, 133: 571–584.
- Son S.J. Reichel J.S. He B. Schuchman M. Lee S.B 2005. Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery. *Journal of the american chemical society* 127:7316-7317.
- Songvorawit N. Tuitemwong K. Tuitemwong P 2011. Single step synthesis of amino-functionalized magnetic nanoparticles with polyol technique at low temperature. *ISRN Nanotechnology*, 6.
- Ular N. Üzer, A. Durmazel S. Erçağ E. Apak R. 2018. Diaminocyclohexane-functionalized/thioglycolic acid-modified gold nanoparticle-based colorimetric sensing of trinitrotoluene and tetryl. *ACS Sens.*, 3 (11), 2335–2342.
- Yang Y.T. Callegari C. Feng X.L et all 2006, *Nano Lett.*, 6: (4) 583-586.
- Zou W.S. Wang Y.Q. Wang F. Shao Q. Zhang J. & Liu J 2013. Selective fluorescence response and magnetic separation probe for 2,4,6-trinitrotoluene based on iron oxide magnetic nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(14), 4905–4912.
- Wu W. He Q. jiang C. 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale.res.lett.*, 3: 397-415.

## Krom(III) varlığında peroksidisülfattan sülfat radikallerinin oluşturulması ve antioksidan kapasite tayininde kullanılması

Seda Uzunboy <sup>1\*</sup>, Sema Demici Çekiç<sup>1</sup>, Reşat Apak<sup>1,2</sup>

\*<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Türkiye Bilimler Akademisi (TUBA), Piyade Sokak, No. 27, Çankaya, Ankara

\*Sorumlu yazar e-mail: sedauzunboy@gmail.com

### Özet

Yapılarında eşleşmemiş elektronlar bulunduran atom ya da moleküller olarak tanımlanan serbest radikaller oldukça reaktif olup çok kısa ömürlü türlerdir. Serbest radikaller dışında bu özellikleri gösteren çeşitli reaktif oksijen ve azot türleri de mevcut olup bunlar genel olarak sırasıyla ROS ve RNS olarak bilinirler ve doğrudan tayinleri oldukça zordur. Genellikle elektron spin rezonans tekniği kullanılsa da pahalı olması ve kalifiye operatöre ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin analizlere uygun olmamaktadır. Bu nedenle radikal türlerin spektrofotometrik tayinine artan bir ilgi vardır. Çeşitli radikallerin tayinine yönelik spektrofotometrik yöntemler geliştirilmekle birlikte sülfat radikalinin tayinine yönelik yöntemler literatürde eksik kalmıştır. Geliştirilen yöntem sayesinde sülfat radikallerinin kolorimetrik tayini sağlanmıştır. Potasyum peroksidisülfat oldukça kuvvetli bir yükseltgen olup, çeşitli geçiş metalleri varlığında sülfat radikali üretebilmektedir. Peroksidisülfatın bu özelliğinden yola çıkılarak sülfat radikali üretilerek, çeşitli antioksidanların bu radikallerin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu şekilde yeni bir spektrofotometrik sülfat radikali tayini ve antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem ayrıca gerçek örnek olarak özellikle kateşin bakımından zengin olduğu bilinen yeşil çaya uygulanmıştır. Uygulanan yöntem sonrası denenen antioksidanlar arasında Glutasyon >Troloks>Kafeik Asit>Epikateşin şeklinde bir etkinlik sıralaması elde edilmiştir. Ayrıca toplam antioksidan kapasite belirlenmesinde test edilen standart antioksidan bileşiklere referans yöntem olarak CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri uygulanmıştır. Gerçek örnek olarak kullanılan yeşil çayın toplam antioksidan kapasitesi Troloks eşdeğeri olarak geliştirilen yöntem, CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri için sırasıyla 0,20±0,01, 0,80±0,03 ve 0,63±0,04 mmol TR g<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem sayesinde yeni, ucuz ve hemen hemen her laboratuvarında kolaylıkla bulunabilen UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi kullanılarak uygulanabilecek antioksidan kapasite tayin metodu geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Serbest radikal, antioksidan, persülfat, krom, spektrofotometri, kolorimetri

### Generation of sulfate radicals from peroxydisulphate in the presence of chromium (III) and its use in antioxidant capacity determination

#### Abstract

Free radicals, defined as atoms or molecules containing unpaired electrons in their structure, are highly reactive and very short-lived species. Apart from the free radicals, there are various reactive oxygen and nitrogen species that exhibit these properties, which are generally known as ROS and RNS, respectively, and are difficult to determine directly. Although electron spin resonance technique is generally used, it is not suitable for routine analysis because it is expensive and requires qualified operator. Therefore there is an increasing interest in the spectrophotometric determination of radicals. Although spectrophotometric methods have been developed for determination of various radicals, methods for determination of sulfate radicals have been lacking in the literature. Colorimetric determination of sulfate radicals was achieved by the developed method. Potassium peroxydisulphate is a very strong oxidant and can produce sulphate radical in the presence of various transition metals. In this way, a new spectrophotometric sulfate radical determination and antioxidant capacity determination method was developed. The developed method was also applied as a real example to green tea, which is known to be particularly rich in catechin. Among the antioxidants tested an order of efficiency was obtained as Glutathione > Trolox > Caffeic. In addition, CUPRAC and ABTS/TEAC methods were used as reference methods in determination of total antioxidant capacity for standard antioxidant compounds tested. Trolox equivalent total antioxidant capacity of green tea which was used as real sample was calculated as 0.20 ± 0.01, 0.80 ± 0.03 and 0.63 ± 0.04 mmol TR g<sup>-1</sup> respectively for developed method, CUPRAC and ABTS / TEAC methods. Due to the developed method, a new, inexpensive and easily available antioxidant capacity determination assay has been developed by using UV-Visible Spectrophotometer.

**Keywords:** Free radical, antioxidant, persulfate, chromium, spectrophotometry, colorimetry

## GİRİŞ

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan kısa ömürlü reaktif atom ve moleküller olup reaktiviteleri kimyasal yapılarından kaynaklanır (Aruoma, 1998). Çeşitli reaktif oksijen türleri (ROS) canlı organizmalarda metabolik proses boyunca doğal olarak üretilir ve denge seviyesinde tutulurlar. Çevresel kirlilik, güneş ışığı, stres, sigara ve alkol tüketimi gibi sebeplerin artması durumunda aşırı ROS üretimi gerçekleşir (Wang ve ark, 2014). Bu şekilde dengenin oksidanlar yönünde bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır (Aruoma, 1998).

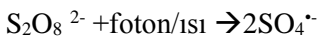
Oksidatif stres patolojik bir durum olup lipid, protein ve DNA gibi biyolojik makromoleküllerin oksidatif modifikasyonuna, doku hasarına ve hücre ölümüne yol açar. Biyolojik sıvıların ve yiyeceklerin antioksidan aktivite / kapasite seviyelerinin ölçülmesi, klinik biyokimyaadaki oksidatif strese bağlı hastalıkların teşhisi ve tedavisi, yiyeceklerin antioksidan içeriği bakımından anlamlı bir şekilde karşılaştırılması ve ürünler içindeki veya ürünler arasındaki varyasyonların kontrol edilmesi için gerçekleştirilir (Apak ve ark., 2016).

Antioksidanlar, okside olabilen substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir (Macdonald-Wicks ve ark., 2006). Genel olarak Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) seviyesini doğrudan bitkisel gıda özütlerinden ve biyolojik sıvılardan ölçebilecek metodların oluşturulması ve standartlaştırılması istenmektedir. TAK testleri genel olarak elektron transferi (ET) ve hidrojen atomu transferine (HAT) dayanır, ancak bazı durumlarda (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), ABTS ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH radikal reaktifleri gibi) bu iki mekanizma kesin olarak ayrılmayabilir. Bu iki sınıfa ek olarak ROS/RNS süpürme testleri de mevcuttur (Apak ve ark., 2016).

HAT temelli yöntemler esas olarak yarışmalı reaksiyon kinetiğine dayanır ve bir radikal başlatıcı yardımıyla reaksiyon başlatılır. Antioksidan varlığında reaksiyon kinetiği incelenir. HAT temelli yöntemlere örnek olarak ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity/ Oksijen Radikal Absorbsiyon Kapasitesi Yöntemi) ve TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity/Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi) verilebilir. ET temelli yöntemlerde ise indirgenen tür antioksidandan bir elektron alır, ve antioksidan konsantrasyonu ile orantılı olarak renk değişimi incelenir. Bu yöntemlere örnek olarak ise CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi, Folin-Ciocalteu yöntemi (FC), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite) / ABTS Yöntemi verilebilir (Büyüktünel, 2013).

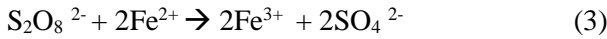
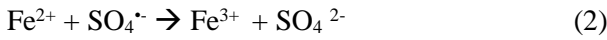
Bu çalışmada peroksidisülfattan sülfat radikallerinin üretilmesi ve antioksidanların bu reaksiyon üzerine etkisi incelenmiştir. Bu anlamda yeni bir antioksidan tayin yöntemi geliştirilmek istenmiştir.

Peroksidisülfat iyonu sulu çözeltilerde bilinen en güçlü okside edici ajandır. Standart redoks potansiyeli 2,01 V olup bu reaksiyon normal sıcaklıkta oldukça yavaştır (House, 1961). Kuvvetli bir okside edici kimyasal olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,76 V) ile kıyaslandığında potansiyelinin daha yüksek olması, kolay bulunabilmesi ve saklanabilmesi, yüksek stabilitesi ve göreceli olarak daha ucuz olması peroksidisülfatı avantajlı hale getirmiştir. Bu özelliklerinden dolayı kimyasal temizlik ya da degradasyon (bozunma) uygulamalarında kullanılır hale gelmiştir (Xu ve Li, 2010). Peroksidisülfat sodyum, potasyum ya da amonyum tuzları olarak bulursa da genel olarak potasyum peroksidisülfat olarak kullanılmaktadır. Potasyum peroksidisülfatın Norwalk virüsü, ayak ve ağız hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların ya da semptomların dezenfeksiyonu/ oksidasyonu için etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte direkt kimyasal oksidasyon yoluyla asidik ya da bazik ortamlarda zehirli atıksulardaki organik kirleticilerin bozunması için etkili olduğu da rapor edilmiştir (Lau ve ark.,2007). Atıksuların temizlenmesi amacıyla çeşitli bozunma prosesleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu proseslerin başlıcaları TiO<sub>2</sub> esaslı fotokataliz, Fenton ya da foto-Fenton ve potasyum permanganat ya da Co<sup>2+</sup>/okson reaktiflerinin kullanılmasıdır. Ancak son zamanlarda Fe<sup>2+</sup>/peroksidisülfat karışımı çeşitli kirleticilerin bozundurulması proseslerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik özellikle mineralize organik bileşiklerin bozunumunda önem kazanmaktadır. Xu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada atıksulardaki boyar maddenin bozundurulması için Fe(II) iyonları ile peroksidisülfat kombinasyonu kullanmışlardır (Xu ve Li, 2010). Peroksidisülfatın oda sıcaklığında yavaş olan reaksiyonu ısıl ya da fotokimyasal yollarla hızlandırılabilir. Bahsedilen reaksiyon aşağıda gösterildiği gibi olup reaksiyon ürünü olarak sülfat anyon radikali çıkmaktadır (Lau ve ark.,2007).



Ayrıca peroksidisülfat iyonunun çeşitli geçiş metalleri ile de aktive edildiği bildirilmiştir. Özellikle literatürde Fe<sup>2+</sup> ile güçlü bir oksidan olan sülfat radikalinin (SO<sub>4</sub><sup>·-</sup>, E°=2,5-3,1 V) oluştuğu rapor edilmiştir. Fenton reaksiyonuna benzer olarak, peroksidisülfat/Fe<sup>2+</sup> çifti oksidan ve geçiş metalinin karışımı olarak reaksiyona

girmektedir. Fe<sup>2+</sup> ile peroksidisülfat arasındaki sitokiyometrik reaksiyon (1) ve (2) numaralı reaksiyonlar yoluyla gerçekleşip net reaksiyon (3) numaralı reaksiyondur (Xu ve Li, 2010):



Sülfat radikalinin de diğer radikal türler gibi kısa ömürlü olması ve yüksek reaktivitesi nedeniyle ölçülmesi oldukça zordur. Ancak sülfat radikalini tayini için genellikle elektron spin rezonans spektroskopisi kullanılmaktadır. Bu teknik sayesinde tutma/tuzaklama işlemi sonrasında spin katkı türlerinin elektron paramanyetik rezonans spektrumu ölçülebilmektedir. Teknik, sülfat radikali için seçimli ve hassas olmakla birlikte pahalı olması ve uzman operatöre ihtiyaç duyması gibi nedenlerden dolayı rutin analizler için kullanışlı değildir (Wang ve ark., 2018). Bu nedenle sülfat radikalini daha basit olarak ölçebilen tekniklere ihtiyaç vardır. Literatürde radikal tayini için geliştirilmiş çeşitli kolorimetrik spektrofotometrik yöntemler bulunmaktadır. Bunlara hidroksil radikali için salisilik asidin prob olarak kullanılmasına dayanan ve dolaylı olarak hidroksil radikalini ölçümüne izin veren spektrofotometrik yöntem (Bekdeşer ve ark., 2008), nitrotetrazolyum mavisinin prob olarak kullanılmasıyla süperoksit radikalini dolaylı ölçümüne izin veren yöntem (Liu ve ark., 1997) ve hem hidroksil radikalini hem de süperoksit radikalini dolaylı ölçümüne izin veren ve N,N-dimetil-p-fenilendiaminin (DMPD) prob olarak kullanılmasına izin veren yöntem (Çekiç ve ark.,2015) örnek olarak verilebilir.

Literatürde sülfat radikalini tayinine olanak veren çalışma olmakla birlikte yöntem kolorimetrik bir yöntem olmayıp sadece UV bölgedeki değişimin incelenmesine dayanmaktadır (Wang ve ark., 2018). Bu nedenle sülfat radikali tayinine olanak veren kolorimetrik yöntemlerin eksikliği bu çalışmanın temelini oluşturmuştur. Çalışma kapsamında sülfat radikalini dolaylı tayinine olanak verecek kolorimetrik yöntem geliştirmekle beraber antioksidanların sülfat radikali üretimi üzerine engelleyici etkisi de incelenmiştir. Çalışma kapsamında ayrıca kullanılan standart antioksidan bileşiklere ve gerçek örneğe CUPRAC (Apak ve ark., 2004) ve ABTS/TEAC (Re ve ark., 1999) yöntemi uygulanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar:

Potasyum persülfat, Krom(III) nitrat nonahidrat, Krom (III) klorür heksahidrat, etanol, sülfirik asit, antioksidan standartları (Glutatyon (GSH), Troloks (TR), Kafeik Asit (CFA), Epikateşin (EC)), (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), Bakır (II) klorür dihidrat ve amonyum asetat Sigma-Aldirich 1,5-difenilkarbazit Merck firmasından alındı.

Maddelerin tartımlarının alınması için Radwag AS 220/C/2 model analitik terazi, çözeltilerin hazırlanması için Ellma Sonic marka ultrasonik banyo, inkübasyon işlemi için Memmert Waterbath WNB 7-45 su banyosu, pH'larının ölçülmesi için HANNA HI 221 pH metre, destile su üretim için GFL 2008 destile su cihazı, absorbans ölçümlerinde Varian CARY 100 UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Helma marka 10 mm ışın yollu bir çift kuartz küvet kullanılmıştır.

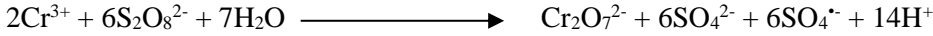
### Çözeltilerin Hazırlanması:

Potasyum persülfat, Krom(III) nitrat nonahidrat ve Krom (III) klorür heksahidrat destile su ile hazırlandı. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi pH ayarlamak için 17,8 M stok çözeltisinden 0,5 M olacak şekilde destile su ile seyreltilerek kullanıldı. CUPRAC çözeltileri literatürde var olan prosedüre göre hazırlandı (Apak ve ark., 2004). ABTS/TEAC yönteminde kullanılmak üzere ABTS<sup>••</sup> çözeltisi literatürde belirtildiği gibi hazırlandı (Re ve ark., 1999). Standart antioksidan çözeltileri 1,0×10<sup>-2</sup> M olacak şekilde hazırlandı, her bir yöntem için uygun oranda seyreltilerek kullanıldı.

Gerçek örnek olarak kullanılan yeşil çayın hazırlanması için yerel marketten alınan kullanıma hazır poşet çay öncelikle tartıldı, ardından kaynatılmış destile su ile 250 mL ye göre hazırlandı. Uygulanan yöntemlerde uygun oranda seyreltilerek kullanıldı (Apak ve ark., 2006).

### Üretilen Sülfat Radikallerinin Dolaylı Tayini

Cr(III) tuzlarının peroksidisülfat ile yükseltgenmesinin sağlanması için, Cr(III)/ peroksidisülfat kombinasyonu 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi ile pH 3'e ayarlanarak 1 saat boyunca inkübe edildi. Reaksiyon sonucu elde edilen Cr(VI) 1,5-Difenilkarbazit ile asidik ortamda tayin edildi.



### Reaksiyon Üzerine Antioksidanların Etkisinin İncelenmesi

Antioksidanların bu reaksiyon üzerine etkisinin incelenmesi için seçilen antioksidan bileşik reaksiyon ortamına katıldı. Eş zamanlı olarak antioksidan bileşik varlığında ve yokluğunda yapılan denemeler sonrası üretilen Cr(VI) miktarı yine difenilkarbazit ile tayin edildi. Artan antioksidan konsantrasyonu varlığında Cr(VI) miktarı ölçüldü.

### Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneğe Uygulanması

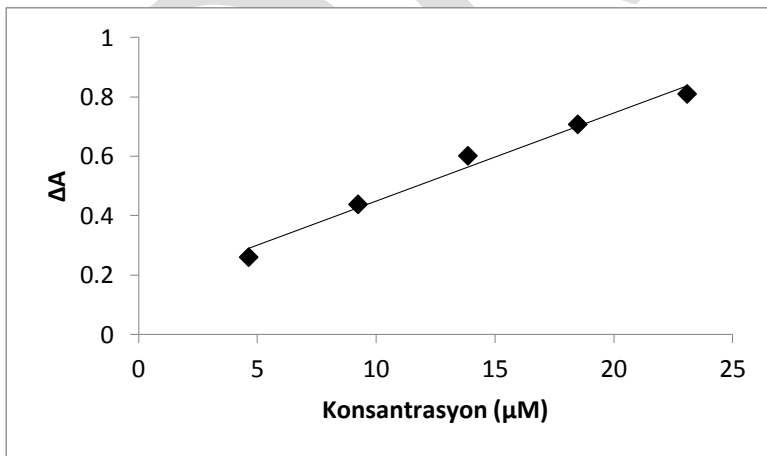
Geliştirilen yöntemin gerçek örnekler için kullanılabilirliği de test edildi. Bu amaçla gerçek örnek olarak yeşil çay kullanıldı. Uygun oranda seyreltilen çay örneği antioksidan bileşik olarak geliştirilen sisteme dahil edildi. Eş zamanlı olarak yeşil çay varlığında ve yokluğunda yapılan denemeler sonrası ölçüm yapıldı.

### Test Edilen Antioksidanlar ve Gerçek Örnek İçin Standart Referans Yöntemlerin Uygulanması

Standart referans yöntem olarak CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri uygulandı: CUPRAC yönteminin uygulanması için 1,0 mL 1,0×10<sup>-2</sup> M CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O çözeltisi, 1,0 mL 7,5×10<sup>-3</sup> M Nc, 1,0 mL 1M NH<sub>4</sub>Ac (pH 7) ilave edildi, (2-x) mL su ve x mL antioksidan katılarak 30 dakikanın sonunda 450 nm de referans körüne karşı absorbansı okundu. ABTS/TEAC yönteminin uygulanması için x mL antioksidan bileşik, (1-x) mL Etanol ve 2 mL ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi katılarak 6 dakikanın sonunda 734 nm de absorbansı okundu. Gerçek örnek olan yeşil çaya da ayrıca CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri uygulandı.

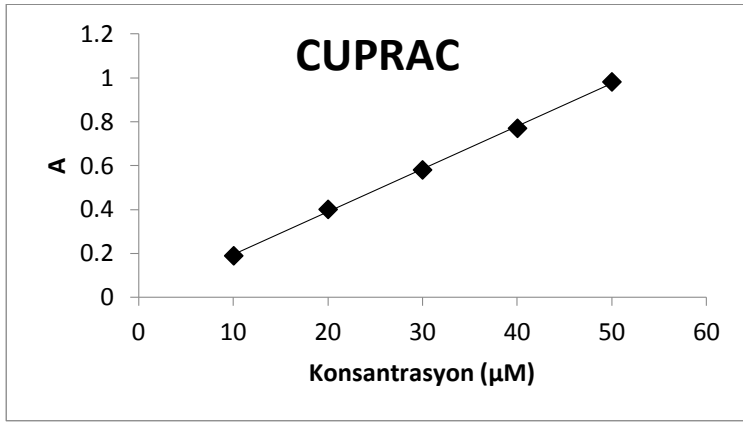
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Geliştirilen yöntem yukarıda bahsedildiği gibi uygulandı. Artan antioksidan konsantrasyonu ile orantılı olarak absorbansda azalma olduğu görüldü. Her bir antioksidan için yöntem uygulanıp, artan antioksidan konsantrasyonu ile absorbans azalması arasında grafikler çizildi. Şekil 1 Troloks için antioksidan konsantrasyonu ile absorbans azalması (ΔA) arasında çizilen grafiği göstermektedir.



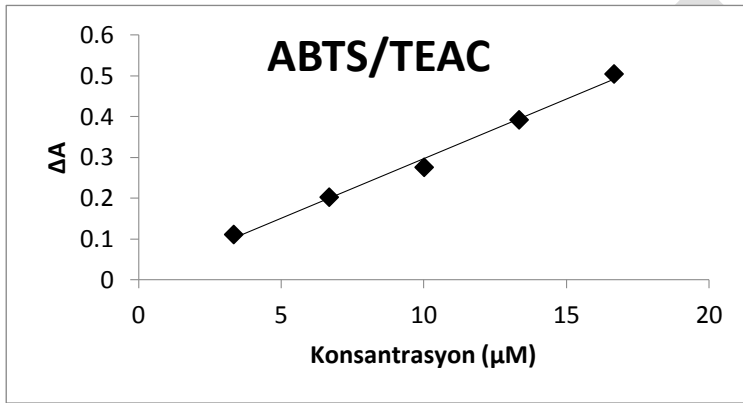
Şekil 1: Geliştirilen yöntem ile Troloks için elde edilen lineer kalibrasyon grafiği ( $\Delta A = 3,2 \times 10^4 C + 0,1043$ ;  $R^2 = 0,9644$ )

Çalışılan antioksidanlar ve gerçek örnek için referans yöntem olarak CUPRAC yöntemi uygulandı. Her bir antioksidan için artan antioksidan konsantrasyonu ile absorbans arasında grafikler çizildi. Şekil 2 Troloks için CUPRAC yönteminde artan antioksidan konsantrasyonu ile elde edilen lineer kalibrasyon grafiğini göstermektedir.



Şekil 2: CUPRAC yöntemi ile Troloks için elde edilen lineer kalibrasyon grafiği ( $A = 1,9 \times 10^4 C - 0,001$ ;  $R^2 = 0,9993$ )

Aynı şekilde antioksidan bileşikler için uygulanan ABTS/TEAC yöntemi sonrasında artan antioksidan bileşik konsantrasyonu ile absorbans azalması arasında grafik çizildi. Troloks için antioksidan konsantrasyonu ile absorbans azalması ( $\Delta A$ ) arasında çizilen grafik Şekil 3’ de verilmiştir.



Şekil 3: ABTS/TEAC yöntemi ile Troloks için elde edilen lineer kalibrasyon grafiği ( $\Delta A = 2,9 \times 10^4 C + 0,0042$ ;  $R^2 = 0,9926$ )

Geliştirilen yöntem için çalışılan antioksidanların her biri için çizilen grafiklerden lineer kalibrasyon denklemleri elde edildi, ve bu denklemlerden bulunan molar ekstiksiyon katsayıları göz önüne alınarak antioksidanlar arasında bir etkinlik sıralaması yapıldı: Glutatyon >Troloks>Kafeik Asit>Epikateşin. Elde edilen bu sıralama antioksidanların yapısı ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlandı.

Gerçek örnek olarak yeşil çaya hem geliştirilen yöntem hem de standart referans yöntemler (CUPRAC ve ABTS/TEAC) uygulandı. Troloks için elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri kullanılarak her üç yöntem için de yeşil çayın TAK değeri belirlendi. Tablo 1 yeşil çayın her üç yöntem için hesaplanan değerlerini göstermektedir. Tablodan görüldüğü gibi yöntemler arası farklılık olması geliştirilen yöntem ile diğer yöntemler arasındaki mekanizmanın farklı olması ile ilişkilendirilmiştir.

Tablo 1: Yeşil çayın her üç yöntem ile elde edilen gram başına mmol TR- eşdeğeri

Geliştirilen Yöntem	CUPRAC	ABTS/TEAC
0,25±0,01	0,80±0,03	0,63±0,04

## SONUÇ

Geliştirilen yöntem sayesinde Cr(III) tuzları ile peroksidisülfat arasındaki reaksiyon sonucu sülfat radikallerinin üretimi sağlanmıştır. Uygulanan difenilkarbazit yöntemi ile dolaylı olarak sülfat radikallerinin ölçümü yapılmıştır. Antioksidan varlığında bu reaksiyonun azaldığı ve artan antioksidan konsantrasyonu ile

bu azalmanın lineer olduğu görülmüştür. Denenen antioksidanlara ve gerçek örnek olan yeşil çaya standart referans yöntemler CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri uygulanmış ve gerçek örneğin TR eşdeğerliği bulunmuştur.

Sonuç itibarıyla basit, ucuz ve kolay ulaşılabilir bir yöntem geliştirilmiş ve literatürde fazla bulunmayan sülfat radikali tayini ile eş zamanlı antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE, Erçağ E 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57: 292–304.

Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE 2004. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7970-7981.

Aruoma OI 1998. Free Radicals, Oxidative Stress, and antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of American Oil Chemists Society*, 75: 199-212.

Bekdeşer B, Özyürek M, Güçlü K, Apak MR 2008. Hydroxyl Radical Detection With A Salicylate Probe Using Modified Cuprac Spectrophotometry And HPLC. *Talanta*, 77: 90-97.

Çekiç SD, Avan AN, Uzunboy S, Apak R 2015. A colourimetric sensor for the simultaneous determination of oxidative status and antioxidant activity on the same membrane: N,N-Dimethyl-p-phenylene diamine (DMPD) on Nafion. *Analytica Chimica Acta*, 865: 60-70.

House DA 1962. Kinetics and mechanism of oxidations by peroxydisulfate. *Chemical Reviews*, 62: 185-203

La TK, Chu W, Graham NJD 2007. The Aqueous Degradation of Butylated Hydroxyanisole by UV/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup>: Study of Reaction Mechanisms via Dimerization and Mineralization. *Environmental Science & Technology*, 41: 613-619.

Liu F, Ooi VEC, Chang ST 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science*, 60: 763-771.

Macdonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86: 2046–2056.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231–1237.

Wang C, Chen R, Zhang R, Zhang N 2018. Simple spectrophotometric determination of sulfate free radicals, *Analytical Methods*, 10: 3470–3474.

Wang X, Jiao C, Yu Z 2014. Electrochemical biosensor for assessment of the total antioxidant capacity of orange juice beverage based on the immobilizing DNA on a poly L-glutamic acid doped silver hybridized membrane. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 192: 628-633.

Xu XR, Li XZ 2010. Degradation of azo dye Orange G in aqueous solutions by persulfate with ferrous ion. *Separation and Purification Technology*, 72:105-111.

## Ruminant beslemede kullanılan bazı mikro mineraller ile ilgili son gelişmeler

Cansu Çelik, Nurcan Çetinkaya\*

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı,  
55139 Samsun, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: nurcanc@omu.edu.tr

### Özet

Mikro mineraller uzun yıllardır ruminant rasyonlarında kullanılan, verim ve sağlık yönünden oldukça önemli etkin besin maddeleridir. Ruminant rasyonunda yeterli düzeyde mikro minerallerin bulunması tüm biyokimyasal işlemlerin normal şekilde devam etmesini sağlar. Karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında önemli görevleri olan mikro mineraller rasyona organik veya inorganik yapıda eklenebilir. Yapılan bazı çalışmalarda rasyona eklenen organik mikro minerallerin süt üretimini, üreme performansını ve immun yanıtı artırdığı tespit edilmiştir. Verimin artması mikro mineral gereksinimini artırmaktadır. Vücutta mikro minerallere farklı düzeylerde ihtiyaç duyulur ve bir mikro mineralin rasyonda fazla veya eksik olması metabolik hastalıklara yol açmaktadır. Bazı mikro mineraller için hayvanın ihtiyaçları antagonistleri tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir. Örneğin kükürt (S) ve molibden (Mo), önemli bakır (Cu) antagonistleridir ve rasyondan Cu biyoyararlanımını büyük ölçüde etkileyebilir. Rasyonda biyoyararlanabilirliği yüksek olan demir (Fe) bileşiğinin bulunması durumunda Fe güçlü bir Cu ve mangan (Mn) antagonist etkisi yapmaktadır. Son araştırmalar ruminantlar için NRC'ye göre hesaplanan kobalt (Co) ve Mn ihtiyaçlarının hayvanın ihtiyaçlarının altında olabileceğini ileri sürmektedir. Sığırlarda krom (Cr) takviyesine verilen yanıtlara dayanan araştırmalar yapılarak rasyona eklenecek Cr miktarları belirlenmelidir. Bu derlemede ruminant beslemede kullanılan mikro minerallerden Cu, Mo, Fe, Mn, Cr ve B mineralleri konusunda son yapılan çalışmalar üzerinde durulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Antagonist etki, mikro mineral, organik mikro mineral, ruminant.

### Recent developments on some micro minerals used in ruminant nutrition

#### Abstract

Micro minerals have been used in ruminant diets for many years and are very important nutrients for animal health and production. The presence of sufficient micro minerals in the ruminant diet ensures that all biochemical processes normally takes place. Micro minerals, which have important roles in carbohydrate, lipid and protein metabolism, can be added to the diet in organic or inorganic structure. In some studies, it has been found that organic micro minerals added to the diet increase milk production, reproductive performance and immune response. Increased production increases the requirements for micro minerals. Different levels of micro minerals are needed in the body and the excess or deficiency of a micro-mineral in the diet leads to metabolic diseases. For some micro minerals, animal requirements are significantly affected by antagonists. For example, sulfur (S) and molybdenum (Mo) are important copper (Cu) antagonists and can greatly affect Cu bioavailability from the diet. In case of high bioavailability of iron (Fe) compound in the diet, Fe shows a strong Cu and manganese (Mn) antagonist effect. Recent research studies suggest that the cobalt (Co) and Mn requirements calculated by NRC for ruminants may be under the requirements. The amount of Cr to be added to the diet should be determined by conducting research studies based on the response given to Cr substitution in cattle. In this review, recent research studies carried out on Cu, Mo, Fe, Mn, Cr and B minerals which are used in ruminant nutrition were discussed.

**Keywords:** Antagonist effect, micro mineral, organic micro mineral, ruminant.

### GİRİŞ

Mikro mineraller uzun yıllardır ruminant rasyonlarında kullanılan, verim ve sağlık yönünden oldukça önemli etkin besin maddeleridir. Enzim ve hormonların bir bileşeni olan mikro mineraller metabolizmanın normal fonksiyonunu sürdürmesinde oldukça önemlidir. Endokrin sistemi düzenlemekte ve enzim kofaktörleri gibi çeşitli biyolojik işlemlerde görev alırlar (Kumar ve ark., 2011). Karbonhidrat, lipit ve protein metabolizması gibi biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör fonksiyonları önemlidir. Mikro mineraller organik veya inorganik formda rasyona eklenebilir. Organik minerallerin biyolojik yararlılığının yüksek olması, rasyona eklenecek



toplam mineral miktarını ve dolayısıyla maliyeti de azaltmaktadır (Boğa ve Filik, 2011). Organik kompleksler iz mineralin proteine veya amino aside bağlanmasıyla oluşur. İz mineralin organik komplekslerinin hayvan tarafından daha etkin bir şekilde emildiği belirtilmiştir (Rasby ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda organik iz minerallerin rasyona eklenmesiyle süt verimini ve üreme performansını artırdığı immun yanıtı iyileştirdiği ortaya konmuştur. Artan verimle birlikte mikro mineral gereksinimleri de artmaktadır. Katalaz (Fe) ve süperoksit dismutaz (Cu, Zn ve Mn) içeren çeşitli metalloenzimler de, hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında kritik fonksiyonları vardır (McDowell, 2002). İz mineral beslenmesinin büyüme ve ilk laktasyon sırasında etkisini belirlemek amacıyla 64 inekle yapılan bir çalışmada, kuru dönemde organik veya inorganik iz mineral eklenmiş rasyonla besleme yapılmıştır. Kuru dönem boyunca organik veya inorganik iz mineral katkısı yapılmış ineklerde, organik iz mineral ile beslenenlerinin üreme verimini ve laktasyon başında süt verimini artırdığı fakat iz mineralin verilme formunun süt kalitesini etkilemediği belirtilmiştir (Pino ve ark., 2018). Başka bir çalışmada iz mineral kaynağının, organik veya inorganik Zn, Mn ve Cu katkısının nakliye stresli sığırlarda toplam canlı ağırlık kazancı veya morbidite üzerinde bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur (Ryan ve ark., 2015).

Besi ve süt sığırı için mineral ihtiyacı NRC tarafından yayınlanmıştır (NRC, 2000; NRC, 2001). 2001 yılından beri, ruminant beslenmesinde mineraller ile ilgili önemli araştırmalar yapılmıştır (Spears ve Weiss, 2014). Se'nin 1979'da onaylanmasından sonra ilk defa 2009 yılında, ABD Gıda ve İlaç İdaresi, Cr' nin (Cr propionate olarak) süt ineği rasyonuna katılmasını onaylamıştır. Son yıllarda mineral beslenmenin inekler üzerindeki etkilerini değerlendirmek için moleküler teknikler daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Weiss, 2017). Hayvan gereksinimlerini karşılamak için yeterli miktarda esansiyel mineral katkısı, sığırların üretkenliğini ve sağlığını en üst düzeye çıkarmak için önemlidir. Genetik, yaş, cinsiyet, üretim türü ve üretim düzeyi gibi fizyolojik faktörler bazı minerallerin ihtiyaçlarını etkilemektedir (Spears, 2002). Minerallerin emilebilirlikleri organik ve inorganik olmasına göre değişmektedir (Weiss, 2014). 1989'dan sonra 2001 de yayınlanan NRC süt sığırları için mineral gereksinimlerinde Fe ve Mn için önemli değişiklikler önermiştir. Bu mineraller için gereksinimler NRC (2001)'de oldukça düşüktür. NRC (2001) toplam mineral yerine emilen mineral ihtiyaçlarının kullanılmasını yayınlamıştır (Spears, 2002). NRC (2001), Cu, Mn ve Zn' nin % 4, % 0.75 ve % 15 oranında emilebilir olduğunu belirtmiştir. Minerallerin emilimini etkileyen faktörleri belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bazı mikro minerallerin emilimini ve hayvanın ihtiyaçlarını önemli ölçüde etkileyen antagonistleri olduğu bildirilmiştir (Spears ve Weiss, 2014). Rasyonla ve içme suyu ile tüketilen S %0.25-0.30' dan fazla olduğunda rasyona emilimi yüksek Cu eklenmelidir (Weiss, 2014). Son 100 yılda yetersiz mineral tüketiminin etkilerinin yanı sıra, aşırı mineral tüketiminde zararlı etkileri olduğu ortaya konmuştur (Weiss, 2017). Hayvanın ihtiyacını aşan konsantrasyonlarda mineral takviyeleri maliyeti artırmakla birlikte sığır atıklarındaki (gübre ve / veya idrar) mineralin topraktağa ve yer altı sularına geçmesine neden olmaktadır (Rasby ve ark., 2011). Mineraller arasındaki etkileşimi ve antagonizmi daha iyi belirlemek, mineral gereksinimlerinin daha doğru hesaplanması bakımından önemlidir (Weiss, 2017). Mineral katkısı yapılırken hayvanın ihtiyacı ve takviye dışındaki kaynaklardan gelen mineral tüketimi doğru bir şekilde belirlenmelidir (Rasby ve ark., 2011). Son yıllarda ruminant beslemede kullanılan Cu, Mo, Fe, Mn, Cr ve B mineralleri konusunda yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

## **BAKIR**

Bakır ruminantlarda lipit metabolizmasında, biyohidrojenasyon ve ketekolamin üretiminde görev almakla birlikte birçok enzim sisteminde hayati bir bileşendir (Kumar ve ark., 2011; Gültepe ve ark., 2017). Gebe süt ineklerinde günlük bakır ihtiyacı, 100 günden az gebeliklerde 0,5 mg, 100-225 günlük gebeliklerde 1,5 mg ve 225 günden daha geç gebeliklerde ise 2 mg olarak bildirilmiştir (Gültepe ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada rasyonda yüksek miktarda Fe bulunması kontrol grubu ineklerde karaciğer Cu konsantrasyonunun azalmasına neden olmuştur ancak rasyona Cu ilave edildiğinde Fe'in karaciğer Cu konsantrasyonları üzerindeki etkisi azalmıştır (Spears ve Weiss, 2014). Bakır eksikliği, dolaşımdaki T hücrelerinin, B hücrelerinin ve nötrofillerin sayısını azaltmaktadır. Koyunlarda yapılan bir çalışmada bakır eksikliğinin bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanan ölüm oranını artırdığı tespit edilmiştir (McDowell, 2002). Cu eksikliği, Mo düzeyinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Kumar ve ark., 2011). Ruminantların Cu gereksinimleri, rasyondaki Mo, S ve Fe konsantrasyonlarından büyük ölçüde etkilenmektedir (Scaletti ve ark. 2003). Yüksek miktarda Fe, Mo ve S içeren rasyonla beslenen sığırlarda bakır gereksiniminin arttığı tespit edilmiştir (Spears, 2002). Emilebilir Cu gereksinimi normal koşullar altında 7-15 mg/gün arasında değişmektedir. Cu' nun sütte düşük konsantrasyonlarda salgılanması nedeniyle süt verimi arttıkça, Cu gereksinimi de artmaktadır. Cu karaciğerde depolanandığından Cu gereksinimini belirlerken karaciğerdeki Cu konsantrasyonları temel alınır. Ortalama bir süt verimindeki inek için emilebilir Cu gereksinimi NRC'ye göre yaklaşık 10 mg/gündür. Cu'nun

uzun süreli gereğinden fazla beslenmesiyle akut Cu toksisitesi ortaya çıkabilir. Besi sığırları yüksek Cu konsantrasyonlarına toleranslı olduğundan KC toksisitesi belirleme çalışmalarında genellikle besi sığırları kullanılmıştır. Bununla birlikte, besi sığırları genellikle kısa ömürlüdür ve süt inekleri için iyi model olmayabilir (Weiss, 2014). Kronik bakır zehirlenmesi subklinikdir ve plazmadaki yüksek karaciğer enzimi (AST ve GGT) aktivitelerine dayanarak karaciğer dejenerasyonuna neden olabilir (Bidewell ve ark., 2012; Weiss, 2014).

NRC (2000) tarafından besi sığırları rasyonunda S ve Mo düzeyi %0.25 S ve 2 mg/kg Mo geçmedikçe rasyonda 10 mg/kg/KM Cu düzeyinin yeterli olduğu belirtilmiştir. Süt sığırları için Cu gereksinimi, laktasyondaki inekler, gebeliğin son dönemindeki inekler ve düveler için sırasıyla yaklaşık 11, 12-18 ve 10 mg / kg KM olarak bildirilmiştir (Weiss ve Spears, 2006). Cu ilaveli rasyonla beslenen düvelerden alınan sütte daha düşük E. coli tespit edilmesine rağmen enfeksiyonun süresi Cu katkısından etkilenmemiştir (Scaletti ve ark. 2003). Rasyona bakır ilavesi, Angus ve Angus melezi sığırları ile yapılan çalışmalarda, kastaki mermerleşmeyi etkilemeden sırt yağını azaltmış ve PUFA konsantrasyonlarını arttırmıştır (Engle, 2011).

## **MOLİBDEN**

Molibden ruminantlarda elektrolitlerin metabolizmasını etkileyen ve bazı enzimlerin yapısına katılan bir mikro mineraldir. Ayrıca rumende selülozu sindiren mikroorganizmaları stimüle etmede görevlidir (Gültepe ve ark., 2017; Bampidis ve ark., 2019). Mo' nun fazla tüketilmesi metabolizmada Cu kullanımını etkileyerek Cu eksikliğine neden olabilir. Molibden zehirlenmesi, rasyonun kükürt konsantrasyonuna ve rasyondaki bakır-molibden oranlarına bağlı olarak oluşur. Rasyonda S miktarı fazla ise, Mo ile S birleşerek rumende tiyomolibdat kompleksi oluşturur. Bu tiyomolibdat kompleksleri rumende bakteri, protozoa ve sindirilmemiş yem partiküllerine bakır ile birlikte bağlanarak gastrointestinal ve sistemik bakır kaybına neden olabilmektedir (Spears, 2003; Gültepe ve ark., 2017; Hall, 2018). Ayrıca yüksek molibden tüketimi, plazmadaki fosfor konsantrasyonunu azaltabilir ve sığırlarda dışkı yoluyla fosfat atılımını arttırabilir (Bampidis ve ark., 2019). Koyunlar için yem katkı maddesi olarak sodyum molibdat dihidratın etkinliğini belirleme amacıyla yapılan çalışmada rasyonda Cu: Mo oranı 3-10 arasında olduğunda molibden takviyesinin etkili olduğu belirtilmiştir.

## **DEMİR**

Demirin miyogloblin, sitokrom enzimi ve hemogloblin sentezinde önemli fonksiyonları vardır. Ayrıca Fe oksidatif enzim sisteminin korunmasında ve dokulara oksijenin taşınmasında etkilidir. Eksikliğinde anemi ve büyümede azalma gibi semptomlar görülebilir (Khillare ve ark., 2007; Gültepe ve ark., 2017). Sığırlar için günlük tavsiye edilen Fe miktarı 24 mg/kg CA olarak bildirilmiştir (NRC, 2001; Gültepe ve ark., 2017). İçme suyunda 3 mg/L düzeyinden fazla Fe bulunmasının su tüketiminin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir (Humann, 2016).

Doğumdan sonra ilk 120 günde sadece süt ile beslenen ve Fe eksikliği olduğu varsayılan buzağılara yapılan Fe sülfat katkısı, büyüme performansını ve besin madde sindirilebilirliğini etkilememiştir (Cui ve ark., 2017). Doğumdan sonra ilk 35 günde buzağılara 10 g/gün protein-demir kompleksi verilmesi toplam antioksidan ve glutasyon peroksidaz aktivitesini belirgin şekilde arttırmıştır. Daha yüksek dozda protein-demir kompleksi verilmesi ise toplam antioksidanı azaltmıştır (Kupczyński ve ark., 2017).

## **MANGAN**

NRC (2001); NRC (2000)' e kıyasla hayvanların Mn gereksinimini büyük ölçüde azaltmıştır. Son 10 yılda yayınlanan çalışmaların sonuçları besi sığırlarında 20 mg / kg KM Mn katkısının yeterli olduğunu göstermiştir. 16 mg Mn / kg KM'nin fetal gelişim için yetersiz olduğu tespit edilmiştir (Hansen ve ark., 2006; Spears ve Weiss, 2014). Rasyonda bulunan yüksek Fe miktarı hayvanın Mn gereksinimlerini artırabilir (Spears ve Weiss, 2014). Laktasyondaki ineklerin çoğu 2-3 mg / gün emilebilir Mn'a ihtiyaç duymaktadır ve KM bazında 14-16 mg/kg toplam Mn' ye karşılık gelir (NRC, 2001). Mn ile yapılan çalışmalara dayanarak ortalama süt veriminin 38 L / gün olduğu laktasyondaki ineklerin yaklaşık 580 mg Mn tüketmesi gerektiği belirtilmiştir (Faulkner, 2016; Weiss, 2014).

## KROM

Rasyona Cr(III) ilavesinin protein, lipit ve insulin metabolizmasını etkilediği belirtilmiştir (Gültepe ve ark., 2017). Glikozu insüline duyarlı hücrelere taşımada görevli olan Cr minerali ile ilgili sığırlarda yapılan bazı çalışmalar rasyona Cr katkısının glukoz tolerans testinde insülin yanıtını azalttığını göstermiştir (Sumner ve ark., 2007; Spears ve ark., 2012). Ayrıca gametogenez ve sağlıklı fetal büyüme için de gerekli olduğu ortaya konmuştur (Kumar ve ark., 2011).

Cr takviyesi ile yapılan çalışmalarının çoğunda buzağılamadan birkaç hafta önce Cr takviyesine başlanmıştır ve eklenen Cr düzeyleri genellikle 6–10 mg/gün arasında değişmiştir. Deneme gruplarının yaklaşık % 75'inde süt veriminde 1 kg/gün'den fazla bir artış sağlandığı ifade edilmiştir. (Weiss, 2014).

Krom, insüline duyarlı dokularda insülinin etkisini güçlendirerek işlev görür. Son 12 yılda, NRC komitelerinin besi ve süt sığırlarının Cr gereksinimlerini belirlemelerine olanak sağlayacak önemli araştırmalar yayınlanmıştır. FDA, 2006 yılında, 0.5 mg Cr / kg KM'ye kadar olan seviyelerde, Cr propiyonatının sığır rasyonlarında tamamlayıcı bir kaynak olarak kullanılmasının uygun olduğunu yayınlamıştır. Cr takviyesine verilen yanıtların insülin duyarlılığını azaltan koşullar altında en etkili olabileceği ifade edilmiştir (Spears ve Weiss, 2014).

Düve (Sumner ve ark., 2007; Spears ve ark., 2012), süt sığırı (Hayırlı ve ark., 2001) ve besi sığırı (Stahlhut ve ark., 2006) rasyonuna Cr takviyesi ile yapılan çalışmalarda i.v glikoz uygulamasını takiben insülin duyarlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, rasyonla günde 0, 3, 6 veya 9 mg/gün Cr ilave edilmiş düvelerde glukoz ve insülin metabolizması incelenmiştir. Eklenen tüm seviyelerde insulin duyarlılığı artmıştır (Spears ve ark., 2012). Çeşitli çalışmalar gebelik sonu ve laktasyon başı sırasında süt ineği rasyonuna Cr katkısının laktasyonun ilk döneminde kuru madde tüketimi (KMT) ve süt üretimini arttırdığını göstermiştir (Hayırlı ve ark., 2001; Smith ve ark., 2005). Süt ineklerinde gebelik oranının rasyona Cr katkısı ile iyileşme eğilimde olduğu belirtilmiştir (Soltan, 2010). Sıcaklık stresi altındaki sığırların rasyonlarına Cr katkısı, kan kortizol konsantrasyonlarının azaltılmasında etkili olmuştur (Spears ve Trivedi, 2013). Yapılan çalışmalarda sıcaklık stresine maruz kalan süt ineği rasyonuna Cr eklenmesi, KMT ve süt üretimini arttırmıştır (Soltan, 2010).

## BOR

Son yıllarda mikro element olarak kabul edilen bor minerali çoğunlukla kemik ve mineral metabolizması için gereklidir. Bor mineralinin yetersizliğinde, plazma ve organlardaki Ca ve Mg düzeyleri ile kemik kalsifikasyon düzeyleri etkilenmekte ve bu durum verimde azalma ve steroid hormon konsantrasyonlarında düşme ile sonuçlanmaktadır (Nielsen, 2017). Ruminantların rasyonlarına eklenecek uygun düzeyler konusunda belirsizlikler vardır. Borun rasyona eklenen formlarından biri olan borik asit, kurşun ve kadmiyum toksisitesi ile mikronükleus indüksiyonuna karşı korumada etkilidir (Nielsen, 2017).

Bor minerali Mg<sup>2+</sup> dan yararlanmada görev almaktadır. Aynı zamanda P ve Cu ile de etkileşim halinde bulunmaktadır (Dessordi ve Navarro, 2017; Nielsen, 2017). Ayrıca bor mineralinin trigliseritler ve glikoz gibi enerji substratları üzerinde etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Abdelnour ve ark., 2018). Süt sığırlarında yapılan bir çalışmada rasyona 30 g/gün sodyum borat ilavesi peripartum dönemde serum Mg, Ca konsantrasyonlarını olumlu yönde etkilemiştir. Bor ilaveli rasyonla beslenen deneme grubunda serum Ca ve Mg düzeyinin arttığı, P konsantrasyonunun ise etkilenmediği bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar borun rasyona katılmasının metabolik dengeyi sürdürmede faydalı olabileceği ve laktasyondaki ineklerde yağlı karaciğer, hipomagnezemi ve hipokalsemi gibi metabolik hastalıkların tedavisinde ve kontrol altına alınmasında etkili olabileceğini bildirmişlerdir (Kabu ve Civelek, 2012; Kabu ve ark., 2013).

Kalsiyum yetersizliği bulunan kuzularda yapılan bir çalışmada rasyona B ilavesi ile Ca' un emilimi artmıştır. Ayrıca Ca yetersizliği sonucu immun sistemin baskılanmasına bağlı immun organların morfolojisi ve fonksiyonlarındaki bozukluk rasyona B ilavesi ile düzelmeye göstermiştir (Bhasker ve ark., 2017). Holstein süt ineklerinde yapılan çalışmada rasyona bor ilavesinin, postpartum dönemde lipotrofik etkiyi ve negatif enerji dengesini iyileştirdiği ve lipitte çözünen metabolitlerin B dozuna bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Başoğlu ve ark., 2017). Yapılan başka bir çalışmada B eklenen rasyonla beslenen koçların rumen mikrobiyal fermentasyonu ve protozoa sayısının eklenen B dozuna bağlı olarak değişim gösterdiği tespit edilmiştir (Sızmaz ve ark., 2017).

## SONUÇ

Bazı iz minerallerin (Cu, Mo, Fe, Mn, Cr, B) ruminant rasyonlarına ilavesine yönelik yapılan son çalışmalarda her birinin farklı metabolik fonksiyonlarının olduğu ve birbirlerinin metabolizmalarını önemli ölçüde etkiledikleri ortaya konulmuştur. Özellikle son yıllarda B ile yapılan çalışmalar B mineralinin rasyona eklenmesinin endokrin sistemi, mineral ve kemik metabolizmasını ve immune sistemi pozitif olarak etkilediğini bildirmişlerdir.

Mikro minerallerin hayvan sağlığının sağlanması ve hayvandan optimum verimin alınması için uygun dozda ve formda rasyona katılmaları, bu uygulamayı yaparken temel rasyonun mineral içeriğinin iyi bilinmesi ve eklenecek minerallerin oranlarının antagonist etkileri dikkate alınarak iyi hesaplanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abdelnour SA, El-Hack ME A, Swelum AA, Perillo A, Losacco C 2018. The vital roles of boron in animal health and production: a comprehensive review. *J Trace Elem Med Biol.* 50: 296-304.
- Basoglu A, Baspinar N, Tenori L, Vignoli A, Gulersoy E 2017. Effects of boron supplementation on peripartum dairy cows' health. *Biol Trace Elem Res.* 179(2): 218-225.
- Bhasker TV, Gowda NKS, Pal DT, Bhat SK, Krishnamoorthy P, Mondal S, Verma AK 2017. Influence of boron supplementation on performance, immunity and antioxidant status of lambs fed diets with or without adequate level of calcium. *PLoS ONE* 12 (11): e0187203.
- Bidewell CA, Drew JR, Payne JH, Sayers AR, Higgins RJ, Livesey CT 2012. Case study of copper poisoning in a British dairy herd. *Vet. Rec.* 170:464.
- Boğa M, Filik G 2011. The importance of organic trace minerals in ruminant feeding: a review. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 51(1): 31-40.
- Cui K, Tu Y, Wang YC, Zhang NF, Ma T, Diao QY 2017. Effects of a limited period of iron supplementation on the growth performance and meat colour of dairy bull calves for veal production. *Anim Prod Sci*, 57(4):778
- Dessordi R, Navarro MA 2017. Boron action in bone health. *Review Article. Rheumatol Orthopedic Med.* 2(1): 1-3.
- Engle TE 2011. Copper and lipid metabolism in beef cattle: A review. *Journal of animal science*, 89(2): 591-596.
- Bampidis V, Azimonti G, Bastos MDL, Christensen H, Dusemund B, Marcon F 2019. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Safety and efficacy of a molybdenum compound (E7) sodium molybdate dihydrate as feed additive for sheep based on a dossier submitted by Trouw Nutrition International BV. *EFSA Journal*, 17(2): e05606.
- Faulkner MJ 2016. Effects of trace mineral supplementation in lactating dairy cows. Ph.D. Dis. The Ohio State Univ., Columbus.
- Gültepe EE, Uyarlar C, Çetingül İS, Iqbal A, Bayram İ 2017. Ruminantlar İçin Vitamin Mineral Katkıları ve Etkileri. *Türkiye Klinikleri Animal Nutrition and Nutritional Diseases-Special Topics*, 3(3): 218-226.
- Hall JO 2018. Molybdenum. In *Veterinary Toxicology*. 463-467 pp. Academic Press.
- Hansen S L, Spears J W, Lloyd K E, Whisnant C S 2006. Feeding a low manganese diet to heifers during gestation impairs fetal growth and development. *Journal of dairy science*, 89(11): 4305-4311.
- Hayirli A, Bremmer DR, Bremmer SJ, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR 2001. Effects of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1218-1230.
- Humann-Ziehanck E 2016. Selenium, copper and iron in veterinary medicine - from clinical implications to scientific models. *J Trace Elem Med Biol*, 37:96-103
- Kabu M, Civelek T 2012. Effects of propylene glycol, methionine and sodium borate on metabolic profile in dairy cattle during periparturient period. *Rev. Med. Vet.* 163(8-9): 419-430.
- Kabu M, Birdane FM, Civelek T, Uyarlar C 2013. Affects of boron administration on serum Ca, Mg and P of peripartum Cows. *Arch Anim Breed.* 56(1): 733-741.

- Khillare KP, Sahatpure SK, Vanlalpeka K, Bombatkar R S, Tijare GS 2007. Trace minerals and reproduction in animals. *Intas Polivet*, 8(2): 308-314.
- Kumar S, Pandey AK, AbdulRazaque WA, Dwivedi, DK 2011. Importance of micro minerals in reproductive performance of livestock. *Veterinary World*, 4(5): 230.
- Kupczyński R, Bednarski M, Śpitalniak K, Pogoda-Sewerniak K. 2017. Effects of Protein-Iron Complex Concentrate Supplementation on Iron Metabolism, Oxidative and Immune Status in Prewaning Calves. *International journal of molecular sciences*, 18(7): 1501.
- McDowell LR 2002. Recent advances in minerals and vitamins on nutrition of lactating cows. *Pak. J. Nutr*, 1: 8-19.
- Nielsen FH 2017. Historical and recent aspects of boron in human and animal health. *Bor Dergisi*, 2(3): 153-160.
- NRC (National Research Council), National Research Council Staff, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, National Academy of Sciences 2000. Nutrient requirements of beef cattle: Update 2000. National Academies Press.
- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev ed. Washington, DC. National Academies Press.
- Pino F, Urrutia NL, Gelsinger SL, Gehman AM, Heinrichs AJ 2018. Long-term effect of organic trace minerals on growth, reproductive performance, and first lactation in dairy heifers. *The Professional Animal Scientist*, 34(1): 51-58.
- Rasby R, Berger AL, Bauer DE, Brink DR 2011. Minerals and vitamins for beef cows. University of Nebraska-Lincoln, Extension.
- Ryan AW, Kegley EB, Hawley J, Powell JG, Hornsby JA, Reynolds JL, Laudert SB 2015. Supplemental trace minerals (zinc, copper, and manganese) as sulfates, organic amino acid complexes, or hydroxy trace-mineral sources for shipping-stressed calves. *The Professional Animal Scientist*, 31(4): 333-341.
- Scaletti RW, Trammell DS, Smith BA, Harmon RJ 2003. Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86(4): 1240-1249.
- Sizmaz O, Koksall BH, Yildiz G 2017. Rumen microbial fermentation, protozoan abundance and boron availability in yearling rams fed diets with different boron concentrations. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26(1): 59-64.
- Smith KL, Waldron MR, Drackley JK, Socha MT, Overton TR. 2005. Performance of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the transition period. *J. Dairy Sci.* 88:255– 263.
- Soltan MA 2010. Effect of dietary chromium supplementation on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows under heat stress. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 94:264–272.
- Spears JW, Trivedi S 2013. Chromium (III) and the immune system. In *Encyclopedia of Metalloproteins*. V. N. Uversky, R. H. Kretsinger, and E. A. Permyakov, ed. Springer, New York, NY. 641–645 p.
- Spears JW 2003. Comparative trace element nutrition. *Anim Sci*, 11: 1506-9.
- Spears JW 2002. Overview of mineral nutrition in cattle: the dairy and beef NRC. In *Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 113-26 pp.
- Spears JW, Weiss WP 2014. Invited review: Mineral and vitamin nutrition in ruminants. *The professional animal scientist*, 30(2): 180-191.
- Spears JW, Whisnant CS, Huntington GB, Lloyd KE, Fry RS, Krafka K, Lamptey A, Hyda J 2012. Chromium propionate enhances insulin sensitivity in growing cattle. *J. Dairy Sci.* 95:2037-2045.
- Stahlhut HS, Whisnant CS, Spears JW 2006. Effect of chromium supplementation and copper status on performance and reproduction of beef cows. *Animal feed science and technology*, 128(3-4): 266-275.
- Sumner JM, McNamara JP, Valdez F 2007. Effects of chromium propionate on response to an intravenous glucose tolerance test in growing holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 90:3467-3474.

- Weiss WP, Spears JW 2006. Vitamin and trace mineral effects on immune function of ruminants. In Ruminant physiology. Wageningen Acad. Publ, Utrecht, the Netherlands. 473-496 pp.
- Weiss WP 2014. Trace minerals and vitamins for dairy cows. In Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, Florida.
- Weiss WP 2017. A 100-Year Review: From ascorbic acid to zinc—Mineral and vitamin nutrition of dairy cows. *Journal of dairy science*, 100(12): 10045-10060.

DRAFT

## Işınlama teknolojisinin gıda kalitesi ve duyuşsal özellikler üzerine etkileri

Erhan İç<sup>1</sup>, Nurcan Çetinkaya<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Radyasyon ve Hızlandırıcı Teknolojileri Dairesi Başkanlığı, Saray Mah., Atom Cad., No: 27, 06983 Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 55139 Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar: nurcanc@omu.edu.tr

### Özet

Işınlama teknolojisi dünyada hasat sonrası ortaya çıkan gıda kayıplarının azaltılması, gıda kalitesinin yükseltilmesi, depolama süresinin uzatılması, mikrobiyolojik bozulmanın önlenmesi ve böceklenmenin önüne geçilmesi vb. amaçlarla dünyada geniş bir ticari uygulama alanı bulmuştur. Günümüzde aralarında Türkiye'nin de bulunduğu yaklaşık 70 ülkede gıda ışınlama ile ilgili yasal düzenleme ve/veya gıda ışınlama tesisi bulunmaktadır. Sadece Çin'de 700.000ton/yıl düzeyinde gıda ışınlanmaktadır. 1980 yılında WHO/FAO/IAEA ortak çalışma grubunun 10kGy ışınlama dozunun sağlık yönünden güvenilir olduğunu kabul etmesine kadar geçen dönemde yüzlerce araştırma projesi yürütülmüş, hiçbir gıda prosesi bu kadar ayrıntılı ve yoğun olarak araştırılmamıştır. Gıda ışınlama teknolojisi ısı enerjisinden yararlanılarak gerçekleştirilen pastörizasyon, kurutma, konserve ve dondurma metotları gibi fiziksel bir işlemdir. Diğer fiziksel işlemlerden farkı, kullanılan enerjinin ısı enerjisi yerine "iyonlaştırıcı enerji" olmasıdır. Işınlamanın gıda bileşenleri ve duyuşsal özellikler (tat, flavor, koku, renk, tekstür vb.) üzerine olan etkileri yoğun olarak araştırılmış ve araştırılmaya devam etmektedir. Ancak diğer gıda proseslerinden farklı ve/veya aynı dezavantajlara sahip olduğu hala gösterilememiştir. Uluslararası ve ulusal düzeyde, mevcut yasal düzenlemelere göre, tekniğine uygun olarak yapılan ışınlama işlemi gıdanın kalitesini etkilememekte, üstelik önemli avantajlara sahip bulunmaktadır. WHO, FAO, IAEA, CODEX ve EC gibi uluslararası kuruluşlar tarafından kabul görmüş ve uluslararası ticaret için yasal düzenlemeleri yapılmıştır. Türkiye'de de gıdaların ışınlanması ile ilgili yasal mevzuatlar mevcuttur ve ışınlanmış gıdaların tespiti ilgili kurumlar tarafından yapılmaktadır. Bu derleme bildirisinde ışınlama teknolojisinin gıda kalitesi ve duyuşsal özellikler üzerine etkileri konusunda sağlamış olduğu yararlar konusunda mevcut durum ve gelişmeler üzerinde durulacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda ışınlama, gıda kalitesi, duyuşsal özellikler, gıda koruma metodu.

### Abstract

Irradiation technology can be used to reduce post-harvest food losses, improve food quality, extend storage time, prevent microbiological deterioration and insects e.g. for commercial purposes in the world has found a wide range of applications. Nowadays food irradiation regulations and / or food irradiation facility found in nearly 70 countries including Turkey. In China alone, 700,000 tons / year of food is irradiated. Hundreds of research projects have been conducted until 1980 and the WHO / FAO / IAEA joint working group acknowledged that the radiation dose of 10kGy was reliable in terms of health, and no food process was investigated in such a detailed and intensive manner. Food irradiation technology is a physical process such as pasteurization, drying, canning and freezing methods performed by using heat energy. The difference from other physical processes is that the energy used is "ionizing energy" instead of heat energy. The effects of irradiation on food components and sensory properties (taste, flavor, smell, color, texture, etc.) have been extensively investigated. However, it has yet to be demonstrated that it has different and / or the same disadvantages as other food processes. At the international and national level, according to the current legal regulations, irradiation performed in accordance with the technique does not affect the quality of the food and has significant advantages. It has been accepted by international organizations such as WHO, FAO, IAEA, CODEX and EC and legal arrangements have been made for international trade. Turkey has a food irradiation legislation since 1999 and the detection of irradiated foods has been carried out by the responsible authorities. This review will focus on the current situation and developments in the benefits of irradiation technology on food quality and sensory properties.

**Keywords:** Food irradiation, food quality, sensory properties, food preservation method.

## 1. GİRİŞ

Gıdaların muhafazasında kullanılan geleneksel yöntemlerin yanında gıda ışınlama 2. Dünya savaşından sonra nükleer teknolojinin barış için kullanılması esasına dayanarak gelişen bir teknolojidir. Son 70 yıl içinde nükleer tekniklerin gıda ve tarımda uygulanabilirliği ve etkinliği yoğun olarak araştırılmıştır. Işınlamanın gıdalar üzerine etkileri, uluslararası düzeyde 23 ülkenin katılımı gerçekleştirilen projeler ve işbirlikleri sayesinde uzun yıllar (1961-1980) incelenmiş ve periyodik olarak sonuçlar gözden geçirilmiştir. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) /FAO (Gıda ve Tarım Örgütü)/IAEA (Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı) birleşik uzmanlar komitesi 1980 yılında o güne kadar yapılan araştırmaları değerlendirerek (400'den fazla çalışma incelenmiş; 250'si kabul edilmiş veya rezerv konarak kabul edilmiş, 150'sini reddedilmiş, 20 adet çalışma ise değerlendirilmemiştir), *'Herhangi bir gıdanın ortalama 10 kGy doza kadar ışınlanması toksikolojik olarak tehlike oluşturmaz, belirgin besinsel ve mikrobiyolojik problemlere yol açmaz'* (WHO, 1981 ve 1999) şeklinde bir karar açıklanmıştır. 1983 yılında ise Codex Alimentarius Komisyonu tarafından the Codex General Standard for Irradiated Foods (Worldwide Standard) standardı yayınlamıştır (CODEX, 1983). 2003 yılında 10 kGy olan maksimum doz limiti kaldırılarak standart yeniden revize edilmiştir (CODEX, 2003). ABD'de, FDA aromatik bitkilerin, tohumların, baharatın, sebze özütlerinin maksimum 30 kGy doza kadar ışınlanmasına izin vermiştir (Anonymous, 2012a). Avrupa Komisyonu (EC) ise gıda ışınlama konusunda yayınladığı 1999/3/EC nolu direktifi ile sadece *'kurutulmuş aromatik otlar, baharatlar ve sebze çeşnileri'* nin 10 kGy maksimum doza kadar ışınlanabileceğini açıklayan pozitif listeyi yayınlamıştır (Anonymous, 1999a).

## 2. GIDA IŞINLAMA

Gıda ışınlama temel olarak, gıda maddesinin istenilen bir teknolojik amaca ve yöntemine uygun olarak yeterli bir dozda iyonize radyasyona maruz bırakılması işlemidir. Işınlanan gıdanın 1 kg'ı başına absorblanan ortalama radyasyon enerjisinin kilojul olarak miktarı yani doz Kilo Gray (kGy) olarak ifade edilir. Bir teknolojik bir amaca ulaşmak için gıdaya verilen maksimum absorblanan doz 10kGy'i geçemez (CODEX, 1983; Anonymous, 1999b). Türk Gıda Işınlama yönetmeliğinde yedi gıda grubunun (Tablo 1) ışınlanmasına izin verilmekte olup, ışınlanmış gıdaların tespiti ilgili kurumlar tarafından yapılmaktadır. Bugüne değin kazanılan deneyimler bu tekniğin avantajlarının ortaya koymuştur (CODEX, 1983; WHO, 1981 ve 1999; Roberts, 2014): 1. Sağlık yönünden güvenilirliği onaylanmıştır, 2. Çok yönlü uygulamaları mevcuttur. 3. Spor yapmayan tüm bakterilere, böceklerle ve diğer birçok zararlılara karşı geniş spektrumda etkinliğe sahiptir. 4. Soğuk bir işlemdir, 5. Gıdalar son ambalajlarında ışınlanır. 6. Katı, çığ gıdalar ışınlanabilir. 7. Işınlama sonucunda kimyasal kalıntı oluşmaz. Günümüzde, dünyada aralarında Türkiye'nin de bulunduğu yaklaşık 70 ülkede gıda ışınlama ile ilgili yasal düzenleme ve/veya gıda ışınlama tesisi bulunmaktadır (Yoon, 2011; Anonymous, 2012b; Eustice, 2018; Koutchma ve ark., 2018). Bu teknoloji dünyada, ABD ve başta Çin olmak üzere Asya-Pasifik bölgesindeki ülkelerde kırmızı ve beyaz et ile meyve sebzeler ile baharat ışınlanması konusunda büyük gelişim göstermiştir. 2015 yılı için Çin de ışınlanan gıda miktarının >600.000ton'dan fazla olduğunu ifade edilmektedir (Eustice, 2018). Shen (2017) ışınlanmış gıda hacminin her yıl yaklaşık olarak %20 düzeyinde arttığını, 2015 yılında ışınlanan gıda miktarının 400.000tonu aştığını ve bunun 2,6 Milyar dolarlık (\$) bir ticaret hacmini işaret ettiğini, 2010-2016 arasında bu değer 3 kat artış gösterdiğini bildirmiştir. Bu değerlendirmeler ışığında 2018 yılı için sadece Çin de ışınlanan gıda miktarının 700.000 tonun üzerinde olduğu anlaşılmaktadır.

## 3. IŞINLAMANIN GIDA KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Gıda ışınlama teknolojisi ısı enerjisinden yararlanılarak gerçekleştirilen pastörizasyon, kurutma, konserve ve dondurma metotları gibi fiziksel bir işlemdir. Diğer fiziksel işlemlerden farkı, kullanılan enerjinin ısı enerjisi yerine *'iyonlaştırıcı enerji'* olmasıdır (Bradley, 1984).



**Tablo 1.** Türkiye’de Gıda Gruplarında Belirli Teknolojik Amaçlara Göre Uygulanmasına İzin Verilen Işınlama Dozları (kGy)

---

<b>Grup 1: Soğanlar, kökler ve yumrular:</b> Depolama sırasında filizlenme, çimlenme ve tomurcuklanmayı önlemek (0.2 kGy)
<b>Grup 2: Taze meyve ve sebzeler (Grup 1’in dışındakiler):</b> Olgunlaşmayı geciktirmek (1 kGy), böceklenmeyi önlemek (1 kGy), raf ömrünü uzatmak (2.5 kGy), karantina kontrolü (1 kGy)
<b>Grup 3: Hububat, öğütülmüş hububat ürünleri, kabuklu yemişler, yağlı tohumlar, baklagiller, kurutulmuş sebzeler ve kurutulmuş meyveler:</b> Böceklenmeyi önlemek (1 kGy), mikroorganizmaları azaltmak (5 kGy), raf ömrünü uzatmak (5 kGy)
<b>Grup 4: Çiğ balık, kabuklu deniz hayvanları ve bunların ürünleri ( taze veya dondurulmuş), dondurulmuş kurbağa bacağı:</b> Bazı patojenik mikroorganizmaları azaltmak (5 kGy), raf ömrünü uzatmak (3 kGy), paraziter enfeksiyonların kontrolü (2 kGy)
<b>Grup 5: Kanatlı, kırmızı et ile bunların ürünleri (taze veya dondurulmuş):</b> Bazı patojenik mikroorganizmaları azaltmak (7 kGy), raf ömrünü uzatmak (3 kGy), paraziter enfeksiyonların kontrolü (3 kGy)
<b>Grup 6: Kuru sebzeler, baharatlar, kuru otlar, çesniler ve bitkisel çaylar:</b> Bazı patojenik mikroorganizmaları azaltmak (10 kGy), böceklenmeyi önlemek (1 kGy)
<b>Grup 7: Hayvansal orijinli kurutulmuş gıdalar:</b> Böceklenmeyi önlemek (1 kGy), küflerin kontrolü (3 kGy)

---

Yüksek su içeriğine sahip gıdalarda, suyun radyolizi ile reaktif hidroksil (HO\*) ve hidrojen radikalleri (H\*) üretir. Bu radikaller su (H<sub>2</sub>O), hidrojen gazı (H<sub>2</sub>) veya hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşturmak için yeniden birleşebilir veya diğer gıda bileşenleriyle reaksiyona girebilir. Bununla birlikte, bu radyoliz ürünleri çok küçük miktarlarda oluşur ve genellikle ışınlanmamış gıdalarda bulunan bileşiklerle aynıdır (FDA, 1997). Işınlamanı gıda moleküllerinde oluşturduğu temel değişiklikler şu şekilde özetlenebilir (Stefanova ve ark., 2010): 1. Elektron kaybı yoluyla elektrik yüklü türlerin (iyonların) ve eşleştirilmemiş elektronlarla nötral fragmentlerin yani serbest radikaller oluşması (direk radyoliz ürünleri), 2. Gıda moleküllerinin kimyasal bağlarının bölünmesi, 3. Kimyasal bağların yeniden düzenlenmesi veya yüksek oranda reaktif radikallerin gıda bileşenleri ile reaksiyonlarının sonucunda ise indirekt radyoliz ürünlerinin oluşması. Işınlanmanın direk ve indirek etkisi sonucu oluşan serbest radikaller çok kısa (10<sup>-3</sup>sn) ömürlüdür (Stewart, 2001). Işınlanan gıdada kimyasal reaksiyonlar, tepkimeye giren gıda bileşenlerinin yapısı, ortam atmosferi (havalı, azaltılmış oksijen, vakum vb.), gıdanın fiziksel durumu (katı veya donmuş, sıvı veya donmamış vb.), sıcak ve radyasyon dozundan direk olarak etkilenmektedir (Diehl, 1995; FDA, 1997). Işınlamanın gıda kalitesine etkisi doğrudan gıda bileşenlerinde ve duyuşal özelliklerde meydana gelen değişimlerle doğrudan ilişkilidir.

### 3.1. Proteinlere Etkisi

Işınlama sonucu proteinlerde ortaya çıkan reaksiyonlar, protein yapısı (globular veya fibroz), protein kaynağı (doğal veya denatüre), fiziksel durum (çözültide, katı, donmuş), amino asit bileşimi gibi çeşitli etkenlere bağlıdır. Reaksiyonlar protein yapısında, ayrışma, topaklanma, çapraz bağlama ve oksidasyon şeklinde görülür (EFSA, 2011). En önemli reaksiyon tipi, orijinal proteinden daha kısa uzunlukta polipeptidler oluşturmak için az sayıda peptid bağının kırılmasıdır (Taub ve ark., 1979). Işınlamaya bağlı topaklanma veya ayrı ayrı polipeptid zincirlerinin çapraz bağlanması da oluşabilir; bu reaksiyonlar protein denatürasyonuna neden olur (Delincee, 1983a). Örneğin, fındıkların 10 kGy’de ışınlanması proteinlerin topaklanmasına ve denatürasyonuna neden olmuştur (Doğan ve ark., 2007). Kırmızı, beyaz et ve deniz ürünleri üzerinde yapılan araştırmalar, ışınlama sonucu oluşan radyoliz ürünlerinin çoğunun, orijinal protein ile aynı amino asit kompozisyonuna sahip olduğunu ortaya koymuştur (Diehl, 1995). Bu değişiklikler ısıtma sonucu meydana gelenlere benzerdir. Gıdalar -168 ile +60°C arasında değişen sıcaklıklarda 50 kGy’e kadar olan çok yüksek dozlarda bile ışınlandığında, bu değişiklikler ısıtmadan çok daha az belirgindir ve üretilen reaksiyon ürünleri miktarı çok daha düşüktür (FDA, 2012). Sonuç olarak, etlerin (2-7 kGy) dozlarında ışınlanması, proteinlerin veya amino asitlerin besin değeri üzerinde önemli bir etkiye sahip değildir (Thayer, 1987).

### 3.2. Lipidlere Etkisi

Lipidlerin ışınlanması sonucu oluşan ürünlerin miktarı, gıdadaki lipid konsantrasyonu, fiziksel durum (sıvı veya katı), yağ asitlerinin doymuş olup olmaması, antioksidanların varlığı, çevre koşulları (ışık, ısı, oksijen, nem, pH), ışınlama işlemi, depolama türü (vakum, modifiye atmosfer vb.) gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmekte ve birkaç kimyasal reaksiyon üretilmektedir (Delincée, 1983b). Diğer taraftan ışınlamanın lipid oksidasyonunu hızlandırdığı gösterilmiş (Stewart, 2009) olup, bu etki ışınlama sırasında oluşan serbest radikallerden dolayı daha büyük yağ içeriğine ve yüksek doymuş yağ asidi içeriğine sahip gıdalarda daha önemlidir. Çünkü doymamış yağ asitlerinde karbonil gruplarında ve karbon çift bağlarında elektron eksikliği olduğundan, ışınlama bu noktalarda serbest radikallerin oluşmasına neden olabilir. Bu etki ancak düşük sıcaklık ve ortamda oksijen varlığı azaltılarak en aza indirilebilir (Stefanova ve ark., 2010). Lipidlerin (ağırlıklı olarak ette trigliseritler) ışınlanması sonucu yağ asitleri, esterler, aldehitler, ketonlar, alkanlar, alkenler gibi çeşitli radyoliz ürünleri tanımlanmıştır (Diehl, 1995). Ancak 56 kGy gibi çok yüksek bir dozda vakum altında ışınlanmış, dondurulmuş sığır etinde birçoğu lipid fraksiyonundan kaynaklanan 65 uçucu radyolitik ürün tanımlanmış, bu ürünlerin ışınlanmamış gıdalarda bulunan maddelere özdeş ya da yapısal olarak benzer olduğunu ve bu tek tek radyolitik ürünlerin çok küçük miktarlarda (1-700ppb) ortaya çıktığı tespit edilmiştir (FDA, 1997). Işınlamanın balıktaki yağ asidi kompozisyonu üzerindeki etkileri araştırıldığında, 1, 2 veya 6 kGy'de ışınlamanın yağ asidi profillerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı, örnekler arasındaki yağ asidi kompozisyonundaki değişikliklerin ışınlamaya bağlı değişikliklerden daha büyük olduğu bildirilmiştir (Armstrong ve ark., 1991). Sonuç olarak lipidler içeren gıdalar  $\leq 7$  kGy dozda ışınlandığı zaman önemli bir besin değeri kaybı oluşmaz (Thomas, 1988).

### 3.3. Karbhidratlara Etkisi

Saf bir glukoz çözeltisi ışınlandığında, format, asetat, propiyonat, laktat, akrilat, fumarat, dimetil fumarat, benzoat, metil benzoat ve fenil asetat gibi birçok ürün oluşur. Eğer ortamda oksijen varsa, D-glukonik asit, D-glukuronik asit ve glikokal gibi muttemelen 6 farklı glukoz radikalinin oluşması gibi daha ileri reaksiyonlar görülürken, nişasta bir glikozidik bağın bölünmesi ile bozulmaya uğrar (Simic, 1983). Mısır, buğday, pirinç veya patatesten elde edilen gıda nişastaları 0 - 6.2 kGy dozda ışınlandığında malonaldehid, formaldehit, asetaldehit, formik asit ve hidrojen peroksit gibi radyolitik ürünler ortaya çıkar. Mısır nişastasının 0 - 50 kGy'e kadar farklı dozlarda ışınlanmasından sonra gliseraldehit (0-8 $\mu$ g/mL), dihidroksiaseton (0-2.5  $\mu$ g/mL) ve 2-hidroksimalonaldehit (0-9  $\mu$ g/mL) oluştuğu saptanmıştır (Raffi ve ark., 1981a ve 1981b). 2003 yılında yayınlanan bir çalışmada, 90 mg/mL konsantrasyonda fruktoz, glukoz, sukroz ve nişasta çözeltileri, 5°C'de 3 kGy dozda ışınlandığı zaman, fruktoz çözeltisinden yaklaşık 0.45 $\mu$ g/mL malonaldehit, 1.1  $\mu$ g/mL formaldehit ve 0.1 $\mu$ g/mL asetaldehit oluştuğu; glukoz çözeltisinden, <0.1 $\mu$ g/mL malonaldehit, 0.15  $\mu$ g/mL formaldehit ve iz miktarda asetaldehit; sukrozdan 0.3  $\mu$ g/mL malonaldehit, 0.8 $\mu$ g/mL formaldehit ve iz miktarda asetaldehit; nişastadan ise iz miktarda malonaldehid, 0.2 $\mu$ g/mL formaldehit ve 0.2 $\mu$ g/mL asetaldehit oluştuğu tespit edilmiştir (Fan, 2003).

### 3.4. Mineral Maddelere Etkisi

Herhangi bir gıdanın ışınlanması, iz miktarlarda bulunan mineral seviyelerini etkilemez (Diehl, 1995).

### 3.5. Vitaminlere Etkisi

Işınlama, ısı işleme benzer şekilde bazı vitaminlerin seviyesini azaltabilir. Vitamin çeşidi, gıdanın türü ve ışınlama koşullarına bağlı olarak vitaminlerin miktarı ışınlama sonucu azalabilir. Bununla birlikte, tüm vitamin kaybı beslenme açısından önemli olmayıp, belirli bir vitamin seviyesindeki bir azalmanın anlamlı olmasının derecesi, söz konusu yiyeceğin, toplam diyet alımına olan nispi katkısına bağlıdır (FDA, 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gıdaların ışınlanması sonucu bazı vitaminlerin miktarının azaldığı halde, büyük miktarda vitaminin, tiamin ve E vitamini hariç, ciddi bir şekilde etkilenmediği sonucuna varmıştır. Ortalama 10 kGy'lik dozda veya altında gerçekleştirilen ışınlama sonucu oluşan kayıplar küçüktür (%10-20) ve ısı işlem, kurutma vb. diğer gıda işleme biçimleriyle görülen kayıplara benzer şekilde ortaya çıkmaktadır (WHO, 1994). Pastörizasyon veya sterilizasyon gibi ışınlama da gıdada benzer şekilde vitamin kayıplarına neden olabilir (Tablo 2). Görüldüğü üzere, tavuk etinin farklı proseslere maruz bırakılması sonucu tespit edilen vitamin kayıpları her proses için benzer aralıklar içinde olup, çok fazla fark bulunmamaktadır (Thayer, 1990). Vitaminler saf çözelti yerine bir gıda matrisinde ışınlandığında ortaya çıkan kayıplar çok daha düşük olmaktadır (Zegota, 1988). Ayrıca, gıdalar donma sıcaklıklarında ve oksijensiz koşullarda ışınlandığı takdirde vitamin kayıpları en aza indirilebilmektedir (Diehl, 1991).

**Tablo 2.** Farklı Uygulamalar Sonucunda Tavuk Etinde Tespit Edilen Vitamin Konsantrasyonları

Vitamin	Uygulanan Proses			
	Dondurma	Isıl işlem (sterilizasyon)	Gama ışınlama (-25°C, 59 kGy)	Elektron demeti ile ışınlama (-25°C, 59 kGy)
Tiamin-HCl (ppm)	2.31	1.53	1.57	1.98
Riboflavin (ppm)	4.32	4.60	4.46	4.90
Pridoksin (ppm)	7.26	7.62	5.32	6.70
Niasin, bağlı form (ppm)	218.6	220.9	209.8	212.1
Pantotenik asit (ppm)	24	21.8	23.5	24.9
Biotin (ppm)	0.093	0.097	0.098	0.103
Folik asit (ppm)	0.83	1.22	1.26	147
A Vitamini (IU/kg)	2716	2340	2270	2270
D Vitamini (IU/kg)	375.1	342.8	354	466.1
K Vitamini (ppm)	1.29	1.01	0.81	0.85
B12 Vitamini (ppm)	0.0083	0.0164	0.0137	0.0088

Yağda çözünen vitaminler ışınlamaya karşı farklı düzeyde duyarlılık göstermekte olup bu sıralama E vitamini >  $\beta$ -karoten > A vitamini > D vitamini > K vitamini şeklindedir (Diehl, 1995). E vitamini en hassas olanıdır. 1 kGy dozda ışınlanan ve 6 ay depolanan yulaflı ekmekte E vitamini kaybı yaklaşık %44 düzeyinde gerçekleşmiştir (Diehl, 1991). Suda çözünen vitaminler ışınlamaya karşı farklı düzeyde hassasiyet göstermektedir. Tiamin, etlerde (özellikle domuz etinde) en duyarlı vitamindir (Stewart, 2009). C vitamini ışınlamaya karşı duyarlıdır ve dehidroaskorbik asit üretmek için reaksiyona girebilir ancak, reaksiyon geri dönüşümlüdür (Fan ve Sokorai, 2008). 8.7 kGy'e kadar ışınlanmış portakal suyunda toplam askorbat miktarında her kGy artışı için yaklaşık %2.7'lik bir doğrusal kayıp olduğunu bildirilmiştir (Fan ve ark., 2002). Taze öğütülmüş buğday unu 1 kGy dozda ışınlandığında  $\beta$ -karoten miktarının %2-7 azaldığı bildirilmiştir (Diehl ve ark., 1991). B6, B12, riboflavin ve niasinin ışınlamaya oldukça dayanıklı oldukları tespit edilmiştir (Diehl, 1991).

### 3.6. Duyusal Özelliklere Etkisi

Bu teknolojinin uygulanmasında bilimsel verilere dayanılarak hazırlanan yasal düzenlemelerde verilen doz limitleri teknolojik amaca ulaşma sınırlarını göstermektedir (Tablo 1). Bu sınırların üzerine çıkılmadığı sürece ışınlama gıdaların duyusal veya diğer organoleptik özelliklerini önemli ölçüde etkilemez (Khattak ve Rahman, 2016). Bu konudaki bazı örnekler Tablo 3'te verilmiştir. Işınlamanın neden olduğu değişiklikler çok düşük düzeyde ve duyusal testler ile kolaylıkla anlaşılmadığı için ışınlanmış gıdaların tespiti için GC, TL, ESR gibi cihazlara dayalı deteksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Diğer taraftan ambalaj üzerindeki etiket ile gıdanın ışınlandığı belirtilmektedir. Eğer ışınlama dozu tavsiye edilen teknolojik sınırın üzerine çıkarsa, gıdanın kimyasal ve duyusal özelliklerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Tat, koku, renk veya doku üzerinde istenmeyen etkilerden kaçınmak için gıdadaki bu kimyasal değişikliklerin derecesini en aza indirmeye yönelik olarak ışınlama, genellikle düşük oksijen seviyeleri altında veya donmuş halde yiyeceklerde gerçekleştirilir (FDA, 1997). Örneğin ışınlama sırasında et sıcaklığının düşürülmesi koku ve lezzet ışınlamanın üzerindeki etkileri azaltmaktadır. Diğer taraftan ambalaj içinde oksijenin dışarıda bırakılması, inert gazlarla oksijenin değiştirilmesi, antioksidanlar gibi koruyucu maddelerin eklenmesi ve ışınlama sonrası depolama, lezzetin normale yakın seviyelere dönmesini sağlamak için kullanılabilir (Brewer, 2009).

**Tablo 3.** Çeşitli Gıdaların Işınlanması Sonucu Duyusal Özelliklerde Önemli Değişiklikler Belirlenmediğine İlişkin Bazı Örnekler

Doz (kGy)	Ürün	Kaynak
<3	Sığır eti	Vickers ve Wang, 2002
0.75, 3.0, 5.0	Tavuk eti	Javanmard ve ark., 2006
0.5, 1.2	Mısır	Navaiz ve ark., 1992
1	Iceberg, marul, ıspanak, domates, havuç, brokoli, kişniş, maydanoz, yeşil soğan, kırmızı lahana ve kereviz	Fan ve Sokorai, 2008
0.4	Mango	Yadav ve ark., 2013

#### 4. KAYNAKLAR

- Anonymous 1999a. Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. Directive 1999/3/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999, Official Journal of the European Communities, 13.03.1999, L66/24e25.
- Anonymous 1999b. Gıda ışınlama yönetmeliği. 06.11.1999 tarih ve 23868 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
- Anonymous 2012a. Ionizing radiation for the treatment of food. FDA, CFR – Code of Federal Regulations Title 21, Section 179.26 (b) (5), Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=179.26> [Erişim: 6.6.2013]
- Anonymous 2012b. Food irradiation clearances database. International Atomic Energy Agency, Available at: <http://nucleus.iaea.org/ifa/FoodAuthorisationDisplay.aspx> [Erişim: 26.12.2012]
- Armstrong SG, Wylie SG, Leach DN 1991. Effects of preservation by gamma-irradiation on the nutritional quality of Australian fish. Food Chemistry, 50:351-357.
- Bradley R 1984. Radiation Technology Handbook, 1st Edition, New York: Marcel Dekker, 334p.
- Brewer MS 2009. Irradiation effects on meat flavor: A review. Meat Science, 81:1-14.
- CODEX 1983. Codex general standard for irradiated foods, CAC/vol. XV, E-1, Codex Stan 106-1983, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome, 3p.
- CODEX 2003. Revised codex general standard for irradiated foods. (Codex Stan 106-1983), Rev.1-2003, Rome, Codex Alimentarius Commission.
- Delincée H 1983a. Recent advances in the radiation chemistry of proteins, In: Elias S, Cohen AJ (eds), Recent Advances in Food Irradiation. Amsterdam: Elsevier, pp.129-148.
- Delincée H 1983b. Recent advances in radiation chemistry of lipids, In: Elias S, Cohen AJ (eds), Recent Advances in Food Irradiation. Amsterdam: Elsevier, Amsterdam: Elsevier, pp.89-114.
- Diehl JF 1991. Nutritional effects of combining irradiation with other treatments. Food Control, 2:20-25.
- Diehl JF, Hasselmann C, Kilcast D 1991. Regulation of food irradiation in the European Community: is nutrition an issue?. Food Control, 2:212-219.
- Diehl JF 1995. Chemical effects of ionizing radiation, In: Diehl JF (ed) Safety of Irradiated Foods, Second Edition. New York: Marcel Dekker, pp.43-88.
- Dogan A, Siyakus G, Severcan F 2007. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana L.*). Food Chemistry, 100:1106-1114.
- EFSA 2011. Scientific opinion on the efficacy and microbiological safety of irradiation of food. EFSA Journal, 9(4):2103, 88p. Available at: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2103> [Erişim: 15.5.2019]
- Eustice RF 2018. Global status and commercial applications of food irradiation. In: Ferreira ICFR, Antonio AL, Sandra CV (eds), Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes. Food Chemistry, Function and Analysis, No: 4. London: The Royal Society of Chemistry, pp.397-424.
- Fan X 2003. Ionizing radiation induces formation of malondialdehyde, formaldehyde, and acetaldehyde from carbohydrates and organic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:5946-5949.
- Fan X, Thayer DW, Handel AP 2002 Nutritional quality of irradiated orange juice. Journal of Food Processing Preservation, 26:195-211.
- Fan X, Sokorai KJ 2008. Retention of quality and nutritional value of 13 fresh-cut vegetables treated with low-dose radiation. Journal of Food Science, 73:S367-72.
- FDA 1997. Irradiation in the production, processing and handling of food, Food and Drug Administration, HHS, Final rule, Department of Health and Human Services, 21 CFR Part 179, Docket No. 94F-0289, 62 (232), December 3, 1997, pp.64107-64121.

- Available at: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1997-12-03/pdf/97-31740.pdf>  
[Erişim:15.05.2019]
- FDA 2005. Irradiation in the production, processing and handling of food, Food and Drug Administration, HHS, Final rule, Department of Health and Human Services, 21 CFR Part 179, Docket No. 1999F-4372, 70 (157), August 16, 2005, pp.48057-48073.  
Available at: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2005-03-28/pdf/FR-2005-03-28.pdf>  
[Erişim:15.05.2019]
- FDA 2012. Irradiation in the production, processing and handling of food, Food and Drug Administration, HHS, Final rule, Department of Health and Human Services, 21 CFR Part 179, Docket No. FDA-1999-F-4617, 77(231), November 30, 2012, pp.71312-71316. Available at: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2012-11-30/pdf/2012-28967.pdf> [Erişim:15.05.2019]
- Javanmard M, Rokni N, Bokaie S, Shahhosseini G 2006. Effects of gamma irradiation and frozen storage on microbial, chemical and sensory quality of poultry meat in Iran. *Food Control*, 17:469-473.
- Narvaiz P, Lescapo G, Kaiiryama E 1992. Irradiation of almonds and cashew nuts. *Food Science and Technology*, 25:232-239.
- Khattak KF, Rahman TU 2016. Effect of gamma irradiation on the vitamins, phytochemicals, antimicrobial and antioxidant properties of *Ziziphus mauritiana Lam.* leaves. *Radiation Physics and Chemistry*, 127:243-248.
- Koutchma T, Keener L, Kotilainen H 2018. Global harmonization initiative (GHI) consensus Document on food irradiation. Discordant international regulations of food irradiation are a public health impediment and a barrier to global trade, 18p. Available at: [https://www.globalharmonization.net/sites/default/files/pdf/GHI-Food-Irradiation\\_October-2018.pdf](https://www.globalharmonization.net/sites/default/files/pdf/GHI-Food-Irradiation_October-2018.pdf), [Erişim: 16.10.2018]
- Morehouse KM, Ku Y 1992. Gas chromatographic and electron spin resonance investigations of gamma-irradiated shrimp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40:1963-1971.
- Morehouse KM 1996. Identification of irradiated seafood, In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (eds), *Detection Methods for Irradiated Foods: Current Status*. Cambridge-UK: The Royal Society of Chemistry, pp.249-258.
- Raffi JJ, Agnel JPL, Frejaville CM, Saintlebe LR 1981a. Radio-induced products in maize starch - glyceraldehyde, dihydroxyacetone, and 2-hydroxymalonaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29:548-550.
- Raffi JJ, Agnel JPL, Thiery CJ, Frejaville CM, Saintlebe LR 1981b. Study of gamma-irradiated starches derived from different foodstuffs - a way for extrapolating wholesomeness data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29:1227-1232.
- Sant'Ana LS, Mancini-Filho J 2000. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chemistry*, 68:175-178.
- Shen L 2017. Status and prospect of application of radiation science and technology in China: a national report, 1<sup>st</sup> International Conference on Applications of Radiation Science and Technology, ICARST, IAEA-CN-241-452, April 24-28, Vienna. Available at: <https://media.superevent.com/documents/20170424/3725fd0eb3aac215344e0ee83304d85d/s.-lixin.pdf>  
[Erişim: 15.5.2019]
- Simic MG 1983. Radiation chemistry of water-soluble food components. In: Josephson ES Peterson MS (eds), *Preservation of Food by Ionizing Radiation*, Vol. 2, Chap. 1. Boca Raton-Florida: CRC Press, pp.1-70.
- Stefanova R, Vasilev NV, Spassov SL 2010. Irradiation of food, current legislation framework, and detection of irradiated foods. *Food Analytical Methods*, 3:225-252.
- Stewart ME 2001. Food irradiation chemistry. In: Molins RA (ed), *Food Irradiation: Principles and Applications*. USA: John Wiley & Sons, Inc., pp.37-76.
- Stewart EM 2009. Effect of gamma irradiation on the quality of ready meals and their meat components. In: *Irradiation to Ensure the Safety and Quality of Prepared Meals. Results of the Coordinated Research Project organised by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (2002-2006)*. Vienna: IAEA, pp.313-342.
- Taub IA, Robbins FM, Simic FG, Walker JE, Wierbick E 1979. Effect of irradiation on meat proteins. *Food Technology*, 38:184-193.
- Thayer DW 1987. Assessment of the wholesomeness of irradiated food. In: Fielden EM, Fowler JF, Hendry JH Scott D (eds), *Radiation Research*, Vol. 2, Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research, Edinburgh, 18-25 July 1987. London: Taylor Francis, pp.236-241.
- Thayer DW 1990. Food irradiation - benefits and concerns. *Journal of Food Quality*, 13:147-169.

- Thomas MH 1988. Use of ionizing radiation to preserve food, In: Karmas E, Harris RS (eds), Nutritional Evaluation of Food Processing. New York: AVI Publications, pp.457-490.
- Urbain WM 1977. Radiation chemistry of proteins, In: Elias PS, Cohen AJ (eds), Radiation Chemistry of Major Food Components. Amsterdam: Elsevier, pp.63-130.
- Vickers ZM, Wang J 2002. Liking of ground beef patties is not affected by irradiation. Journal of Food Science, 67:380-383.
- WHO 1981. Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Geneva, 27 October- 3 November 1980. World Health Organization Technical Report Series, No. 659, WHO, Geneva, 36p.
- WHO 1999. High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. World Health Organization Technical Report Series, No. 890, WHO, Geneva, 198p.
- WHO 1994. Safety and nutritional adequacy of irradiated food, World Health Organisation, Geneva, 161p. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39463/9241561629-eng.pdf?sequence=4&isAllowed=y> [Erişim: 13.05.2019]
- Yadav MK, Patel NL, Parmar BR, Dileswar N 2013. Evaluation of physiological and sensory changes of Kesar mango (*Mangifera Indica* L.). Influenced by ionizing radiation and storage temperature. SAARC Journal of Agricultural, 11:69-80.
- Yoon Y 2011. Current status of food irradiation: benefits, regulations and acceptance. Safe Food, 6:28-33.
- Zegota H 1988. Suitability of Dukat strawberries for studying effects on shelf life of irradiation combined with cold storage. Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 187:111-114.

## Kedi ve köpek beslemede fonksiyonel gıdaların önemi

Aydan Atalar<sup>1\*</sup>, Nurcan Çetinkaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi , Çaycuma Gıda ve Tarım MYO, Gıda İşleme, Zonguldak, Türkiye

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Samsun, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: aydan.atalar@beun.edu.tr

### Özet

Fonksiyonel gıdalar içerdikleri biyolojik aktif bileşenler ile düzenli tüketildiklerinde sağlığı olumlu yönde etkileyen gıdalardır. Fonksiyonel gıdaların pet hayvanlarında özellikle de kedi ve köpeklerde rollerini anlayabilmek için hayvanların metabolizmalarını iyi bilmek gerekmektedir. Örneğin kediler etçil olmalarına rağmen köpekler insanlar gibi omnivordurlar. Ancak her ikisinde de ortak olan kısa bir sindirim sistemine sahip olmaları, tükrükte amilaz eksikliği ve D vitamini sentezi yapamamalarıdır. Bunu dışında köpekler kedilerden farklı olarak niasin, taurin ve arginin gibi bazı esansiyel besin maddelerini sentezleyebilirler. Sağlığa katkıda bulunan önemli fonksiyonel gıdalar arasında sebze ve meyveler, piktogenol, kollajen, koenzim Q10, düşük moleküler ağırlıklı hiyaluronik asit, kondratin sülfat gibi pet gıda katkıları ile probiyotik ve prebiyotikler sayılabilir. Özellikle pet gıdalarında bulunan lifler bağırsak mikrofolarasında bulun mikrobiyal popülasyonu olumlu yönde etkiler. Ayrıca gastrik boşalmada gecikme, kan kolesterol seviyesinde düşme, özellikle tahılların yapısında bulunan kolin, metiyonin, inositol ve folat gibi bileşenler de antioksidan ve antikarsinojenik etki gösterirler. Pet gıdalarına eklenebilen balık unu, propolis, kurutulmuş portakal özütü ve yumurta albümini gibi bileşenler özellikle köpeklerde halitozise (ağız kokusu) sebep olan uçucu sülfür bileşenlerini azalttığına dair çalışmalar mevcuttur. Sonuç olarak sanayileşmiş ülkelerde aile birey sayısında azalmaya bağlı olarak hayvan sahipleri kedi ve köpek gibi evcil hayvanlarına daha çok önem vermeye başlamışlardır. Bu da piyasada satılan pet gıdalarına özellikle içerik bakımından yeterli olup olmadığına dair ilginin oluşmasına neden olmuştur. Dolayısıyla pet gıdalarının bileşimine giren fonksiyonel gıdalar ve yapılarındaki biyoaktif bileşenlerin hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri araştırmacıları bu konuya yöneltmiştir. Bu bildiride kedi ve köpek beslemede fonksiyonel gıdaların önemi üzerinde durulacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Fonksiyonel gıda, kedi besleme, köpek besleme, pet hayvanı

### Importance of functional foods in cat and dog nutrition

Aydan Atalar<sup>1\*</sup>, Nurcan Çetinkaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zonguldak Bülent Ecevit University Çaycuma Vocational School of Food and Agriculture, Food Processing, Zonguldak, Turkey

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Samsun, Turkey

\*Corresponding author e-mail: aydan.atalar@beun.edu.tr

### Abstract

Functional foods are foods that affect health positively when consumed regularly with the biologically active components. To understand the role of functional foods in pet animals, especially cats and dogs, it is necessary to know the metabolism of animals. For example, although cats are carnivorous, dogs are omnivores like humans. However, common in both is that they have a short digestive system, lack of amylase in the saliva and they cannot synthesize vitamin D. In addition, dogs can synthesize some essential nutrients, such as niacin, taurine, and arginine, but cats can't synthesize taurine. Important functional foods include fruits and vegetables, piktogenol, collagen, coenzyme Q10, pet food additives such as low molecular weight hyaluronic acid, chondratin sulfate, probiotics and prebiotics. In particular, fibers in pet foods have a positive effect on the microbial population present in the intestinal microflora. In addition, delay in gastric evacuation, decrease in blood cholesterol levels, especially choline, methionine, inositol and folate components in the structure of cereals have antioxidant and anticarcinogenic effects. Ingredients such as fish meal, propolis, dried orange extract and egg albumin, which can be added to pet foods, have been reported to reduce volatile sulfur

compounds that cause halitosis, especially in dogs. As a result, due to the decrease in the number of family members in industrialized countries, animal owners have started to give more importance to their pets such as cats and dogs. This has led to an interest in whether pet foods sold on the market. This paper will focus on the importance of functional foods in cat and dog nutrition.

**Keywords:** Functional food, cat feeding, dog feeding, pet animal

## GİRİŞ

Evcil hayvanların sağlıklı bir yaşam sürmesi için diyetlerindeki ham maddelerin seçimi ve kullanılan mamanın biyolojik değeri oldukça önemlidir. Fonksiyonel gıdalar içerdikleri biyolojik aktif bileşenler ile düzenli tüketildiklerinde sağlığı olumlu yönde etkileyen gıdalardır. Fonksiyonel gıdaların pet hayvanlarında özellikle de kedi ve köpeklerde rollerini anlayabilmek için hayvanların metabolizmalarını iyi bilmek gerekmektedir. Pet gıdalarının etkinliği ve güvenliğine olan ilgi dünya genelinde artış göstermektedir. Fonksiyonel gıdalar gastrointestinal sistemi olumlu yönde etkiler, biyokimyasal parametreleri doğrudan ve olumlu yönde etkiler, beyin fonksiyonlarını iyileştirir ve spesifik patolojiler geliştirme riskini azaltabilir. Kepekli tahıllar, sebze ve meyve püreleri, probiyotikler, prebiyotikler ve çeşitli bitkisel ekstraktlar pet gıda katkısı olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle pet gıdalarında bulunan lifler bağırsak mikrofolarasında bulunan mikrobiyal popülasyonu olumlu yönde etkiler. Ayrıca gastrik boşalmada gecikme, kan kolesterol seviyesinde düşme, özellikle tahılların yapısında bulunan kolin, metiyonin, inositol ve folat gibi bileşenler de antioksidan ve antikarsinojenik etki gösterirler Yapılan çalışmaların çoğu ticari olarak satılan fonksiyonel gıdalarda bulunan etmenlerin insanlarda sağlığa faydalarını ortaya koyma için araştırmaya odaklanmıştır; Bu bileşenler köpekler ve kediler üzerinde de yararlı etkilerini gösterebilir, bu konuda yapılan çalışmalar yetersiz kalmaktadır (Zicker, 2008). Dolayısıyla pet gıdalarının bileşimine giren fonksiyonel gıdalar ve yapılarındaki biyoaktif bileşenlerin hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri araştırmacıları bu konuya yöneltmiştir. Bu bildiri de kedi ve köpek beslemede fonksiyonel gıdaların önemi üzerinde durulacaktır.

### Kedi ve köpeklerde mikrobiyota

Son 35 yılda, hem kedi hem de köpeklerde cilt ve gastrointestinal (GI) hastalıklarda şaşırtıcı bir artış gözlenmiştir. Kedi ve köpeklerin doğasına bakıldığında aslında yüksek protein diyetleriyle beslenen etçil hayvanlardır. Ancak günümüzde kentsel alanlarda ve evlerde de yaşadıklarından karbonhidratlı diyetlerle beslenme durumunda kalmaktadırlar. Bu da bağırsak florasını doğrudan etkilemektedir. Kedi ve köpeklerin bağırsak florasına bakıldığında baskın olan türler arasında *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* kedilerde ayrıca *Eubacterium* sayılabilir (Suchodolski, 2011). Kedi ve köpeklerde gastrointestinal (GİS) florası bağışıklık ve sindirim sistemi ile doğrudan ilişkilidir ve eğer mikrobiyal denge bozulursa hem inflamatuvar hem de özellikle ciltte alerjik reaksiyonlar karşımıza çıkar (Watson, 1998 ; Tizard, 2017). Dolayısıyla barsak florasının düzenlenmesi olası birçok hastalığın önlenmesinde atılacak ilk adımlardan birisidir. Örneğin obezite olgularında ilk olarak bağırsak florası düzenlenmelidir. Bu sebeple de kedi ve köpeklerde fonksiyonel bir gıda olarak probiyotik kullanımı önerilmektedir. Ayrıca obezite dışında, üriner sistem hastalıkları, *Helicobacter*'e bağlı gelişen gastrit, iltihabi barsak enfeksiyonu tedavisinde de probiyotik tedavisi tercih edilmektedir (Grzeskowiak ve ark, 2015). Probiyotiklerin dışında prebiyotikler de pet gıdalarına katılabilmektedir. Örneğin bir çeşit oligosakkarit olan hindiba köpek diyetlerine eklendiğinde fekal kıvamı artırdığı ve bağırsaktaki yararlı mikroorganizmaları artırdığı görülmüştür (Beloshapka, 2015). Probiyotiklerin özellikle kedi ve köpeklerin bağırsaklarından izole edilmesi ile yeni probiyotiklerin geliştirilmesi adına daha sağlıklı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. IBD'li köpeklerde yapılan bir çalışmada IBD'li gruba verilen probiyotik tedavisi sonrasında regülatör T hücrelerinin önemli oranda arttığı bildirilmiştir (Rossi ve ark, 2014).

### Köpek beslemede fonksiyonel gıdalar

Fonksiyonel gıdaların köpek beslemedeki rolünü ortaya koymak için yapılan çalışmalar vardır. Pet gıdalarına fonksiyonel özellik katmak için pet mamalarına antioksidanlar, mineraller, iz elementler, bitkisel ekstraktlar ve tıbbi bitkiler eklenebilir. Örneğin, yetişkin erkek Beagle'larda, oligofruktoz bakımından zenginleştirilmiş diyet verilmesiyle dışkıda amonyak ve *Clostridium perfringens* konsantrasyonlarının azaldığı buna bağlı olarak da köpeğin genel sağlık durumunda da iyileşme olduğu gözlenmiştir (Flickinger ve ark, 2003). Fruktooligosakaritler (FOS), et bazlı bir diyetle beslenen köpeklerde tek başlarına veya mannan-



oligosakarit ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. Buna bağlı olarak çalışma grubundaki köpeklerde ileal immünooglobulin A konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmüştür (Swanson ve ark, 2002). Diyetlerine pirinç, çay ekstresi ve L-triptofan eklenen köpeklerin klinik davranışlarında olumlu etkiler görülmüş ve anksiyetenin azaldığı gözlenmiştir (Di Cerbo ve ark, 2016). Antioksidanlar, fitoterapik bileşikler, vitaminler ve iz elementlerin diyete katılmasıyla metabolik aktivite (serbest tiroksin ve testosteron) de artış, semende spermatazoonların hareketliliğinde artış ve bunun sonucu olarak ta fertilitenin olumlu yönde etkilendiği gözlenmiştir (Ponzio ve ark, 2013). Bunların dışında köpek mamalarına katılan bezelyenin glisemik indeks değerini düşürdüğü gözlenmiştir (Adolphe ve ark, 2012). Köpeklerde diyete eklenen mısır, pancar posası, maya, balık yağı, mineraller, kurutulmuş maya (Bio MOS), FOS, A Vitamini (15.000 IU), D3 Vitamini (1080 IU), E Vitamini (180 mg), kolin klorür (1000 mg ) amino asit hidrat (20 mg), DL-metiyonin (500 mg), taurin (1500 mg), L-karnitin (500 mg) bakır şelatı, doğal tokoferoller bakımından zengin özütlerinin etkisine bakıldığında vücut kondisyon skorunun arttığı ve kan değerlerinin olumlu yönde etkilendiği görülmüştür (Pasquini ve ark, 2013). Bir diğer çalışmada ise diyete eklenen balık unu, propolis (% 0.0161), *Salvia officinalis* (% 0.0087), yumurta albümini (% 0.0078 lysozyme), kurutulmuş portakal özü (% bioflavonoids% 0.0077), *Thymus vulgaris* (% 0.0127) ve *Ribes nigrum* (% 0.0040)'un köpeklerde halitosisi önlediği ve ağız kokusuna sebep olan uçucu sülfür bileşenlerini azalttığı ortaya konulmuştur (Di Cerbo ve ark, 2015).

### **Kedi beslemede fonksiyonel gıdalar**

Köpeklerle karşılaştırıldığında, kediler farklı beslenme ihtiyaçları olan etobur hayvanlardır (Legrand, 1994). Kediler, linoleik asiti diğer yağ asitlerine çeviremezler bu özellikleri nedeniyle kedilerin diyetlerinde yeterli düzeyde arakidonik asit bulunmasına özen gösterilmelidir. Ayrıca kedilerin protein ihtiyaçları da köpeklere nazaran daha fazladır. Obezite problemi olan kedilerin diyetlerine elma püresi (% 10 ila 20 elmalı püre diyeti) eklenerek diyetin enerji yoğunluğu azaltılmış ve sonuç olarak etkili olduğu görülmüştür (Fekete ve ark, 2001). Diyete eklenen kazein, laktalbümin, tam yağlı stabilize pirinç kepeği, tavuk yağı, vitamin karışımı, L-arginin ve mineral karışımı eklenip sonuçlarına bakıldığında kan dolaşımında taurin seviyesinin azaldığı ve dışkı ile birlikte konjuge safra asitlerinin atılımında artış gösterdiği görülmüştür ( Stratton ve ark, 2002). Yüksek yağlı (% 45 kalorili yağ) veya düşük yağlı diyet (% 23,8 yağlı kalorili), soya gevreği ve soya proteini izolatu, hindi ve hindi yan ürünleri unu, mısır nişastası, yulaf unu, yulaf lifi, sığır donyağı, vitaminler ve minerallerin katıldığı diyetle beslenen kedilerde dışkılama probleminin olumlu etkilendiği ve normal dışkı gelişiminin gözlemlendiği belirtilmiştir (Laflamme ve Xu, 2015).

### **SONUÇ**

Sonuç olarak sanayileşmiş ülkelerde aile birey sayısında azalmaya bağlı olarak hayvan sahipleri kedi ve köpek gibi evcil hayvanlarına daha çok önem vermeye başlamışlardır. Bu da piyasada satılan pet gıdalarına özellikle içerik bakımından yeterli olup olmadığına dair ilginin oluşmasına neden olmuştur. Dolayısıyla pet gıdalarının bileşimine giren fonksiyonel gıdalar ve yapılarındaki biyoaktif bileşenlerin hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri araştırmacıları bu konuya yöneltmiştir.

### **KAYNAKLAR**

Adolphe J.L., M.D. Drew, Q. Huang, T.I. Silver, L.P. 2012. Weber Postprandial impairment of flow-mediated dilation and elevated methylglyoxal after simple but not complex carbohydrate consumption in dogs Nutr. Res., 32 , pp. 278-284.

Beloshapka AN, Dowd SE, Suchodolski JS, Steiner JM, Duclos L, Swanson KS. 2013. Fecal microbial communities of healthy adult dogs fed raw meat-based diets with or without inulin or yeast cell wall extracts as assessed by 454 pyrosequencing. FEMS Microbiol Ecol 84(3):532-41.

Di Cerbo A., F. Pezzuto, S. Canello, G. Guidetti, B. Palmieri 2015. Therapeutic effectiveness of a dietary supplement for management of halitosis in dogs J. Vis. Exp., 101, p. e 52717.

Di Cerbo A, S. Centenaro, F. Beribe, F. Laus, M. Cerquetella, A. Spaterna, G. Guidetti, S. Canello, G. Terrazzano 2016. Clinical evaluation of an antiinflammatory and antioxidant diet effect in 30 dogs affected by chronic otitis externa: preliminary results Vet. Res. Commun., 40, pp. 29-38

- Fekete S., I. Hullar, E. Andrasofszky, Z. Rigo, T. Berkenyi 2001. Reduction of the energy density of cat foods by increasing their fibre content with a view to nutrients' digestibility J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., 85, pp. 200-204.
- Flickinger, E.A., E.M. Schreijen, A.R. Patil, H.S. Hussein, C.M. Grieshop, N.R. Merchen, G.C. Fahey Jr. 2003. Nutrient digestibilities, microbial populations, and protein catabolites as affected by fructan supplementation of dog diets J. Anim. Sci., 81 pp. 2008-2018
- Grzeskowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen 2015. S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. Anaerobe 34:14-23.
- Laflamme D.P., H. Xu, G.M. 2011. Long Effect of diets differing in fat content on chronic diarrhea in cats J. Vet. Intern. Med./Am. Coll. Vet. Intern. Med., 25, pp. 230-235.
- Legrand V, 1994. -Defretin Differences between cats and dogs: a nutritional view Proc. Nutr. Soc., 53 pp. 15-24
- Pasquini A, S. Roberti, V. Meucci, E. Luchetti, S. Canello, G. Guidetti, G. Biagi 2013. Association between body condition and oxidative status in dogs Food Nutr. Sci., 4, pp. 191-196.
- Ponzio P.C., S. Canello, G. Guidetti, C. Sferra, E. Macchi 2013. Correlation between reproductive efficiency (semen quality and endocrine function) and dietary supplementation in dog breeding Veterinaria, 27, pp. 15-22.
- Rossi G, Pengo G, Caldin M, Palumbo Piccionello A, Steiner JM, Cohen ND. 2014. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. PLoS One, 9(4): e 94699.
- Suchodolski JS. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. Vet Clin North Am Small Anim Pract;41(2):261-72.
- Stratton-Phelps M., R.C. Backus, Q.R. Rogers, A.J. Fascetti 2002. Dietary rice bran decreases plasma and whole-blood taurine in cats J. Nutr., 132 pp. 1745S-1747S.
- Swanson K.S., C.M. Grieshop, E.A. Flickinger, L.L. Bauer, H.P. Healy, K.A. Dawson, N.R. Merchen, G.C. Fahey Jr. 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs J. Nutr., 132 pp. 980-989.
- Tizard IR, Jones SW. 2017. The microbiota regulates immunity and immunologic diseases in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 48(2) 207-322.
- Watson, T.D., Diet and skin disease in dogs and cats. J Nutr, 1998. 128(12 Suppl): pp. 2783S-2789S.
- Zicker, S.C. Zicker 2008. Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food? Top. Companion Anim. Med., 23 pp. 121-126.

## Çeşitli su ve atık su kaynaklarında demir gideriminde antiskalant verimliliğinin incelenmesi

Aslan TAŞ<sup>1\*</sup>, Hüseyin KARA<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup> Selçuk Üniversitesi, Fen fakültesi, kimya bölümü, KONYA, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi, Eczacılık fakültesi Temel eczacılık bilimleri bölümü, KONYA, TÜRKİYE

\*Sorumlu yazar e-mail: tasasslan@gmail.com

### Özet

Günümüzde artan çevre kirliliği ve yüksek kaliteli su ihtiyacı, su arıtım sistemleri kullanımını artırmıştır. Bu sistemlerin etkin ve yüksek verimlilikte kullanımı için su içerisine antiskalant (taş önleyici) kimyasallar dozlanarak, sistem içerisindeki konsantrasyon artışıyla doyumun ulaşılan iyonların çökmesi engellenir. Bu çalışmada; kuyu, deniz ve atık su kaynaklarından sağlanan suyun geri kazanımında, dozlanan antiskalant oranla demir gideriminin verimliliği incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan antiskalantın etken madde miktarı HPLC ile belirlenmiş ve daha sonra sistem içerisine 0.9-3.2 mg/L antiskalant dozlanarak giderim verimleri, sistemin kütle yük dengeliği yardımıyla, hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda demir giderim veriminin %70 in altında kaldığı görülmüştür. Bu giderim oranına göre ekstra antiskalant ilavesi gerekmektedir. Aksi durumlarda çökme hızının yüksek olacağı ve sistem tıkanmalarına sebebiyet vereceği öngörülmektedir. Kullanılan antiskalantın etken maddesinin yanında demir giderimi için ilave taş önleyici kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** HPLC, Antiskalant, demir giderimi

### Investigation of antiscalant efficiency in iron removal in various water and wastewater sources

#### Abstract

Today, increasing environmental pollution and the need for high quality water have increased the use of water treatment systems. For effective and high efficiency use of these systems, antiscalant (stone inhibitor) chemicals are dosed into water to prevent precipitation of ions that reach saturation by increasing concentration in the system. In this study; The efficiency of iron removal in the recovery of water from well, marine and wastewater sources compared to the dosed antiscalant was investigated. The amount of active agent used in the studies was determined by HPLC and then the efficiencies of 0.9-3.2 mg / L antiscalant were dosed into the system and the mass load balance of the system was calculated. As a result of the calculations, iron removal efficiency was found to be below 70%. Depending on this removal rate, an additional antiscalant is required. Otherwise, it is foreseen that the sedimentation rate will be high and will cause system blockages. In addition to the active substance of the antiscalant used, it was concluded that additional stone inhibitor should be used for iron removal.

**Keywords:** HPLC, Antiscalant, iron removal.

### GİRİŞ

Dünya genelindeki su miktarı, insanlığın hayatını sürdürebilmesi ve uygun yaşam şartlarını sağlayabilmesi için hayati öneme sahiptir. Fakat ne yazık ki 21. yüzyılın en büyük sıkıntılarının birinin su kıtlığı olacağı tahmin edilmektedir (Melo ve ark., 2010). Su kıtlığını en genel haliyle küresel nüfus artışı, sınırlı doğal kaynaklar ve artan endüstriyel faaliyetleri olarak açıklayabiliriz. Sonuç olarak, su kıtlığı sorununu çözmek için, deniz suyu artık sadece bir sıra dışı su kaynağı değil, su kaynaklarını temin etmek için ticari bir seçenektir. Tuzdan arındırma (desalinasyon) uygulamaları deniz suyuyla sınırlı değildir, aynı zamanda acı su, nehir suyu ve atık sulara da uygulanır (Antony ve ark., 2011). Çeşitli suların arıtılarak içme ve kullanma suyu temin edilmesinin gündeme gelmesiyle desalinasyon tesisleri kurulmaktadır. Desalinasyon tesislerinde en çok kullanılan membran prosesi ters osmozdur. Son yıllarda deniz suyu arıtımında kullanılacak olan ters osmoz membranların en iyi performansı göstermesi için yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Eriş, 2017).

Membran kirlenmesi ciddi bir problem olup, transmembran basıncının artmasına ve membranların geçirdikleri su kapasitesinde kayıplara neden olur. Membran kirliliğinde karşılaşılan kirlenmeler; taş oluşumu, askıda/kolloidal madde birikimi ve biyolojik materyal büyümesidir. Membran kirliliği ön işlem tasarımının yapılması ve uygun kimyasal işlemlerinin kullanılması ile önlenir. Membran kirliliklerinden en çok görülen taş oluşumunu engellemek için kullanılan kimyasallardan biri de Antiskalant ilavesidir.

Antiskalant; ters osmoz ile su arıtma sistemlerinde ön arıtmadan gelen suyun ters osmoz membranlarına girişinden önce dozlanan bir kimyasaldır. Kalsiyum ( $Ca^{2+}$ ), magnezyum ( $Mg^{2+}$ ), bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) ve demir iyonlarının hidroksitler ile reaksiyona girmesine izin vermez ve böylece membranlarda çökelti oluşumunu engeller. Antiskalant kullanımı, membranların tıkanmadan çalışmasını ve uzun ömürlü olmasını sağlayarak membran masrafını en aza indirir.

## MATERYAL VE METOT

Spektrofotometrik ölçümler Hach-lange DR 2000 cihazı ile Demir ve dozlanan çökelek inhibitörünün miktarını takip etmek için fosfonat analizleri yapılmıştır. Demir analizi Hach-lange 1,10 Fenantrolin ilavesinden sonra 3 dakika reaksiyondan sonra 510 nanometrede ölçümler alınmıştır. Fosfonat analizi, antiskalantta bulunan fosfonat içeriklerini orto-fosfatlara parçalamak için UVP marka güç kaynağı UV lamba kullanılmıştır. Fosfanat analizleri persülfat UV oksidasyon metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu metotta potasyum persülfat ilavesinden sonra 10 dakika UV lamba ile oksidasyon reaksiyonu gerçekleştirilir. Spektroskopi de okuma yapabilmek için molibdovanadat reaktifi eklenir ve 2 dakika reaksiyon süresi beklenir ve ölçümleri alınır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada kuyu suyu, deniz suyu ve atık suların içme suyu veya tesislerde kullanım suyu üreten tesislerde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler çalışan sistemlerin yanında ve laboratuarda gerçekleştirildi.

Sistem besleme ham suların analiz aşağıdaki gibidir.

**Tablo 1.** Ham su analiz değerleri

TÜRLER	mg / L		
	ATIK	DENİZ	KUYU
Kalsiyum	88	398	298
Magnezyum	19	1221	50
Sülfat	270	2150	580
Sodyum	324	8316	199
Potasyum	10	407	3
Bikarbonat	275	194	512
Klorür	290	15768	258
<b>Demir</b>	<b>0,01</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>
Silika	13,0	3,1	15,2
iletkenlik	1350	36256	2190
TDS	865	23241	1403
pH	7,8	8,0	6,8

Tabloda görüldüğü gibi demir miktarlarının düşük olmasına rağmen yüksek saturasyon özelliğine sahip olan demir iyonları hızlı bir şekilde çökelek oluşturmaktadır. Yapılan çalışmada demir giderimi/antiskalant verimi oranı kütle yük denkliliği hesaplama yöntemiyle hesaplanmıştır.

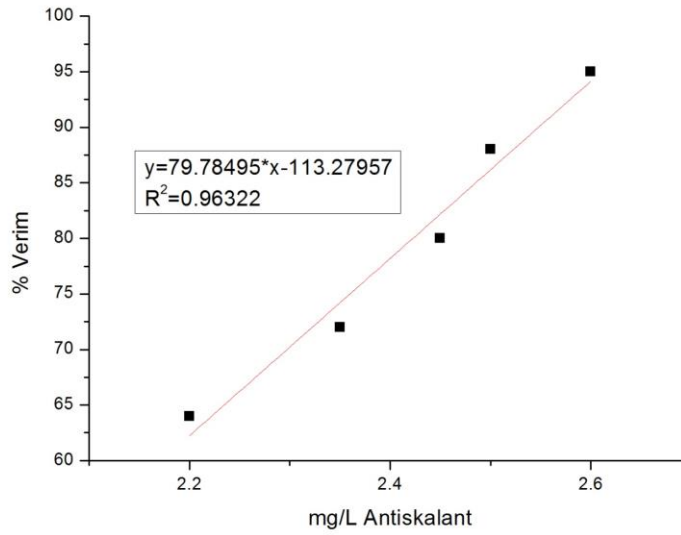
### KÜTLE YÜK DENKLİĞİ

$$\%VERİM = \frac{(C_{ÜRÜN} \times Q_{ÜRÜN}) + (C_{ATIK} \times Q_{ATIK})}{(C_{GİRİŞ} \times Q_{GİRİŞ})} \times 100$$

C: konsantrasyon

Q:debi

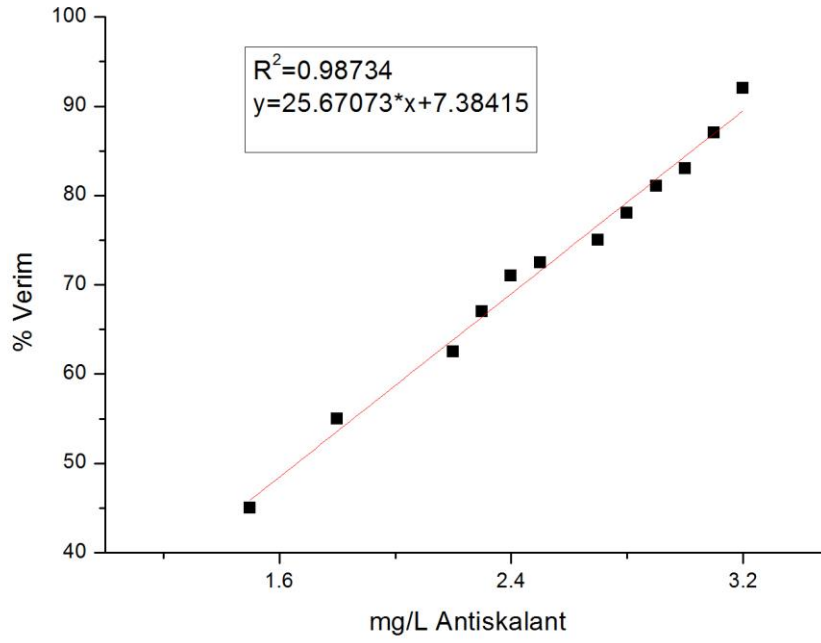
Kuyu suyu demir giderim/ Verim değerleri



**Tablo 2.** kuyu suyu çalışma parametreleri

Kuyu suyu çalışma parametreleri	Değerler
Kartuş Giriş Basıncı (bar)	1.42±0.12
Kartuş Çıkış Basıncı (bar)	1.27±0.13
1. Kademe Giriş Basıncı (bar)	7.74±0.29
2. Kademe Giriş Basıncı (bar)	5.67±0.31
Drenaj Basıncı (bar)	2.89±0.24
RO giriş iletkenlik (µs)	2196±54
Ürün suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	116±1.17
Drenaj Suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	48±0.53
Ürün Suyu iletkenlik (µs)	838±30.91

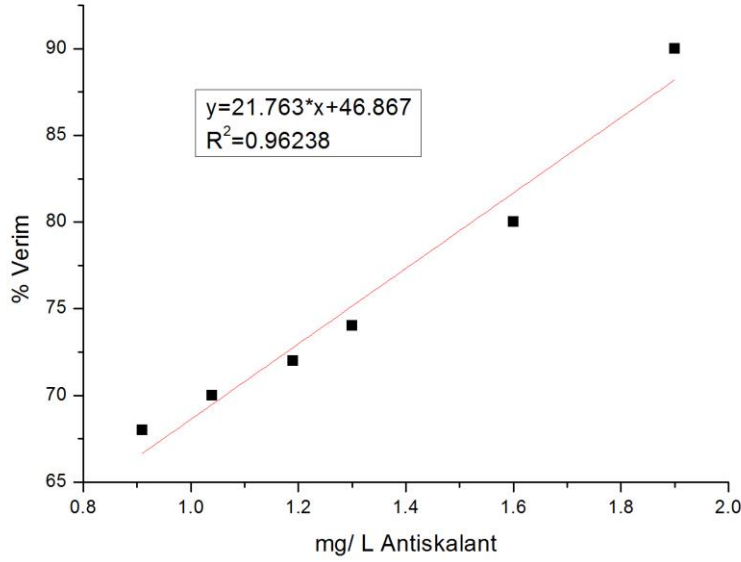
Atık su demir giderim / Verim değerleri



**Tablo 2.** atık su çalışma parametreleri

Atık su çalışma parametreleri	Değerler
Kartuş Giriş Basıncı (bar)	3.32±0.12
Kartuş Çıkış Basıncı (bar)	2.68±0.30
1. Kademe Giriş Basıncı (bar)	12.04±0.30
2. Kademe Giriş Basıncı (bar)	8.05±0.51
Drenaj Basıncı (bar)	4.60±1.74
RO giriş iletkenlik (µs)	1352.50±214.03
Ürün suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	201.25±10.87
Drenaj Suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	92.00±0.13
Ürün Suyu iletkenlik (µs)	31.38±8.58

### Deniz suyu demir giderim /Verim değerleri



**Tablo 3.** Deniz suyu çalışma parametreleri

Deniz suyu çalışma parametreleri	Değerler
Giriş Basınç (bar)	56.34±2.59
Drenaj Basınç (bar)	54.89±2.61
RO giriş iletkenlik (µs)	34629.60±3020.72
Ürün suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	214.06±13.02
Drenaj Suyu Akımı (m <sup>3</sup> )	260.05±11.75
Ürün Suyu iletkenlik (µs)	444.62±121.20

Sistem demir verimleri, sistemlerin mevcut dozajlarında %70 civarında hesaplanmıştır. %70 in üzerinde verimlerin elde edilmesi sisteme deneylerimiz süresinde fazladan antiskalant dozajı yapmamız sonucunda sağlanmıştır.

## SONUÇ

Yapılan demir verimi çalışmasında

İnsan sağlığı ve endüstri kullanımı için önemli olan suyun arıtılmasında kullanılan sistemlerde demir gideriminde antiskalant veriminin incelenmesi konulu bu çalışmada, deniz suyu, atık su ve kuyu sularında farklı debi basınç ve dozajlarda verimliliği incelenmiştir. Sistem giderim demir verimleri antiskalant dozajı artığında arttığı gözlenmiştir. Giderim verimleri değerlendirilmesi % 85 verimin üzerinde sistem ömrünün uzun olacağı, Kuyu suyunda 2,45 mg/L üzerinde antiskalant dozajı, atık suda 3 mg/L üzerinde antiskalant dozajı, deniz suyunda 1,6 mg/L üzerinde antiskalant dozajı yapıldığında %85 üzerinde verimler sağlanmıştır.

Sistemlerde kullanılan antisiaklantın dozaj hesaplamaları dikkatli hesaplanmalı ve kullanılan antiskalanta demir gideriminde etkili taş önleyici eklenmelidir.

## KAYNAKLAR

Antony, A., Low, J. H., Gray, S., Childress, A. E., Le-Clech, P. ve Leslie, G., 2011, Scale formation and control in high pressure membrane water treatment systems: a review, Journal of membrane science, 383 (1-2), 1-16.

Eriş, Ç., 2017, Ters Osmoz Membranları İçin Destek Tabakası Üretimine Pilot Ölçekli Sistemde Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi.

Melo, M., Schluter, H., Ferreira, J., Magda, R., Júnior, A. ve de Aquino, O., 2010, Advanced performance evaluation of a reverse osmosis treatment for oilfield produced water aiming reuse, Desalination, 250 (3), 1016-1018.

Taş, A., 2018, Su Arıtım Sistemlerinde Antiskalant Verimliliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi.



## Comparison of Two Techniques for Corrosion Protection Ability of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde: Self-assembled Monolayer Films and Inhibitor Applications

Derya Özdemir<sup>1</sup>, Ramazan Solmaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bingöl University, Science and Letters Faculty, Chemistry Department, Bingöl, 12000, Turkey

<sup>2</sup>Bingöl University, Faculty of Health Sciences, Occupational Health and Safety Department, 12000, Bingöl, Turkey

deryaozfepolat@gmail.com; rsolmaz@bingol.edu.tr; rsolmaz01@gmail.com

### Özet

Bakır metali, üstün özelliklerinden dolayı özellikle elektronik endüstrisi olmak üzere birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, klorürlü ortamdaki korozyon sonrası iletkenlik, dekoratif görünüm, termal iletkenlik ve fiziksel dayanım gibi bazı özellikleri zayıflamaktadır. Bakır korozyondan korumak için bazı teknikler uygulanmaktadır. Bu çalışmada, en yaygın korunma yöntemlerinden olan korozyon inhibitörü ile son yıllarda oldukça popüler olmaya başlayan kendi kendine biriken tek tabakalı film (SAM) uygulamaları deneysel olarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, sulu ortamda 3-aminorodanin (AMRh) ve sinemaldehitin (SA) Schiff bazı kullanılmıştır. SAM kaplanmış bakır ile kaplanmamış bakırın inhibitörlü ortamdaki korozyon dayanımları NaCl çözeltisinde elektrokimyasal teknikler ile incelenmiştir. Kısa süreli korozif ortama daldırmada her iki yöntem ile de son derece iyi koruma sağlanmıştır. Bununla birlikte inhibitör uygulamasında biraz daha yüksek koruma etkinliği sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Kendi kendine biriken tek tabakalı filmler, korozyon inhibitörü, bakır korozyonu, 3-aminorodanin, sinemaldehit, Schiff bazı

## Comparison of Two Techniques for Corrosion Protection Ability of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde: Self-assembled Monolayer Films and Inhibitor Applications

### Abstract

Copper is widely used in many industrial applications, especially in electronics industry due to its superior performance. Unfortunately, their some properties such as conductivity, decorative appearance, thermal conductivity and physical endurance are weakened after corrosion in chloride containing solutions. There are some protection methods for protecting copper against corrosion. In this study, the most commonly applied corrosion inhibitor application and self-assembled monolayer film (SAM) application, which is a popular method in recent years, were compared experimentally. Schiff base of 3-aminorhodanine (AMRh) and cinnamaldehyde (CA) were used for this purpose. AMRh-CA-SAM films were prepared in aqueous medium. The corrosion inhibition performances of SAM coated copper in NaCl and uncoated copper in AMRh inhibitor containing NaCl solutions were compared with electrochemical techniques. Very good protection abilities in short exposure times were obtained when both methods were applied. The inhibitor application provided slightly better protection ability with respect to the SAM application.

**Keywords:** Self-assembled monolayer films, corrosion inhibitor, copper corrosion, 3-aminorhodanine, cinnamaldehyde, Schiff base

### GİRİŞ

Yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, iyi işlenebilirliği, dekoratif görünüm gibi önemli üstünlüklerinden dolayı bakır metali mikroelektronik sanayi, kablo bağlantıları, ısı iletkenleri, ısı eşanjörleri ve boru hatları gibi birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fatehve ark., 2017; Amin ve K.F. Khaled 2010). Ancak, klorürlü ortamlarda kolaylıkla korozyona uğrayarak bu üstünlüklerini kaybetmektedir (Solmaz ve ark., 2010; Qiang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2015). Bu nedenle bakırın korozyona karşı korunması son derece önemlidir.

Bakır korozyona karşı korumada birçok yöntem uygulanmaktadır. Özellikle kısa süreli daldırmalarda inhibitörler ile koruma en yaygın yöntemdir. İnhibitörler organik ve inorganik olmak üzere iki türdür. Daha iyi ve güvenli koruma sağladıklarından organik inhibitörler ön plana çıkmaktadır. Bu yöntemde çok az miktarda organik madde metalin maruz kaldığı korozif ortama ilave edilmektedir. Özellikle tekli veya üçlü bağlar, N, S veya O gibi elementleri içeren moleküller metal yüzeyine tutunarak veya çözünen metal iyonları ile kompleksler oluşturarak metal yüzeyinde koruyucu bir film oluşturmaktadır (Ma ve ark., 2017; Sin ve ark.,

2017; Ma ve ark., 2017). Kullanılacak moleküllerin sağlıklı olması en önemli kriterlerden biri olarak ön plana çıkmaktadır.

Son yıllarda, üstün özelliklerinden dolayı SAM film uygulamaları popüler olmaya başlamıştır. Bu filmler, uygun çözücü ve derişimlerde belirli sürelerde metal yüzeyinde kendi kendine oluşmaktadır. SAM filmler oldukça yoğun, sıkı, iyi düzenlenmiş, ultra ince organik filmler olup diğer benzer yöntemlere göre önemli üstünlüklere sahiptirler (Mioč ve ark., 2018; Love ve ark., 2005).

Her iki koruma yönteminde kullanılan maddelerin çoğu çok pahalı veya toksittir. Bu nedenle, daha geniş alanlarda uygulanabilmeleri, insanlara ve çevreye sağlık açısından zarar vermemek için sağlıklı yeni filmlerin bu amaçla geliştirilmesi son derece önemlidir. Rodanın ve türevleri oldukça sağlıklı bileşikler olup antibakteriyel, antiviral, antimikrobiyal özellikler sahip olup çok sayıda biyokimyasal uygulamaları mevcuttur.

Bu çalışmada AMRh-SA Schiff bazının bakırın deniz suyunu temsilen %3,5 NaCl çözeltisinde korozyona karşı korunmasında iki farklı yöntem; film uygulaması ve inhibitör uygulaması çalışılmıştır. Bu amaçla, elektrokimyasal teknikler kullanılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma elektrotu olarak %99,9 saflıkta 3 mm çapında ve 20 cm uzunluğunda bakır kullanılmıştır. Bakırın bir ucu yaklaşık 5 cm uzunluğunda poliester blok içerisine gömülmüştür. Poliester kaplanmış kısmın açık kalan ve çözelti ile temas eden ucunun yüzey alanı 0,0707 cm<sup>2</sup>'dir. SAM filmi kaplamadan önce ve inhibitör uygulamalarında her ölçümden önce çalışma yüzeyi 320-2000 gritlik zımpara kağıtları ile parlatılmıştır. Elektrotun yüzeyi daha sonra saf su ile yıkanarak 7 N HNO<sub>3</sub> çözeltisinde karıştırılarak 10 s bekletilmiş ve yüzeyindeki oksitler temizlenerek çözülmüştür. Sonrasında, elektrot yüzeyi tekrar saf su ile yıkanarak kurutulmuş, mutlak etanol ile yıkanmış ve mutlak etanol içerisinde 3-4 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek yüzeyinde kalan metal partikülleri yüzeyden uzaklaştırılmış ve film için uygun, temiz bir yüzey elde edilmiştir. Ultrasonikten çıkarılan elektrotun yüzeyi tekrar mutlak etanol ile yıkanmış, kurutulmuş ve zaman kaybetmeden yarım saat öncesinden azot gazı geçirilmiş film oluşum çözeltilerine/korozyon test çözeltisine daldırılmıştır. İki yöntemin detayları aşağıda verilmiştir.

**SAM Film Uygulamaları:** 0,1 mM AMRh-SA saf su içerisinde çözülmüş ve özel olarak hazırlanmış 298 K sabit sıcaklığa ayarlanmış su banyosundaki kapalı hücrelere alınmıştır. 30 dakika boyunca azot gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırılmıştır. Çözelti içerisinde yukarıda detayları verilen prosedüre göre temizlenmiş bakır elektrotlar daldırılmış ve iyice kapatılmıştır. Çözeltiden 2 saat daha azot gazı geçirilmiş ve sistem tamamen atmosfere kapatılmıştır. 24 saat sonunda elektrotlar çıkarılmış, saf su ve etanol ile iyice yıkanarak azot gazı ile kurutularak ölçümlerde kullanılmaya kadar desikatörde muhafaza edilmiştir. Her ölçüm için yeni hazırlanmış AMRh-SA-SAM film kaplı elektrotlar kullanılmıştır. Film kaplanmış Cu/AMRh-SA-SAM elektrotları %3,5 NaCl çözeltisine daldırılarak bakırın korozyonuna inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Kıyaslamak amacı ile aynı testler kaplanmamış bakır ile de yapılmıştır.

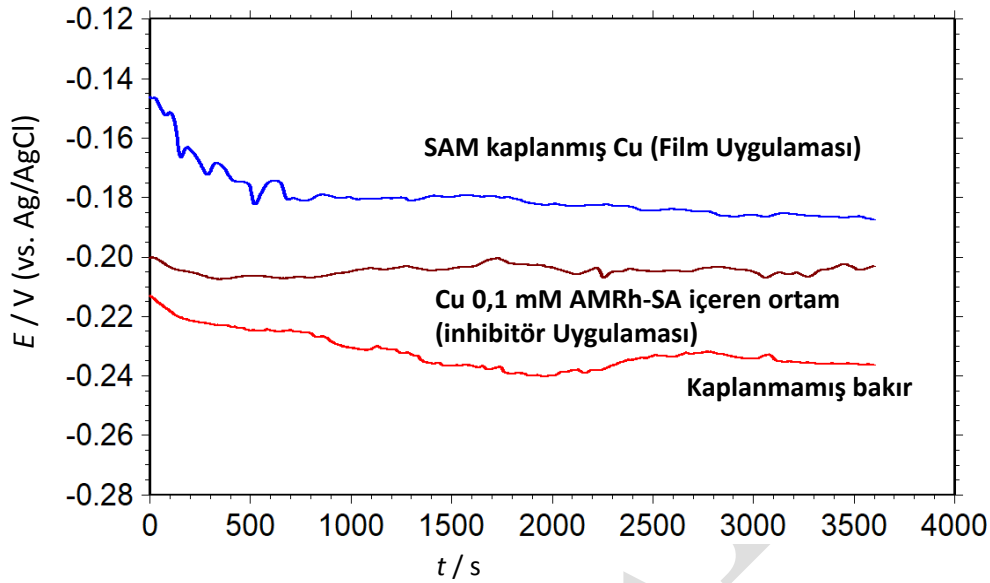
**İnhibitör Uygulamaları:** AMRh-SA'nın bakırın korozyonuna inhibitör etkisi %3,5 NaCl çözeltisinde çalışılmıştır. Bu amaçla, 0,1 mM içeren %3,5 NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıdaki prosedüre göre temizlenmiş bakır elektrotlar 0,1 mM + %3,5 NaCl çözeltisine daldırılmış ve elektrokimyasal ölçümlerle Schiff bazının bakırın korozyonuna inhibitör etkisi incelenmiştir. Karşılaştırmak amacı ile aynı deneyler inhibitör içermeyen %3,5 NaCl çözeltisinde de yapılmıştır.

Korozyon deneyleri 298'de atmosfere açık koşullarda yapılmıştır. Bu amaçla üç elektrot tekniği kullanılmıştır (Çalışma elektrotu olarak kaplanmamış ve SAM kaplanmış bakır, referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl) ve karşı elektrot olarak Pt). Deneyler çalışma elektrotunun açık devre potansiyeli dengeye geldikten sonra (1 saat) yapılmıştır. EIS ölçümleri açık devre potansiyelinde 100 kHz frekanstan başlayarak 5 mV genlik ile yapılmıştır. Lineer polarizasyon direnci belirleme ölçümleri açık devre potansiyelinden 10 mV daha negatif potansiyelden başlanarak +10 mV daha pozitif potansiyele kadar 1 mV s<sup>-1</sup> tarama hızı ile yapılmıştır. Elde edilen akım-potansiyel eğrilerin eğiminden polarizasyon dirençleri ( $R_p$ ) hesaplanmıştır. Modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrotlarda belirlenen  $R_p$  değerlerinden inhibisyon etkinliği (%IE) hesaplanmıştır. PPE ölçümleri açık devre potansiyelinden itibaren anodik potansiyele doğru 1 mV s<sup>-1</sup> tarama hızı ile yapılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

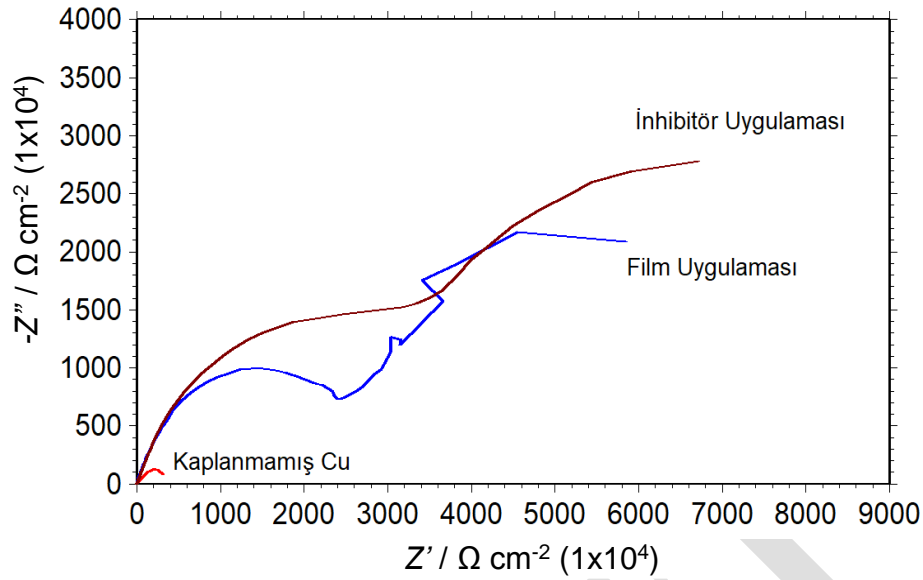
Açık devre potansiyelinin zamanla değişimi ile korozyonun başlaması veya mekanizması hakkında önemli bilgiler edinilebilmektedir. Ayrıca, elektrokimyasal ölçümlerin açık devre potansiyelinde alınması daha

güvenli sonuçlar verecektir. Bu amaçlarla, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl+0,1 mM AMRh-SA çözeltisinde (İnhibitör Uygulaması) ve AMRh-SA-SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde (Film Uygulaması) açık devre potansiyellerinin zamanla değişimi Şekil 1'de verilmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, her iki uygulamada da açık devre potansiyeli daha pasif bölgelere kaymaktadır. Dolayısı ile filmlerin daha çok anodik mekanizmaya etki ettiğini göstermektedir. Yüzye koruyucu filmler oluşmakta ve bu filmler yüzeyde fiziksel bir bariyer oluşturarak koruma sağlamaktadır. Kaplanmamış bakırda potansiyel salınımları, yüzey aktif olduğundan yüksek iken, uygulanan her iki koruma yönteminde yaklaşık 15 dakikadan sonra potansiyel salınımları azalmış ve hemen hemen sabit kalmıştır. Bu davranış, oluşan filmlerin kararlı olduğunu göstermektedir.



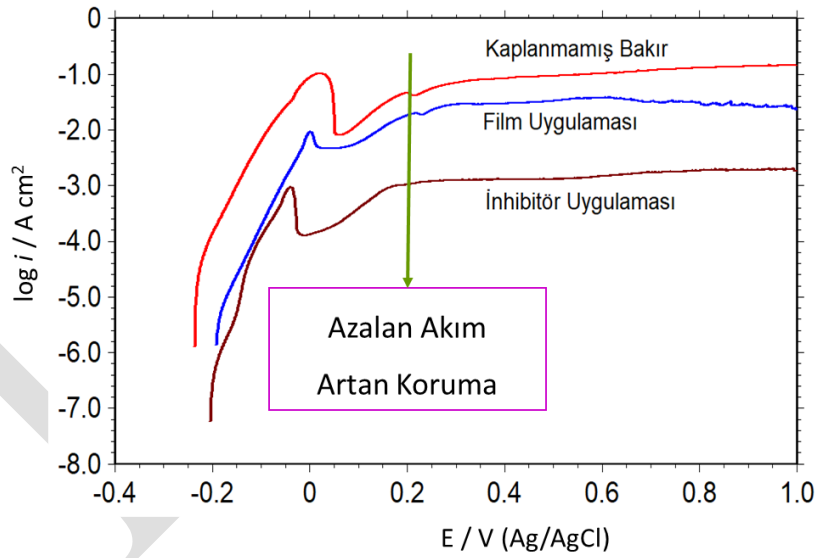
**Şekil 1.** Kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl+0,1 mM AMRh-SA çözeltisinde (İnhibitör Uygulaması), SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde (Film Uygulaması) açık devre potansiyellerinin zamanla değişimi

Kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl+0,1 mM AMRh-SA çözeltisinde (İnhibitör Uygulaması) SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde (Film Uygulaması) 1 saat daldırma sonunda elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 2'de verilmiştir. Kaplanmamış bakır ile kıyaslandığına toplam dirence karşılık gelen polarizasyon direncinin koruma yöntemleri uygulandığında son derece arttığı görülmektedir. Bu sonuç, her iki yöntemde de oldukça yüksek koruma sağlanabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte inhibitör uygulamasından polarizasyon direnci bir miktar daha yüksektir. Bu sonuç, korozif ortamda yeterli miktarda bulunan inhibitör moleküllerinin bozulan filmi hemen onarması veya inhibitörün adsorpsiyonunun devam etmesi sonucu filmin kalınlığının zamanla artması ile açıklanabilir. Koruma yöntemi uygulanmış elektrotlarda elde edilen eğrilerde, yüksek frekans bölgesindeki lup yük transfer direnci ve çift tabaka kapasitansına karşılık gelirken, düşük frekans bölgesindeki ikinci lup ise film direnci ve yüzeyde oluşan diğer birikintilerden kaynaklanmaktadır.



**Şekil 2.** Kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl+0,1 mM AMRh-SA çözeltisinde (İnhibitör Uygulaması) SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde (Film Uygulaması) 1 saat daldırma sonunda elde edilen Nyquist eğrileri

SAM filmi ve inhibitörün inhibisyon etkileri lineer polarizasyon direnci ile ayrıca belirlenmiştir. Bu teknik ile elde edilen akım-potansiyel eğrilerinin eğiminden kaplanmamış bakır, SAM kaplanmış bakır ve inhibitör eklenmiş ortamdaki bakırın polarizasyon dirençleri sırası ile 188, 3074 ve 2949  $\Omega \text{ cm}^2$  olarak belirlenmiştir. Bu verilerden film uygulamasında inhibisyon etkinliği %93,6, inhibitör uygulamasında ise %94,6 olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.** Kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde, kaplanmamış bakırın %3,5 NaCl+0,1 mM AMRh-SA çözeltisinde (İnhibitör Uygulaması) SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde (Film Uygulaması) 1 saat daldırma sonunda elde edilen anodik yarı logaritmik akım-potansiyel eğrileri

Aynı koşullarda elde edilen anodik yarı logaritmik akım-potansiyel eğrileri Şekil 3'te verilmiştir. Elde edilen eğriler incelendiğinde; her iki koruma yöntemi uygulandığında açık devre potansiyellerinin daha pasif bölgelere kaydığı görülmektedir. Potansiyeldeki bu kayma filmlerin yüzeyde koruyucu fiziksel bir bariyer etki göstererek koruma sağladığını göstermektedir. Metal çözünmesine karşılık gelen anodik akım yoğunluklarının ise son derece azaldığı görülmektedir. Akımdaki azalma, metalin çözünmesinin, dolayısı ile korozyonunun

azaldığını göstermektedir. Diğer iki yöntemde olduğu gibi inhibitör uygulamasında koruma daha yüksektir. Akım yoğunluğu bütün potansiyellerde azalmışmış olup filmlerin son derece kararlı olduğunu göstermektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada AMRh-SA Schiff bazının bakırın deniz suyunu temsilen %3,5 NaCl çözeltisinde korozyondan korunmasında iki farklı yöntem uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre;

- Bakır yüzeyinde sulu ortamda son derece kaliteli ve iyi koruma sağlayan SAM filmler hazırlanmıştır.
- Her iki uygulamada da pratik uygulamalarda güvenilir bir şekilde uygulanabilecek %90'ın üzerinde bakırın korozyonuna karşı koruma sağlanmıştır.
- İnhibitör uygulamalarında kısa süreli daldırmalarda koruma etkinliği biraz daha yüksektir.
- İnhibitör uygulamalarında elde edilen yüksek etkinlik, ortamdaki inhibitör moleküllerinin deforme olan filmi sürekli iyileştirmesi ve/veya daha yoğun film oluşumu ile açıklanmıştır.
- Bakırın korunması için uygulama alanına göre iki yöntem de önerilebilir.

## TEŞEKKÜR

Kendi kendine biriken tek tabakalı film çalışmaları Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından (Proje Numarası: 115M613), korozyon inhibitör çalışmaları Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinasyon Birimi (BÜBAP) tarafından (Proje Numarası: BAP-SBF.2019.00.001) desteklenmiştir. TÜBİTAK ve BÜBAP'a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederiz. Ayrıca, karakterizasyon çalışmalarından dolayı Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Fateh A, Aliofkhazraei M, Rezvanian AR 2017. Review of corrosive environments for copper and its corrosion inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.021>.
- Amin MA, Khaled KF 2010. Copper corrosion inhibition in O<sub>2</sub>-saturated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions. *Corrosion Science*, 52: 1194–1204.
- Solmaz R, Şahin EA, Döner A, Kardeş G 2011. The investigation of synergistic inhibition effect of rhodanine and iodide ion on the corrosion of copper in sulphuric acid solution. *Corrosion Science*, 53; 3231–3240.
- Qiang Y, Zhang S, Yan S, Zou X, Chen S 2017. Three indazole derivatives as corrosion inhibitors of copper in a neutral chloride solution. *Corrosion Science* 126; 295–304.
- Zhang XH, Liao QQ, Nie KB, Zhao LL, Yang D, Yue ZW, Ge HH, Li YJ 2015. Self-assembled monolayers formed by ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on copper surfaces in sodium chloride solution. *Corrosion Science* 93; 201–210.
- Ma Q, Qi S, He X, Tang Y, Lu G 2017. 1,2,3-Triazole derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in acidic medium: Experimental and computational chemistry studies. 1,2,3-Triazole derivatives as corrosion inhibitors for mild steel in acidic medium: Experimental and computational chemistry studies. *Corrosion Science* 129; 91–101.
- Sin HLY, Rahim AA, Gan CY, Saad B, Salleh I 2017. M, M. Umeda, Aquilaria subintergra leaves extracts as sustainable mild steel corrosion inhibitors in HCl. *Measurement*, 109; 334–345.
- Ma X, Jiang X, Xia S, Shan M, Li X, Yu L, Tang Q 2016. New corrosion inhibitor acrylamide methyl ether for mild steel in 1M HCl. *Applied Surface Science*, 371; 248–257.
- Mioč EK, Gretić ZH, Čurković HO 2018. Modification of cupronickel alloy surface with octadecylphosphonic acid self-assembled films for improved corrosion resistance. *Corrosion Science* 134; 189–198.
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. 2005. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105; 1103-1170.

## Stability and Surface Properties of Self-assembled monolayer films of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde on Copper

Derya Özdemir<sup>1</sup>, Abdullah Salcı<sup>1</sup>, Ramazan Solmaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bingöl University, Science and Letters Faculty, Chemistry Department, Bingöl, 12000, Turkey

<sup>2</sup>Bingöl University, Faculty of Health Sciences, Occupational Health and Safety Department, 12000, Bingöl, Turkey

deryaozfepolat@gmail.com; rsolmaz@bingol.edu.tr; rsolmaz01@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada, 3-aminorodaninin (AMRh) sinemaldehit (SA) Schiff bazının metanollü ortamda bakır yüzeyinde kendi kendine biriken tek tabakalı filmleri (AMRh-SA-SAM) hazırlanmıştır. Film modifiye edilmiş bakırın elektrokimyasal kararlılığı %3,5 NaCl çözeltisinde dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile belirlenmiştir. Termal kararlılıkları ise termogravimetrik analiz (TGA) ile incelenmiştir. Yüzey özellikleri ise temas açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, bakır yüzeyinde hazırlanmış filmler elektrokimyasal ve termal olarak son derece yüksek kararlılığa sahiptir. Bakır yüzeyindeki filmler yüzeyin hidrofobik özelliğini arttırmaktadır. Bu özellikler, filmlerin pratik uygulamaları için son derece önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Kendi kendine biriken tek tabakalı filmler, elektrokimyasal kararlılık, yüzey özellikleri, 3-aminorodanin, sinemaldehit, Schiff bazı

### Comparison of Two Techniques for Corrosion Protection Ability of Schiff Base of 3-Aminorhodanine and Cinnamaldehyde: Self-assembled Monolayer Films and Inhibitor Applications

#### Abstract

In this study, the self-assembled monolayer (SAM) film of Schiff base of 3-aminorhodanine (AMRh) and cinnamaldehyde (CA) were prepared on copper from methanol as solvent. The electrochemical stability of the film modified copper was tested in 3.5% NaCl solution with the help of cyclic voltammetry technique (CV). Their thermal stability was evaluated using thermogravimetric analysis (TGA). Surface properties were examined with contact angle measurements. The data obtained clearly indicated that AMRh-CA-SAM films have good electrochemical and thermal stability. The films enhance hydrophobic properties of the surface. These properties are very important for their practical applications.

**Keywords:** Self-assembled monolayer films, electrochemical stability, surface properties, 3-aminorhodanine, cinnamaldehyde, Schiff base

### GİRİŞ

Sahip olduğu üstün özelliklerinden dolayı, bakır ve alaşımları endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunların başında mikroelektronik sanayi, bağlantı kabloları, ısı ve elektrik iletkenleri, boru hatları gelmektedir (Fatehve ark., 2017; Amin ve K.F. Khaled 2010). Anebakır metali kolaylıkla oksitlendiğinden sahip olduğu bu eşsiz özelliklerini de kaybedebilmektedir (Solmaz ve ark., 2010; Qiang ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2015). Bu amaçlarla, bakır yüzeyi değişik yöntemlerle korunmaktadır. Bu amaçlarla kullanılan epoksi veya polimerler elektrokimyasal olarak (özellikle sulu ortamda) veya termal olarak yeterli dayanıklılığa sahip değildir. Bununla birlikte, gelişen teknoloji ile küçülen elektronik cihazlarda kullanılan çok ince bakır teller geleneksel kaplama yöntemleri ile kaplanamamaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldıracabilecek en uygun yöntemlerden bir kendi SAM film uygulamalarıdır.

Daha önceki çalışmamızda AMRh-SAM filmi ile bakırın termal ve elektriksel kararlılığının artırılacağı gösterilmişti (Solmaz ve ark., 2017). Bu çalışmada, AMRh-SAM filmi, AMRh'nin Schiff bazı ile daha da geliştirilmesi amaçlanmıştır. AMRh-SA-SAM filminin metanol içerisinde 0,1 mM AMRh-SA derişiminde 24 saat daldırma süresinde oluşturulmuştur. Hazırlanan filmlerin elektrokimyasal kararlılığı CV, termal kararlılığı ise TGA yöntemi ile incelenmiştir. Yüzeyin hidrofilik/hidrofobik özellikleri ise temas açısı ölçümleri ile belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Çalışma elektrotu olarak %99,9 saflıkta silindirik bakır çubuklar kullanılmıştır. 3 mm çapındaki bakır çubuklardan yaklaşık 20 cm uzunluğunda kesilmiş ve bir ucu (5 cm uzunluğunda) poliester ile kaplanmıştır. Poliester ile kaplanmış bakırın çözelti ile temas eden yüzey alanı 0,0707 cm<sup>2</sup>'dir. SAM filmler hazırlanmadan önce bakırın yüzeyi daha önce detaylarını vermiş olduğumuz teknik ile temizlenmiştir (Salcı ve Solmaz, 2018).

SAM filmler 0,1 mM AMRh-SA içeren metanol içerisinde 24 saat daldırma ile hazırlanmıştır. Filmlerin hazırlanma prosedürü daha önce detaylı bir şekilde verildiğinden, tekrardan kaçınmak amacı ile burada bir daha verilmemiştir (Salcı ve Solmaz, 2018., Salcı ve ark., 2019).

Filmlerin elektrokimyasal kararlılıkları en yaygın korozif ortamlardan biri olan %3,5 NaCl çözeltisinde CV tekniği ile belirlenmiştir. Toplam 2 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip Pot levha karşı ve Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrot olarak kullanılmıştır. CV'ler hidrojen ve oksijen çıkış potansiyelleri aralığında 20 segment olacak şekilde alınmıştır.

Metal yüzeylerinde hazırlanan SAM filmlerin termal özellikleri farklı alanlarda uygulanabilmeleri açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle, filmlerin termal davranışları TGA ile incelenmiştir. Ölçümler Pyris Diamond TG/DTA Perkin-Elmer thermal analysis ve Pyris 7.0 data-processing sistem kullanılarak azot atmosferinde ve oda sıcaklığından başlayarak filmlerin tamamen parçalandığı sıcaklığa kadar 10°C/dakika tarama hızı ile yapılmıştır. TGA analizleri için çok sayıda bakır numune üzerine AMRh-SA-SAM filmi oluşturulmuş ve neşter yardımı ile yüzeyden mekanik olarak sökülerek biriktirilmiştir.

Kaplanmamış bakır ve SAM film oluşturulmuş bakır örneklerin yüzeylerinin hidrofobik/hidrofilik özellikleri temas açısı ölçümleri ile incelenmiştir. Ölçümler saf su kullanılarak yapılmıştır.

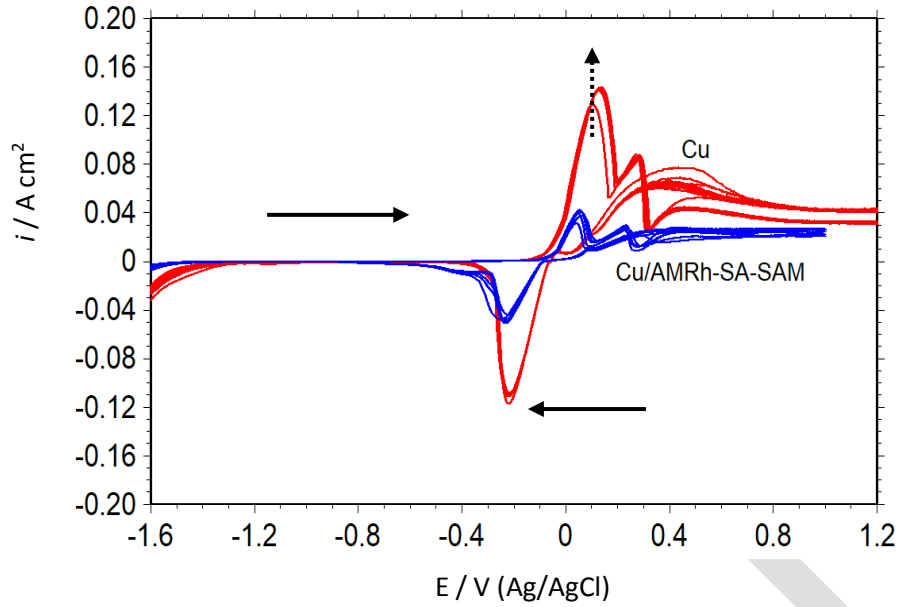
## BULGULAR ve TARTIŞMA

SAM kaplanmış yüzeyin hidrofobik/hidrofilik özellikleri hakkında bilgi edinmek amacı ile bakır üzerinde hazırlanan filmlerin temas açıları ölçülmüştür. Kıyaslamak amacı ile parlatılmış bakırın ölçümleri de yapılmıştır. Kaplanmamış bakır ve SAM modifiye edilmiş bakır yüzeylerinin temas açıları Şekil 1'de verilmiştir. Ölçümler en az 3 defa tekrarlanmış ve ortalama değerleri kaplanmamış bakır için 55, SAM kaplanmış bakır için 112,1 olarak belirlenmiştir. Kaplanmamış bakır ile kıyaslandığında film modifiye edilmiş yüzeyin temas açısı artmıştır. SAM kaplamadan sonra temas açısının artması, yüzeyin hidrofobikliğin artması anlamına gelmektedir. Dolayısı ile daha hidrofilik özelliği daha fazla olan gruplarının filmin metal kısmına yönlendiği söylenebilir. Böyle yapılar, nemli veya sulu ortamda fazla su tutmayacaklarından zamanla kararlılıklarının da yüksek olması beklenir.



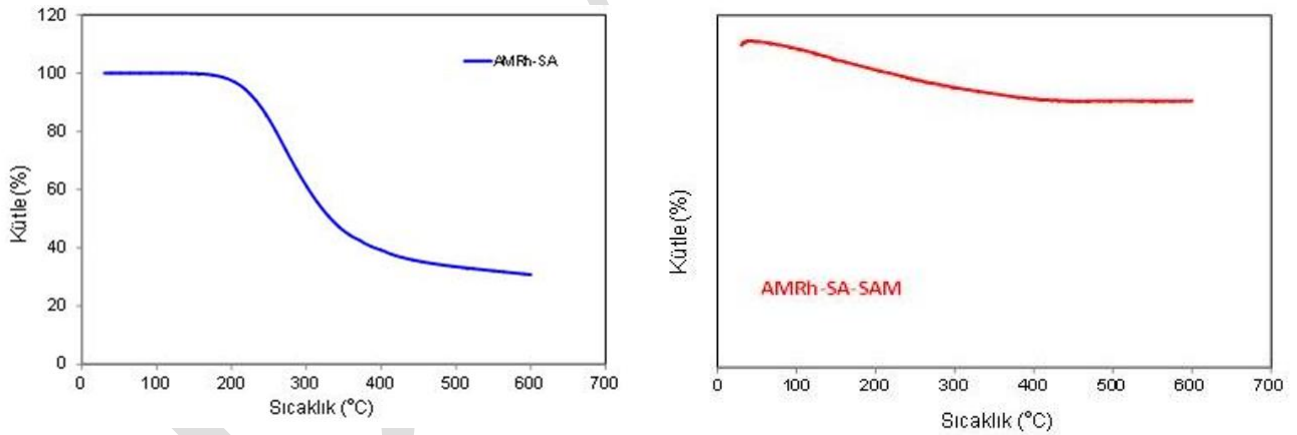
**Şekil 1.** Kaplanmamış ve 0,1 mM AMRh-SA içeren M içerisinde 24 saat sonunda AMRh-SA-SAM kaplanmış bakır yüzeylerinin temas açıları

AMRh-SA-SAM filminin elektrokimyasal kararlılığı CV ile belirlenmiş ve Şekil 2'de verilmiştir. Karşılaştırmak amacı ile benzer deneyler kaplanmamış bakır elektrotta da elde edilmiştir. Elde edilen eğriler kıyaslandığında AMRh-SA-SAM-modifiye elektrotun akımında 20 segment sonunda önemli bir değişiklik olmamış olup filmin elektrokimyasal olarak son derece kararlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, SAM filminin bakırın hem yükseltgenme hem de indirgenme tepkimesini büyük ölçüde engellediğini ve metalin yüzeyini klorür iyonlarının saldırısına karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermektedir (Liao ve ark., 2011; Zang ve ark., 2009).



**Şekil 2.** Kaplanmamış bakır ve optimum koşullarda AMRh-SA-SAM kaplanmış bakır elektrotların %3,5 NaCl çözeltisinde 1 saat sonunda alınan CV eğrileri (Scan Rate: 10 mV sec<sup>-1</sup>; Sweep segment: 20)

Bakır üzerinde hazırlanan SAM filmin termal davranışı TGA ile incelenmiştir. Bu amaçla, bakır yüzeyine oluşturulan AMRh-SA-SAM filmler neşter yardımı ile yüzeyden mekanik olarak sökülüp ve analiz edilmiştir (Bu amaçla çok sayıda film sentezlenmiş ve biriktirilmiştir). Elde edilen veriler Şekil 3'te verilmiştir. Elde edilen grafikler incelendiğinde AMRh-SA-SAM filminin termal dayanımının Schiff sentezi ile önemli ölçüde artmadığı görülmektedir.



**Şekil 3.** Saf AMRh-SA ve optimum koşullarda Cu yüzeyine kaplanan AMRh-SA-SAM filmlerin termal davranışları

## SONUÇ

Metanol içerisinde 0,1 mM AMRh-SA derişiminde 24 saat daldırma ile bakır yüzeyinde oldukça kaliteli AMRh-SA-SAM filmler hazırlanmıştır. Film sentezi ile yüzeyin temas açısı dolayısı ile yüzeyin hidrofobik özelliği artmıştır. Bu artış, filmin su tutarak zamanla kalımlılığını önlemektedir. Film kaplama ile anodik ve katodik akım yoğunlukları önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalma, filmin metalin çözünmesini yani korozyon hızını yavaşlattığını göstermiştir. Filmler zamanla son derece yüksek elektrokimyasal kararlılığa sahiptir. Filmler aynı zamanda yüksek termal dayanıklılığa da sahiptir. AMRh-SA ile kıyaslandığında SAM filminin termal dayanıklılığı daha da artmıştır. Bu özelliklerinden dolayı AMRh-SA-SAM filminin pratikte, sanayide kullanılabileceği önerilmiştir.



## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından (Proje Numarası: 115M613) desteklenmiştir. TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı çok teşekkür ederiz. Ayrıca, karakterizasyon çalışmalarından dolayı Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Fateh A, Aliofkhazraei M, Rezvanian AR 2017. Review of corrosive environments for copper and its corrosion inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.021>.
- Amin MA, Khaled KF 2010. Copper corrosion inhibition in O<sub>2</sub>-saturated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solutions. *Corrosion Science*, 52: 1194–1204.
- Solmaz R, Şahin EA, Döner A, Kardaş G 2011. The investigation of synergistic inhibition effect of rhodanine and iodide ion on the corrosion of copper in sulphuric acid solution. *Corrosion Science*, 53; 3231–3240.
- Qiang Y, Zhang S, Yan S, Zou X, Chen S 2017. Three indazole derivatives as corrosion inhibitors of copper in a neutral chloride solution. *Corrosion Science* 126; 295–304.
- Zhang XH, Liao QQ, Nie KB, Zhao LL, Yang D, Yue ZW, Ge HH, Li YJ 2015. Self-assembled monolayers formed by ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on copper surfaces in sodium chloride solution. *Corrosion Science* 93; 201–210.
- Solmaz R, Salcı A, Özdemir D 2017. Electrochemical and thermal stability of novel nano-scaled aminorhodanine self-assembled monolayer films on copper. 8th International Advanced Technology Symposium, 224 pp., Elazığ, Turkey 12-19 October 2017.
- Salcı A, Solmaz R 2018. Fabrication of rhodanine self-assembled monolayer thin films on copper Solvent optimization and corrosion inhibition studies. *Progress in Organic Coatings*, 125; 516–524
- Salcı A, Şahin EA, Solmaz R 2019. Methanol electrooxidation at nickel-modified rhodanine self-assembled monolayer films A new class of multilayer electrocatalyst. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44; 14228-14234.
- Liao Q-Q, Yue Z-W., Yang D, Wang Z-H, Li Z-H, Ge H-H., Li YJ 2011. Self-assembled monolayer of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on copper detected using electrochemical methods, surface enhanced Raman scattering and quantum chemistry calculations. *Thin Solid Films*, 519; 6492-6498.
- Zhang DQ, Cai QR, He XM, Gao LX, Kim GS 2009. The corrosion inhibition of copper in hydrochloric acid solutions by a tripeptide compound. *Corrosion Science*, 51; 2349-2354.

## The Use of Bingöl-Adaklı Propolis Self-Assembled Monolayer Films for Metal Protection

Ramazan Solmaz<sup>1</sup>, Ece Altunbaş Şahin<sup>2</sup>, İbrahim Halil Gecibesler<sup>1</sup>, Mustafa Doğrubaş<sup>1</sup>, İbrahim Y. Erdoğan<sup>1</sup>, Sinan Bayındır<sup>3</sup>, Gülfeza Kardaş<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bingöl University, Faculty of Health Sciences, Occupational Health and Safety Department, 12000, Bingöl, Turkey

<sup>2</sup>Bingöl University, Genç Vocational School, Property Protection and Security Department, Civil Defense and Firefighting Program, 12000, Bingöl, Turkey

<sup>3</sup>Bingöl University, Science and Letters Faculty, Chemistry Department, Bingöl, 12000, Turkey

<sup>4</sup>Çukurova University, Science and Letters Faculty, Chemistry Department, Adana, 01330, Balcalı, Adana, Turkey

rsolmaz@bingol.edu.tr; rsolmaz01@gmail.com

### Özet

Arıcılık, Bingöl ilinde bölgesel/kırsal kalkınmayı sağlayacak en önemli potansiyel sektörlerin başında gelmektedir. Sektörün ekonomik açıdan avantajlı hale getirilerek istihdamın ve ekonomik refah düzeyinin artırılmasının önemli bir yolu da bal dışında diğer arı ürünlerinin de yaygınlaştırılmasıdır. Bingöl ilinde, arı ürünü olarak neredeyse tamamen bal üzerine yoğunlaşmış olup, buna karşın Propolis (PP) ve Polen (P) gibi diğer arı ürünleri ekonomik açıdan neredeyse hiç değerlendirilmemektedir. PP bal arıları tarafından üretilen endüstriyel bir gıda takviyesi olup insanlar tarafından günlük diyetle alınarak bağışıklık sisteminin güçlenmesine ve sağlığın korunmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Bu çalışmada, PP arıcılığın yoğun olarak yapıldığı Adaklı ilçesinde üretilmiştir. Doğal Adaklı propolislerinin bakır yüzeyinde kendi kendine biriken tek tabakalı filmleri oluşturulmuştur (APP-SAM). Filmlerin bakırın korozyonuna inhibisyon etkileri en yaygın korozif ortamlardan biri olan klorürlü ortamda çalışılmıştır. Korozyon testlerinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), lineer polarizasyon direnci (LPR) ve potansiyodinamik polarizasyon eğrileri (PPE) kullanılmıştır. Elde edilen bulgular bakır yüzeyinde oldukça ince ve koruyucu Bingöl-APP-SAM filmlerinin oluşturulabileceğini göstermiştir. Bu filmler bakırın korozyona karşı korumaktadır. Korozyon inhibisyon etkinliği %97 dolayında olup pratikte endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir kadar yüksek bir etkinliktir.

**Anahtar Kelimeler:** Arıcılık, Bingöl Propolisi, kendi kendine biriken tek tabakalı filmler, bakırın korunması

## The Use of Bingöl-Adaklı Propolis Self-Assembled Monolayer Films for Metal Protection

### Abstract

Beekeeping is one of the most important potential sectors to provide regional / rural development in the province of Bingöl. An important way to increase the level of employment and economic prosperity by making the sector economically advantageous is to expand other bee products besides honey. In the province of Bingöl, bee products are concentrated almost entirely on honey, whereas other bee products such as Propolis (PP) and Polen (P) are not evaluated economically at all. Propolis (PP) is an industrial food supplement produced by honeys, which is taken on a daily diet by humans and provides important contributions to the strengthening of the immune system and the protection of health. In this study, PP was produced from Adaklı-Bingöl region where beekeeping is done intensively in this province. Self-assembled monolayer (SAM) films of natural Adaklı PP (APP-SAM) were formed on the copper surface. The films were used for copper protection in chloride containing solution, which is one of the most corrosive agents. For corrosion tests, electrochemical impedance spectroscopy (EIS), linear polarization resistance (LPR) and potentiodynamic polarization curves (PPE) were used. It was found that, very thin and high-quality Bingöl-APP-SAM could be fabricated over the copper surface. The films protect this metal against corrosion. The protection ability was around 97%, which clearly indicates that this film could be used for practical industrial applications.

**Keywords:** Beekeeping, Bingöl Propolis, Self-assembled monolayer films, copper protection

## GİRİŞ

Arıcılık, Bingöl ilinde bölgesel/kırsal kalkınmayı sağlayacak en önemli potansiyel sektörlerin başında gelmektedir. Coğrafik yapısı, sahip olduğu zengin bitki çeşitliliği gibi son derece önemli avantajlara sahip olmasına karşın, arıcılık mesleği ve ekonomik kazanımları arzu edilen düzeyde değildir. Mesleğin bilimsellikten uzak daha çok geleneksel yöntemlerle yapılması, ekonomik açıdan cazibesinin yeterli olamamasından dolayı sektörle uğraşan gençler ve özellikle kırsal alanlarda kadınların az olması, bal veriminin yeterli olmaması veya balın standartizasyonunun oluşturulamayarak tescillenememesi nedeni ile ucuza satılması, sağlıklı ve organik bal üretiminin neredeyse olmaması en önemli problemlerin başında gelmektedir. Sektörün ekonomik açıdan avantajlı hale getirilerek istihdamın ve ekonomik refah düzeyinin artırılmasının önemli bir yolu da bal dışında diğer arı ürünlerinin de yaygınlaştırılmasıdır. Bingöl ilinde, arı ürünü olarak neredeyse tamamen bal üzerine yoğunlaşmış olup, buna karşın PP gibi diğer arı ürünleri ekonomik açıdan neredeyse hiç değerlendirilmemektedir. PP bal arıları tarafından üretilen endüstriyel bir gıda takviyesi olup insanlar tarafından günlük diyetle alınarak bağışıklık sisteminin güçlenmesine ve sağlığın korunmasına önemli katkılar sağlamaktadır. İçermiş oldukları biyoaktif maddelerden dolayı bu arı ürünlerinin tıp ve eczacılık alanlarında farmakolojik uygulamaları da gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Dünya genelinde, arı ürünleri içerisinde en yaygın çalışmalar bal üzerinde yapılmaktadır. Ancak, son yıllarda propolis polen ve arı zehiri gibi diğer arı ürünlerinin yaygınlaştırılması için çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle bu ürünlerin tıbbi özelliklerinin araştırılması son derece önemlidir. Örneğin Brezilya'da propolisler üzerine yapılan bilimsel çalışmalarda Brezilya propolisinin kimyasal içeriği ve biyolojik etkinliği ortaya konularak Brezilya propolisinin markalaşması sağlanmıştır. Bu araştırmanın sonucu olarak Brezilyalı arı yetiştiricileri PP ticaretinden önemli ekonomik gelir elde etmektedirler (Rao ve ark., 2009; Rao ve ark., 2014).

Propolislerin kimyasal kompozisyonları ve biyolojik aktiflikleri elde edildikleri floral çevreden kaynaklı önemli oranda farklılıklar göstermektedir. Propolisler kimyasal bileşim açısından bitki reçineleri, uçucu yağlar, polen, zambak, musilaj, lateks ve diğer organik maddeler propolisin biyoaktif içeriğini oluşturmaktadır. Bu biyoaktif içerikler ise antioksidan, antikanser, antibakteriyel, antiviral, antiparaziter, antifungal, antiinflamatuvar, antiülser, hepatoprotektif, kardioprotektif, ve antiseptik gibi bir çok biyolojik aktivite özelliği kazandırır (Pan ve ark., 2013; Ishitsuka ve ark., 2011). PP maddesi, adsorpsiyon merkezi olarak kabul edilen N, S, O ve çok sayıda doymamış bağ bulunduran çok sayıda sağlıklı molekül içerip metal yüzeyine adsorplanarak kararlı ve korozyona karşı dirençli filmler elde edilmesi beklenmektedir.

Kendi kendine biriken tek tabakalı filmler (SAM) oldukça yoğun, sıkı, iyi düzenlenmiş, ultra ince organik filmler olup son zamanlarda metalleri korozyona karşı korumada yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Mioč ve ark., 2018; Love ve ark., 2005). Ancak, bu amaçla kullanılan maddelerin çoğu toksit olup yaygın etkilerini azaltmaktadır. Dolayısı ile PP gibi doğal ürünlerin bu amaçla kullanılması, hem ekolojik ve ekonomik açıdan hem de filmlerin çocuk oyuncakları, tıbbi malzemeler vb. daha geniş alanlarda uygulamalarını sağlayacaktır. Diğer taraftan, PP'in farklı amaçlarla kullanılması, bu ürünün de yaygın etkisini artırarak sektöre önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışmada hazırlanacak APP-SAM filmlerinin hazırlanması ve metalleri korozyona karşı koruma amaçlı kullanımları henüz rapor edilmemiştir. Sağlıklı olduğundan hazırlanacak film birçok alanda güvenli bir şekilde kullanılabilir.

## MATERYAL VE METOT

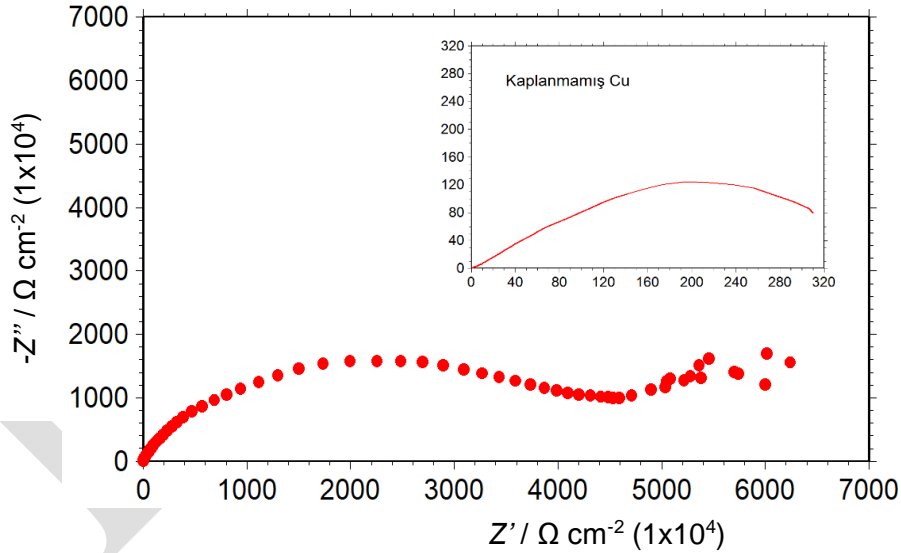
SAM filmlerin oluşturulacağı bakır metali çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır. Bakır elektrotlar, silindirik şekilde ve 3 mm çapındaki bakır çubuklardan yaklaşık 20 cm uzunluğunda kesilip sadece filmlerin oluşturulacağı ve ölçümlerin yapılacağı ucu açıkta kalacak şekilde poliestere içerisine gömülerek hazırlanmıştır. Çalışma elektrotu olarak kullanılacak bakırın çözelti ile temas eden yüzey alanı 0,0707 cm<sup>2</sup>'dir. Elektrotların çözelti ile temas eden açık yüzeyleri deneylerden önce mekanik parlaticıda 320-2000 gritlik zımpara kağıtları ile parlatılmıştır. Elektrotun yüzeyi daha sonra saf su ile yıkanarak 7 N HNO<sub>3</sub> çözeltisinde karıştırılarak 10 s bekletilmiş ve yüzeyindeki oksitler temizlenerek çözülmüştür. Bu prosedür ile moleküllerin yüzeye daha iyi tutunduğu gözlenmiştir. Sonrasında, elektrot yüzeyi tekrar saf su ile yıkanarak kurutulmuş, mutlak etanol ile yıkanmış ve mutlak etanol içerisinde 3-4 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Böylece parlatmadan sonra veya asit ile kimyasal çözülmeden sonra yüzeyde kalan metal partikülleri yüzeyden uzaklaştırılmış ve film için uygun, temiz bir yüzey elde edilmiştir. Ultrasonikten çıkarılan elektrotun yüzeyi tekrar mutlak etanol ile yıkanmış, kurutulmuş ve zaman kaybetmeden yarım saat öncesinden azot gazı geçirilmiş film oluşum çözeltilerine/korozyon test çözeltisine daldırılmıştır (Solmaz ve ark. 2018).

APP- SAM filmler değişik derişimlerde PP içeren etanolde, 24 saat daldırma süresinde elde edilmiştir. Derişimler maddelerin çözünürlükleri ve elde edilen film kalitesine göre belirlenmiştir. Çözeltiler film hazırlanacak kimyasaldan uygun miktarda tartıldıktan sonra çözücü ile istenilen hacme seyreltilerek hazırlanmıştır. Düşük derişimlerde daha hassas hazırlamak için en derişik çözeltilinin stoğu hazırlanmış ve bundan seyreltilerek daha seyreltik çözeltiler hazırlanmıştır Örneğin 50 mL 1000 ppm APP stok çözelti 100 mL'lik balonjojede 50 mL aynı çözücü ile 100 mL'ye tamamlanarak 5,0 ppm PP çözeltisi hazırlanmıştır Film oluşumu süresince çözelti sıcaklıkları su banyosunda 25°C'de sabit tutulmuştur.

Bakır yüzeyinde oluşturulan APP-SAM filmlerin bakırın korozyonuna inhibisyon etkileri deniz suyunu temsilen %3,5 NaCl çözeltisinde 25°C'de elektrokimyasal teknikler ile incelenmiştir. Elektrokimyasal ölçümlerinde üç elektrot tekniği kullanılmıştır (Çalışma elektrotu olarak kaplanmamış ve SAM kaplanmış bakır, referans elektrot olarak Ag/AgCl (3 M KCl) ve karşı elektrot olarak Pt). Elektrotlar korozif ortama daldırıldıktan 1 saat sonra elektrokimyasal ölçümler yapılmıştır. EIS ölçümleri açık devre potansiyelinde 100 kHz frekanstan başlayarak 5 mV genlik ile yapılmıştır. Lineer polarizasyon direnci belirleme ölçümleri açık devre potansiyelinden 10 mV daha negatif potansiyelden başlanarak +10 mV daha pozitif potansiyele kadar 1 mV s<sup>-1</sup> tarama hızı ile yapılmıştır. Elde edilen akım-potansiyel eğrilerin eğiminden polarizasyon dirençleri ( $R_p$ ) hesaplanmıştır. Modifiye edilmiş ve edilmemiş elektrotlarda belirlenen  $R_p$  değerlerinden SAM filmlerinin inhibisyon etkinliği (%E) hesaplanmıştır. PPE ölçümleri açık devre potansiyelinden itibaren anodik veya katodik potansiyellere doğru 1 mV s<sup>-1</sup> tarama hızı ile yapılmıştır. Korozyon ölçümleri atmosfere açık koşullarda ve test çözeltisi karıştırılmadan yapılmıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

EIS tekniği, metal yüzeylerinin incelenmesinde özellikle korozyon çalışmalarında son dönemlerde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu teknikte metale küçük genlikli alternatif akım (veya potansiyel) uygulanmakta ve metalin davranışları incelenmektedir. Doğrusal akım (veya potansiyel) uygulanmadığından yüzey polarize olmamakta ve bozulmamaktadır. Bu durum son derece avantajlar sağlamaktadır. Kaplanmamış bakır ve 1000 ppm Bingöl-APP içeren etanol (E) 24 saat sonunda Bingöl-APP-SAM kaplanmış bakır elektrotların %3,5 NaCl çözeltisinde 1 saat sonunda elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Kaplanmamış Cu ve 1000 ppm APP içinde 24 saat daldırma süresi sonunda APP-SAM kaplanmış bakır elektrotların Nyquist eğrileri

Nyquist eğrilerinin yarıçapı genel olarak polarizasyon direncine ( $R_p$ ) karşılık gelmektedir.  $R_p$  değerinin büyük olması korozyon hızının düşük olduğunu yani korozyon hızının yavaşladığını göstermektedir. Kaplanmamış bakır ile kıyaslandığında APP-SAM kaplanmış bakırın direncinin son derece arttığı (yaklaşık 20 kat) görülmektedir. Dolayısı ile filmin klorürlü ortamda son derece iyi bir koruma sağladığı söylenebilir.

Organik filmlerin korozyon dirençlerini belirlemek için kullanılan bir diğer önemli teknik lineer polarizasyon direncidir (LPR). LPR tekniğinde, hemen hemen doğrusal bir değişimin gözlemlendiği elektrotun açık devre potansiyeline çok yakın potansiyel aralığında düşük bir potansiyel tarama ile akım-potansiyel eğrileri elde

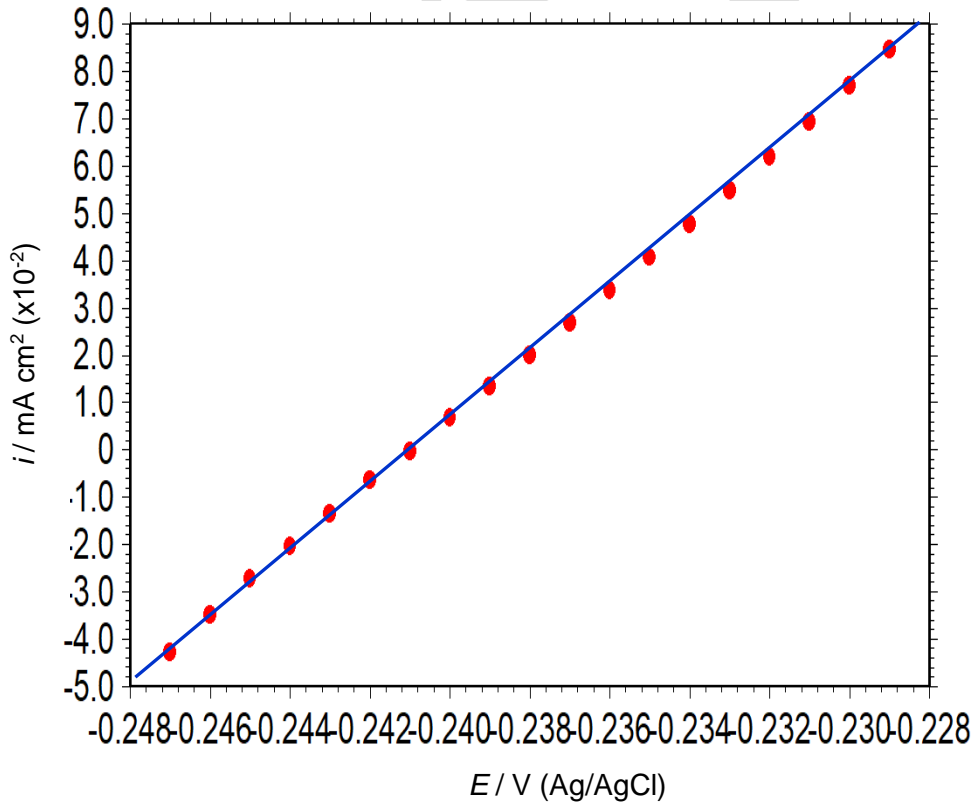
edilir (Şekil 2). Elde edilen akım-potansiyel eğrilerinin eğiminden polarizasyon dirençleri ( $R_p$ ) hesaplanmıştır (Eşitlik 1).

$$R_p = \frac{SdE}{di} \quad (1)$$

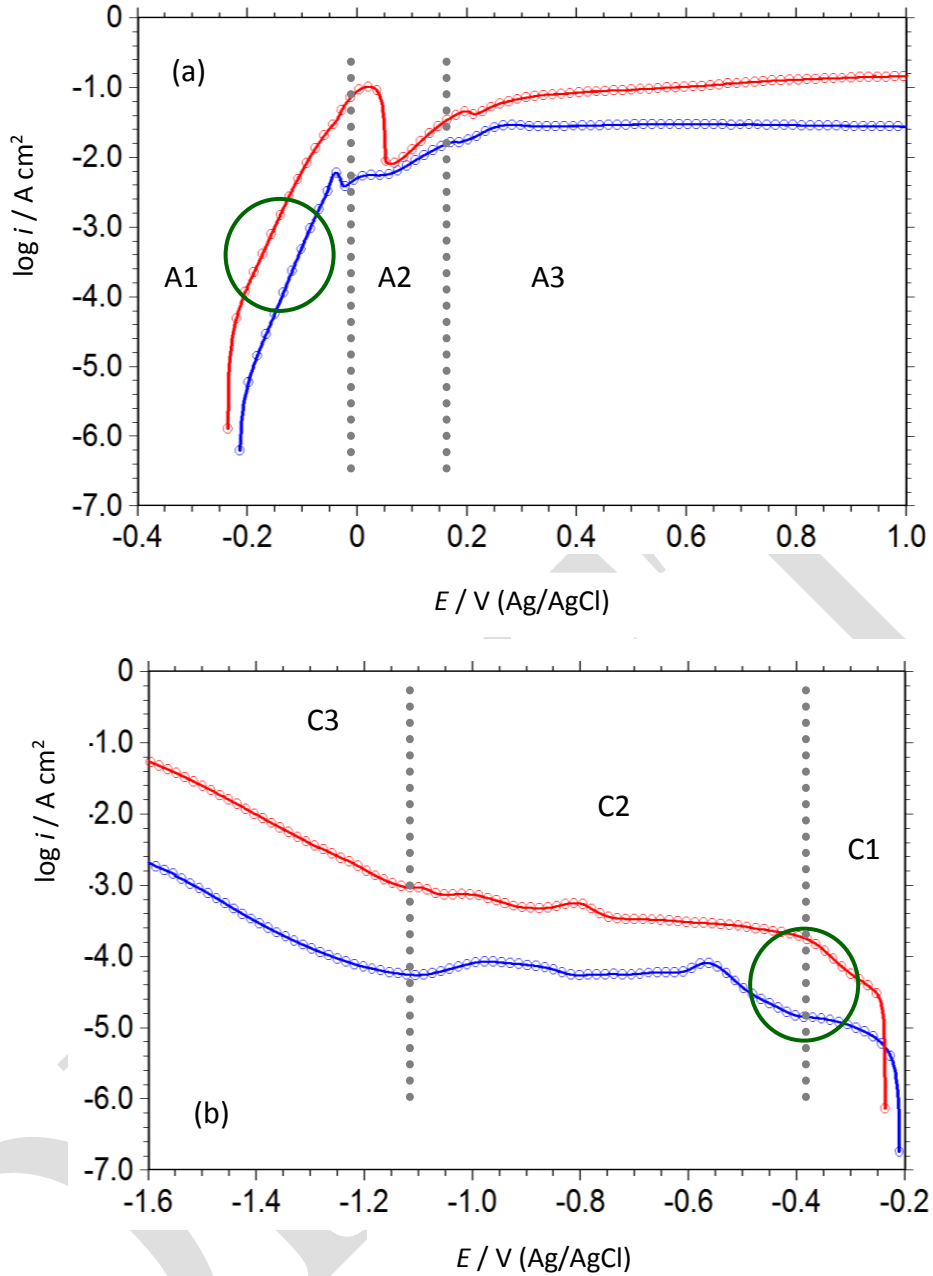
Burada  $R_p$ ,  $S$ ,  $E$  ve  $i$  sırası ile elektrotun polarizasyon direnci, yüzey alanı sisteme uygulanan potansiyel ve sistemden geçen akımdır.

Kaplanmamış bakır ve Bingöl-APP içeren etanol içinde 24 saat sonunda Bingöl-APP-SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde LPR ölçümlerinden belirlenen  $R_p$  değerleri sırası ile 188 ve 7156  $\Omega \text{ cm}^2$ 'dir. Eşitlik 1 yardımı ile inhibisyon etkinliği %97,4 olarak hesaplanmıştır. Bu veriler EIS sonuçları ile son derece uyumlu olup APP-SAM filminin bakırın korozyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Yüksek inhibisyon etkinliği, yüzeyi oldukça iyi kapatan, daha sıkı ve yoğun bir filmin oluşması ile açıklanabilir.

Değişik çözücülerde Bingöl-APP-SAM modifiye edilmemiş ve edilmiş bakır elektrotların %3,5 NaCl çözeltisindeki elektrokimyasal davranışları yarı-logaritmik akım-potansiyel eğrileri (Potansiyodinamik Polarizasyon Eğrileri, PPE) ile elde edilmiştir. Bu çalışmada, yüzeydeki filmin potansiyelden etkilenerek değişmemesi için 1 saat sonunda açık devre potansiyelinin ( $E_{ocp}$ ) dengeye gelmesinden sonra,  $E_{ocp}$ 'den daha anodik veya daha katodığe doğru ayrı ayrı eğriler elde edilmiştir. Her eğri için yeni bir elektrot kullanılmıştır. Kaplanmamış bakır ve etanol içerisinde 1000 ppm Bingöl-APP içeren çözeltide 24 saat bekletilerek Bingöl-APP-SAM kaplanmış bakır elektrotların %3,5 NaCl çözeltisinde 1 saat sonunda anodik ve katodik PPE eğrileri Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 2. Bingöl-APP-SAM kaplanmış bakırın %3,5 NaCl çözeltisinde 1 saat sonunda LPR tekniği ile elde edilen akım-potansiyel eğrisi



**Şekil 3.** Kaplanmamış bakır (○) ve 1000 ppm Bingöl-APP içeren etanol içerisinde 24 saat bekletilerek Bingöl-APP-SAM kaplanmış bakır (●) elektrotların anodik (a) ve katodik PPE eğrileri (b)

Elde edilen eğriler incelendiğinde; metal yüzeyinin film ile kaplanması ile  $E_{ocp}$  daha pozitif potansiyellere kaymıştır. Potansiyeldeki bu kayma filmin yüzeyde koruyucu fiziksel bir bariyer etki göstererek koruma sağladığını göstermektedir. Hem anodik hem de katodik akımlar APP-SAM kaplı elektrotta son derece azalmıştır. Bu azalma, filmin anodik ve katodik reaksiyonların hızını azaltarak korozyonu yavaşlattığını göstermektedir. Modifiye elektrotun çok yüksek potansiyellere kadar bu özelliğini koruması, yüzeydeki filmin oldukça kararlı olduğunu göstermektedir. İnhibitör uygulamalarında, yüksek potansiyellerde metalin aşırı çözünmesinden dolayı genellikle film yüzeyden atmakta/deforme olmaktadır. Dolayısı ile SAM filminin bu özelliği önemli bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Hem oksijen indirgenme (C1 Bölgesi) hem de hidrojen gazı oluşumu (C3 Bölgesi) reaksiyonlarına karşılık gelen yarı logaritmik eğrilerin hemen hemen bir birine paralel olması, filmin bu iki reaksiyonun mekanizmasına etki etmediğini göstermektedir. Dolayısı ile SAM filminin yüzeyi kapatarak iyonların yüzeye difüzlenerak indirgenmesini yavaşlatarak etki ettiği söylenebilir. Yani, yüzey kapanabildiği ölçüde inhibisyon sağlanmaktadır.

## SONUÇ

Bakır yüzeyinde etanol içerisinde son derece kaliteli Bingöl-APP-SAM filmler hazırlanmıştır. Filmler bakırın en yaygın ve tehlikeli korozif ortamdaki ( NaCl) korozyon hızını %97 oranında yavaşlatmaktadır. Bu inhibisyon etkisi son derece yüksek olup, filmlerin bu amaçla pratikte güvenilir bir şekilde kullanılabilceğini göstermektedir. Elde edilen bulgular Bingöl-PP'lerinden boya ve polimer kaplamalara alternatif sağlıklı filmlerin hazırlanabileceğini göstermiştir. Dolayısı ile, Bingöl-APP-SAM filmlerin son derece sağlıklı olması neden ile, filmlerin çok geniş alanlarda, örneğin çocuk oyuncakları, tıbbi malzemeler vb. kullanılabilceği önerilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı tarafından finanse edilen ve Yüksek Öğretim Kurumu tarafından koordine edilen Üniversitelerin Bölgesel Kalkınma Odaklı Misyon Farklılaşması ve İhtisaslaşması Projesi (Proje Numarası: 2017K124000) kapsamında Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: PİKOM-Arı.2018.006).

## KAYNAKLAR

- Rao BVA, Reddy M, Sreedhar B 2014. Self-assembled 1-octadecyl-1H-1,2,4-triazole films on copper for corrosion protection. *Progress in Organic Coatings*, 77: 202– 212.
- Rao BVA, Iqbal MdY, Sreedhar B 2009. Self-assembled monolayer of 2-(octadecylthio)benzothiazole for corrosion protection of copper. *Corrosion Science*, 51: 1441–1452.
- Pan YC, Wen Y, Guo XY, Song P, Shen S, Du YP, Yang HF 2013 2-Mercaptobenzothiazole doped chitosan/11-alkanethiolate acid composite coating Dual function for copper protection. *Corrosion Science*, 73: 274–280.
- Ishitsuka M, Hiaki T, Osaka N 2011. Coadsorption self-assembled monolayers of trithiocyanuric acid and 1,3,5-benzenetrithiol on an evaporated silver film. *Journal of Molecular Structure*, 1002: 179–186.
- Mioč EK, Gretić ZH, Ćurković HO 2018. Modification of cupronickel alloy surface with octadecylphosphonic acid self-assembled films for improved corrosion resistance. *Corrosion Science* 134; 189–198.
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. 2005. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105; 1103-1170.
- Solmaz R, Salcı A, Özdemir D, Can, Ü 2018. Rodanin türevi bileşiklerin bakırın yüzeyinde kendi kendine biriken tek tabakalı filmlerinin oluşturulması ve karakterizasyonu: Korozyon inhibisyon uygulamaları, 115M613 No'lu TÜBİTAK Projesi.

## Methanol electrooxidation activity of MoCu-Au composit electrocatalyst in alkaline solution

Ramazan Solmaz

Bingöl University, Faculty of Health Sciences, Occupational Health and Safety Department, 12000, Bingöl,  
Turkey

rsolmaz@bingol.edu.tr; rsolmaz01@gmail.com

### Özet

Geniş boşluklara ve yüksek elektriksel iletkenliğe sahip karbon keçe (C) yüzeyine Mo ve Cu metalleri elektrokimyasal olarak bir arada çöktürülmüştür (C/MoCu). Hazırlanan ikili alaşım daha sonra özel olarak hazırlanmış bir kaplama banyosunda kimyasal yer değiştirme tekniği ile Au ile modifiye edilmiştir. Elektrotlar yüzey karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir. C/MoCu-Au doğrudan metanollü yakıt pillerinde (DMFC) potansiyel anot malzemesi olarak test edilmiştir. Bu amaçla elektrokimyasal teknikler kullanılmıştır. Elde edilen bulgular C yüzeyinde oldukça iyi tutunmuş ve homojen dağılımlı ikili MoCu kaplamaların hazırlanabileceğini göstermiştir. İkili MoCu filminin üzerine oldukça homojen dağılımlı ve iyi tutunmuş Au çöktürülebilmektedir. Elektrokimyasal ölçümler Mo ve Cu metallerinin bir arada çöktürülmesi ile hazırlanan elektrotun metanol elektrooksidasyonunun hızını arttırdığını göstermiştir. Yüzeyin çok az miktarda Au ile modifiye edilmesi elektrotun performansını daha da arttırmıştır. C/MoCu-Au elektrotun yüksek aktivitesi elektrotun iyi yüzey yapısı alanı ve metaller arasında oluşan sinerjistik etki ile açıklanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Doğrudan metanollü yakıt pilleri, metanol elektrooksidasyonu, karbon keçe, elektrokimyasal çöktürme, Au aktive edilmiş MoCu elektrokatalizörü

## Methanol electrooxidation activity of MoCu-Au composit electrocatalyst in alkaline solution

### Abstract

Surface of carbon felt (C), which has high electrical conductivity and has quite wide gaps, was modified by electrochemical co-deposition of Mo and Cu (C/MoCu). The co-deposit was then further modified by Au (C/MoCu-Au) with the help of chemical replacement method in a properly prepared deposition bath. The electrodes were characterized using surface characterization methods. The C/MoCu-Au was tested as possible anode material for direct methanol fuel cells. For this aim, electrochemical methods were used. It was found that porous and compact MoCu thin films could be prepared over the C surface. Very homogeneously distributed and adherent Au could be deposited over the formerly coated binary MoCu layers. Electrochemical measurements showed that the co-deposition of small amounts of Mo and Cu enhances the rate of methanol electrooxidation reaction. Modifying the surface with small amount of Au improve performance of the electrode for this process. The enhanced activity of the C/MoCu-Au electrode for methanol electrooxidation was assigned to enlarged real surface area, synergistic effect between the metals and good surface structure.

**Keywords:** Direct methanol fuel cells, methanol electrooxidation, carbon felt, electrochemical deposition, Au-activated MoCu electrocatalyst

### GİRİŞ

Teknoloji ve endüstrinin hızla gelişmesi ile birlikte dünya geneline enerjiye ve enerji çeşitliliğine olan ihtiyaç ta her geçen gün artmaktadır. Diğer yandan dünya genelinde enerji talebinin büyük çoğunluğunu oluşturan fosil yakıtların rezervleri azalmakta, fiyatları artmakta, insan ve çevreye olan olumsuz etkileri de sürekli artmaktadır. Bu nedenle enerjinin depolanması veya farklı enerji formlarına dönüştürülmesi önemli hale gelmektedir. Bu amaçla da verimlilikleri yüksek ve ucuz güç kaynaklarına ihtiyaç vardır (Yan ve ark., 2018). Diğer bataryalar ile kıyaslandığında daha uzun ömürleri, güç kapasiteleri, yakıt beslemesi gibi üstün özelliklere sahip olduklarından yakıt pilleri ön plana çıkmaktadır (Pochai ve ark., 2015). Bugüne kadar çalışma sıcaklıkları, yakıt türü, elektrolit türü, çalışma koşulları gibi özellikleri ile sınıflandırılan çok fazla yakıt pili geliştirilmiştir. Bunlardan en önemlilerinden biri de DMFC olup geleceğin enerji dönüştürücüleri olarak gösterilmektedir. Bu pillerin en önemli avantajları; küçük boyutları, yüksek enerji dönüşüm kapasiteleri, düşük çalışma sıcaklığı, yakıtın kolay depolanması, yüksek enerji yoğunlukları, hafif olmaları ve yakıt olarak metanolün kolay üretilebilirliği sayılabilir (Döner ve Kardaş, 2015; Jafarian ve ark., 2011). Son yıllarda bu piller ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmış ve önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak, düşük anot kinetiği, düşük sıcaklıklar için gerekli katalizörlerin pahalı olması, zamanla kararlılıklarının istenilen düzeyde olmaması



ve özellikle anotun ara ürünlerin geri dönüşümsüz tutunmaları nedeniyle zehirlenmesi gibi sorunlardan dolayı günlük yaşamda ve sanayide yaygın kullanımlarını sınırlamaktadır (Yang ve ark., 2013; Huang ve ark., 2012). Bu nedenle, bu dezavantajları ortadan kaldıracak anot malzemelerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Korozyon hızının düşük olması, elektrot kinetiğinin hızlı olması ve özellikle farklı geçiş metallerinin elektrot yapımında kullanılabilirliği nedeniyle (asidik ortamda çoğu metal çözünmektedir) genellikle bazik çözeltiler tercih edilmektedir. Metanol elektrooksidasyonunu en iyi katalizleyen metal ise Pt'dir. Ancak, bu metalin doğadaki miktarının az olması, pahalı olması ve CO gibi ara ürünlerle zehirlenmesi nedeni ile çalışmalar alternatif katalizörler üzerine veya bu metalin alaşımlarının hazırlanması üzerine yoğunlaşmıştır. Literatür verileri bakır metalinin bu reaksiyonu alkali ortamda iyi katalizlediğini göstermiştir (Profeti ve ark., 2009). Chen ve ark., 2018; Zhang ve ark. 2017). Ancak, Cu'nun performansı ve zamanla kararlılığı pratik uygulamalar için yeterli değildir. Mo metali de yine oldukça iyi bir katalizördür.

Bu çalışmada Geçiş metallerinden Mo ve Cu metallerinin C yüzeyinde ikili alaşımları oluşturulmuş ve daha sonra Pt metaline alternatif olarak Au metali ile ikili alaşımın yüzeyi modifiye edilerek elektrotun katalitik etkisi daha da artırılmıştır. Anotun performansı 1 M CH<sub>3</sub>OH içeren 0,1 M KOH çözeltisinde elektrokimyasal teknikler ile incelenmiştir. Katalizörler yüzey karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

C elektrotların hazırlanması daha önceki çalışmamızda detaylı bir şekilde verilmiştir (Solmaz 2013). Özetle, 5mmx10mmx10mm boyutlarında kesilmiş C örnekler çalışma elektrotları olarak kullanılmıştır. Elektrotların ortalama ağırlığı ise 0,05 g'dır. Ölçümlerden önce bütün C örnekler saf su ile iyice yıkanmış, 2 saat saf suda tutulmuş ve sonrasında 105°C'de etüv içerisinde 12 saat beklettirilerek desikatörde muhafaza edilmiştir. C elektrotlar ölçümlere göre doğrudan veya ince bir Cu veya Mo film ile kaplanmış şekilde paslanmaz çelik tele geçirilerek çalışma elektrotu hazırlanmış ve ölçümlerde kullanılmıştır.

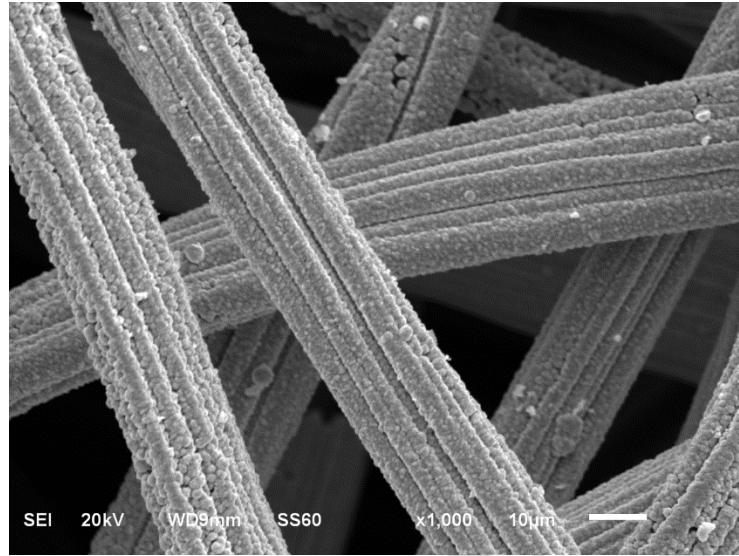
C yüzeyi özel olarak hazırlanmış kaplama banyosunda MoCu ile kaplanmıştır. Karşılaştırma amaçlı saf Cu veya Mo kaplanmış elektrotlarda da ölçümler yapılmıştır. Detaylar literatürde verilmiştir (Boylu, 2015; Işık, 2015). MoCu kaplı elektrotun yüzeyine daha sonra 60 s to 1 mM AuCl<sub>3</sub> + 0.1 M HCl içerisinde çözelti karıştırılarak bekletilmiş ve kimyasal yer değiştirme tekniği ile Au çöktürülmüştür. Elektrot daha sonra saf su ile yıkanarak azot gazı ile kurutulmuştur. Elektrotların yüzeyi elektrokimyasal ölçümlerden önce 1 M KOH çözeltisinde elektrokimyasal olarak temizlenmiştir.

Elektrokimyasal ölçümler üç elektrot tekniği ile bilgisayar kontrollü CHI 660 D Electrochemical Analyser cihazı ile yapılmıştır. Toplam 2 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip Pt levha anot, Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri ölçümleri 1 M CH<sub>3</sub>OH içeren 0,1 M KOH çözeltisinde oksijen ve hidrojen gazı çıkış potansiyelleri arasında 298 K'de yapılmıştır.

Elektrotların yüzeyleri Jeol 6510 marka taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile yapılmıştır. Yüzeyin kimyasal bileşimi ise aynı cihaza bağlı enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi (EDX) ile yapılmıştır.

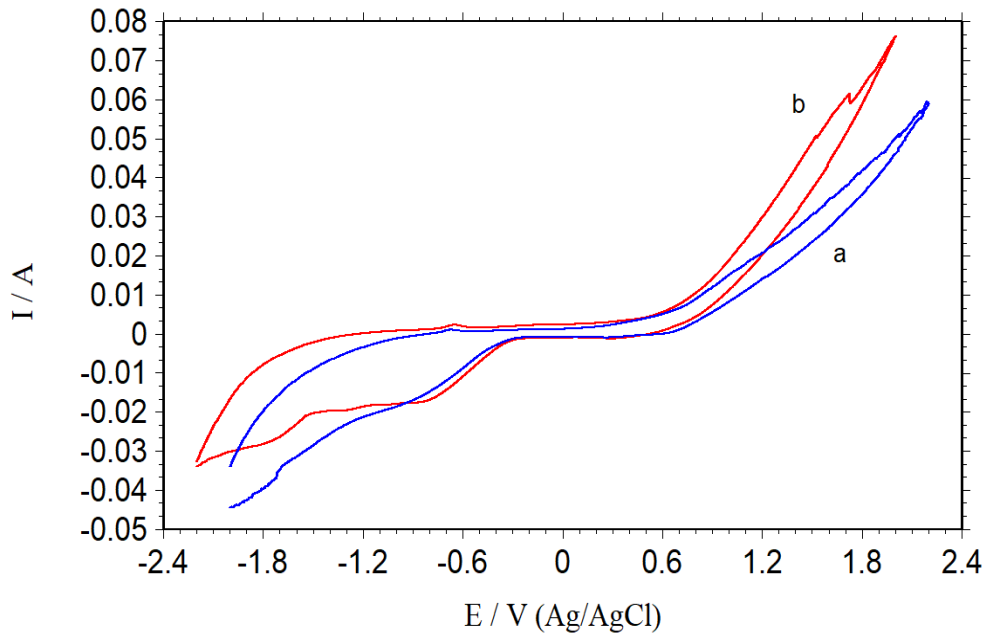
## BULGULAR ve TARTIŞMA

Au modifiye edilmiş MoCu kaplanmış C elektrotun yüzey görüntüsü Şekil 1'^de verilmiştir. Elde edilen SEM görüntüsünden açık bir şekilde görülebileceği gibi Yüzeyde oldukça kaliteli, yüzeye iyi tutunmuş ve geniş yüzey alanına sahip kaplamalar bu yöntem ile hazırlanabilmektedir. Au metali yüzeyde son derece homojen bir şekilde dağılmıştır. Kaplamadan sonra da C elektrot oldukça geniş boşluklardan oluşmaktadır. Bu yapı elektrokataliz için son derece uygundur.

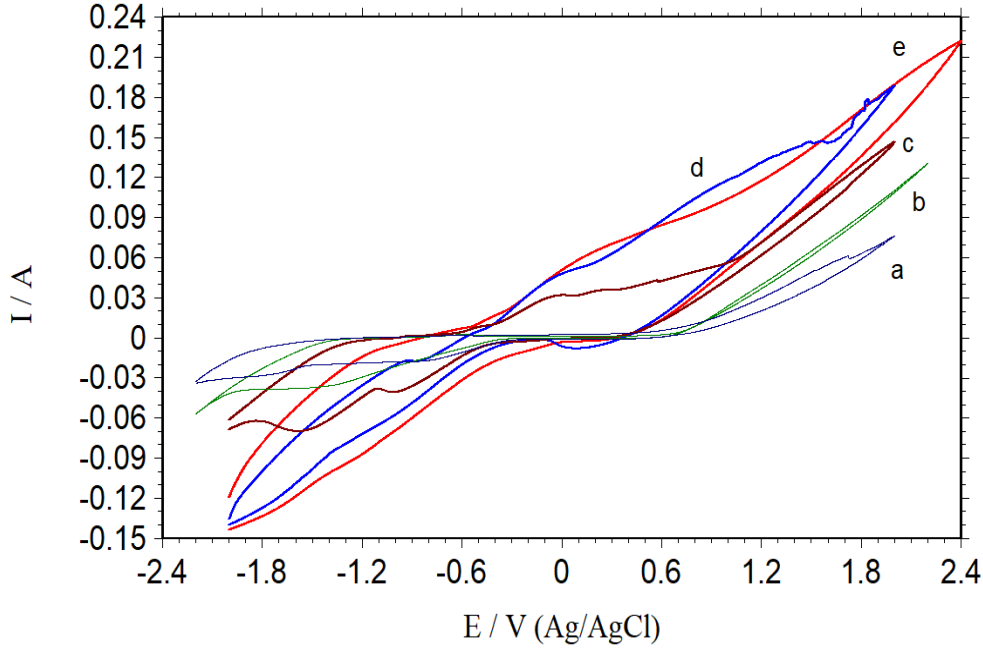


Şekil 1. C/MoCu-Au elektrotun SEM görüntüsü

C elektrot geniş boşluklar ve yüksek elektriksel iletkenlik gibi önemli avantajlara sahip olmakla birlikte yeterli elektrokatalitik etki göstermemektedir. Bu nedenle öncelikle C yüzeyi metal ile kaplanarak elektrokatalitik etkisi artırılmıştır. Karşılaştırma amaçlı olarak C elektrotta da ölçümler yapılmış ve alkol içeren ve içermeyen ortamlardaki dönüşümlü voltamogramlar (CV) Şekil 2’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Elde edilen eğriler incelendiğinde C elektrotun alkol içeren ortamda metanol oksidasyon pikinin oluşmadığı görülmektedir. Buna karşın alkolsüz ortamla kıyaslandığında gözlenen akım artışı bu bölgede alkolün yükseltgendini göstermektedir (Işık, 2015). Yine de C elektrot bu reaksiyon için yeterli katalitik etkiyi gösterememektedir (Döner 2012).



Şekil 2. C elektrotta 0,1 M KOH (a) ve 1 M CH<sub>3</sub>OH içeren 0,1 M KOH (b) çözeltilerinde 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar



**Şekil 3.** C (a), C/Mo (b), C/Cu (c), C/MoCu (d) ve C/MoCu-Au (e) elektrotlarda 1 M CH<sub>3</sub>OH içeren 0,1 M KOH çözeltisinde 50 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramlar

Au modifiye edilmiş elektrotun metanol elektrooksidasyonuna katalitik etkisi ikili MoCu ve Mo, Cu kaplanmış ve metal kaplanmamış C elektrotlar ile birlikte karşılaştırmalı olarak Şekil 3'te verilmiştir. Elde edilen bulgular kıyaslandığında, C yüzeyinin Mo veya Mo ile kaplanması durumunda metanol elektrooksidasyonuna katalitik etkisi artmaktadır. Bununla birlikte iki metalin bir arada kaplanması bu reaksiyonun hızını daha da arttırmaktadır. Bu artış iki metal arasında oluşan olası sinerjistik etki ve gerçek yüzey alanının artması ile açıklanmıştır. İkili kaplama üzerine çok az miktarda Au çöktürülmesi, elektrotun katalitik etkisini son derece hızlandırmakta, metanol oksidasyonuna karşılık gelen pik akımı son derece artmaktadır. Bu önemli artış, Au metalinin yüksek katalitik etkisi ile açıklanmıştır. Au metalinin çöktürme miktarı, çöktürme yöntemi gibi uygun çöktürme koşulları ile ilgili optimizasyon çalışmaları ve yüzeyin detaylı karakterizasyon işlemleri devam etmektedir.

## SONUÇ

Karbon keçe üzerine elektrokimyasal olarak son derece kaliteli, oldukça homojen ve yüzeye sıkı tutunmuş ikili MoCu kaplamalar elde edilmiştir. Bu ikili kaplamaların kimyasal yer değiştirme yöntemi ile homojen dağılımlı Au çöktürülmüştür. Elektrokimyasal ölçümler, metal çöktürme ile C'nin metanol oksidasyonuna katalitik etkisinin arttırılabileceğini göstermiştir. İkili kaplamalarda bu reaksiyonun hızı artmıştır. Au modifiye edilmesi ile bu reaksiyon için son derece katalitik etkiye sahip kompozit elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, yüksek katalitik etki ve ucuz olması nedeni ile C/MoCu-Au doğrudan metanollü yakıt pillerinde anot olarak önerilmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve karakterizasyon işlemleri için Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvara teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Yan B, Xu H, Zhang K, Li S, Wang J, Shi Y, Du Y 2018. Cu assisted synthesis of self-supported PdCu alloy nanowires with enhanced performances toward ethylene glycol electrooxidation. Applied Surface Science, 434: 701–710.

- Poochai C, Veerasai W, Somsook E, Dangtip S 2015. The influence of copper in dealloyed binary platinum–copper electrocatalysts on methanol electrooxidation catalytic activities. *Material Chemistry and Physics*, 163: 317-330.
- Döner A, Kadaş G 2015. A novel, effective and low cost electrocatalyst for direct methanol fuel cells applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40: 4840 – 4849.
- Jafarian M, Haghghatbin MA, Gobal F, Mahjani MG, Rayati SJ 2011. A comparative investigation of the electrocatalytic oxidation of methanol on poly-NiTCPP and poly-TCPP/Ni modified glassy carbon electrodes. *Electroanalytical Chemistry*, 663: 14 – 23.
- Yang X, Liu X, Meng X, Wang X, Li G, Shu C, Jiang L, Wang C 2013. Self-assembly of highly dispersed Pt and PtRu nanoparticles on perylene diimide derivatives functionalized carbon nanotubes as enhanced catalysts for methanol electro-oxidation. *Journal of Power Sources*, 240: 536 – 543.
- Huang Y, Cai J, Zheng S, Guo Y 2012. Fabrication of a high-performance Pb–PtCu/CNT catalyst for methanol electro-oxidation. *Journal of Power Sources*, 210: 81 – 85.
- Profeti LPR, Profeti D, Olivi P 2009. Pt–RuO<sub>2</sub> electrodes prepared by thermal decomposition of polymeric precursors as catalysts for direct methanol fuel cell applications. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 2747-2757.
- Chen G, Pan Y, Lu T, Wang N, Li X 2018. Highly catalytical performance of nanoporous copper for electro-oxidation of methanol in alkaline media. *Materials Chemistry and Physics*, 218: 108–115.
- Zhang K, Xiong Z, Li S, Yan B, Wang J, Du Y 2017. Cu<sub>3</sub>P/RGO promoted Pd catalysts for alcohol electro-oxidation. *Journal of Alloys and Compounds*, 706: 89-96.
- Solmaz R 2013. Electrochemical preparation and characterization of C/Ni–NiIr composite electrodes as novel cathode materials for alkaline water electrolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38: 2251-2256.
- Boylu S, Cu-Mo çöktürülmüş karbon keçe elektrotların hazırlanması, karakterizasyonu ve hidrojen gazı üretimine katalitik etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl, 2014.
- Işık M, Doğrudan metanollü yakıt pillerinde kullanılmak üzere bakır içerikli anot malzemelerinin geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl, 2015.
- Döner A, Nikel Kadmiyum kaplı grafit elektrotta metanol oksidasyonunun araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana 2012.

## Siyah çayda bulunan eser Fe(III), Cu(II), Ni (II), Zn(II), Pb(II) and Se(IV) elementlerin diferansiyel puls polarografisi ile tayini

Şükrü Kalaycı\*, Güler Somer

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu yazar e –mail: skalayci@gazi.edu.tr

### Özet

Bu çalışmada çayda bulunan eser elementlerin tespiti için yeni ve basit bir polarografik yöntem kurulmuştur. Asitlerle sindirimden sonra çay numuneleri, EDTA varlığında veya yokluğunda farklı pH değerlerinde asetat ve amonyak gibi çeşitli elektrolitler kullanılarak analiz edildi. Böylece, bir çay numunesindeki 6 iz elementin belirlenmesi için en iyi ortamın seçilmesi mümkün olmuştur. Polarografik bakır ve demir tepe noktaları, EDC varlığında HAc'da yaklaşık pH = 7'de ayrılabilir ve miktarları belirlenir. Ni ve Zn tepe noktaları yaklaşık pH = 10'da amonyak tamponunda ayrılabilir ve belirlenebilir. Kurşun pH = 2 HAc elektrolitinde belirlenebilir.

Selenit, KCl'deki hidrojen katalitik pikinden, Mo (VI) varlığında pH = 2 ortamdan belirlendi. Siyah çay içindeki eser element aralıkları Fe 35 µg / g, Cu 45 µg / g, Ni 19 µg / g, Zn 22 µg / g, Pb 28 µg / g ve Se 77 µg / g olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Kurutulmuş siyah çay, element tayini, eser elementler, DP polarografisi

### Giriş

Çayın dünya literatürün de tıbbi bir bitki olarak kabul edilmesi, sağlığa yararından kaynaklanır. İnsanlar binlerce yıl önce de çayın insan sağlığına yararlı olduğuna inanıyorlardı. Çayın yararlarına ilişkin bu inançlardan çoğu günümüzde bilimin ışığında da kanıtlanmış durumdadır. Çayın yararları şunlardır:

Çayın ateşi düşürdüğü ve baş ağrılarını giderdiği yolunda çok eskiden beri süregelen inanç, çayda bulunan kafeinin beyin ve derideki kılcal damarları genişletmesi ile açıklanıyor.

Son dönemde yapılan araştırmalar sayesinde çayın, içerdiği antioksidanlar aracılığıyla deri, meme, mide kanserine yakalanma riskini azalttığı biliniyor.

Taze olarak demlenip hemen tüketildiğinde, doku sertleşmesini tedavi ettiği ve damar sertliğine iyi geldiği bilinmektedir. Susuzluğu gideren çay, karaciğerin de temizlenmesine ve yenilenmesine yardımcı olur.

### MATERYAL VE METOT

#### Cihaz

Polarografik çalışmada 'PAR Model 174A Polarographic analyzer' cihazı kullanılmıştır. Bu cihaza damla süresini ayarlayan 'PAR mercury drop timer' bağlıdır. Referans elektrot olarak doymuş karomel elektrot (Hanna HI 5412), karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanılmıştır. Polarogramlar Linseis LY 1600 X-Y kaydedicisi (Linseis, Selb, Germany) ile kaydedilmiştir.

#### Numunenin Çözme İşlemi

Numune 110 0C'de sabit tartıma getirildi. Çay örneklerinden 1'er g tartılıp, 15 ml derişik HNO<sub>3</sub> ilavesiyle 1 hafta bekletildi. Bek alevinde yaklaşık 1 ml numune kalıncaya kadar uçuruldu. Çözülen numune 10 ml'lik balon jöjeye alınarak saf su ile 10 ml'ye seyretildi.

Öte yandan selenit tayini için HNO<sub>3</sub> asidinin buharlaştırılmasından sonra, yaklaşık 2 mL HCl ilave edilmek zorundaydı ve bir kez daha buharlaştırılarak selenatın selenite indirgenmesi için bir kez daha buharlaştırıldı; Somer 2000; Somer ve Kalaycı 2015). Burada, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün çözme işlemi için kullanılmadığından, Pb'nin PbSO<sub>4</sub> formasyonu tehlikesi olmadan tespit edilebileceği belirtilmelidir (Somer ve ark. 1985).

## Polarografik Tayin

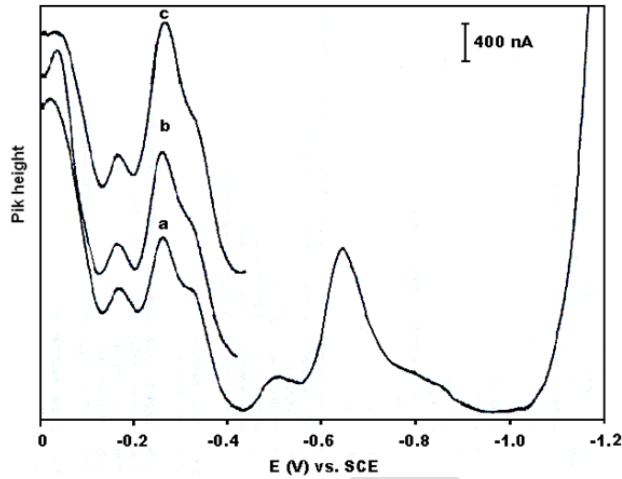
15 ml elektrolit polarografi hücresine kondu ve saf N<sub>2</sub> gazı (99.999%) 5 dakika süreyle geçirildi. 0.0 V ile – 1.4 V arasında 5mVs<sup>s</sup> 'lik tarama hızıyla potansiyel uygulanarak polarogram alındı. Sonra çay numunesinden eklendi ve polarogramı çekildi.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Demir ve Bakır Tayini

Polarografik yöntemlerde Fe (III) ve Cu (II) piklerini ayırmak o kadar kolay değildir. Bu pikler genellikle yaklaşık sıfır voltta üst üste biner. Bununla birlikte, bunların pikleri, kompleks yapıcı maddeler varlığında daha negatif potansiyellere kayabilir ve bunlar ayrılabilir. Bakır ve demir piklerinin, EDTA varlığında daha yüksek pH değerlerinde ayrılacağı bulundu. Pikleri ayırmak için EDTA kullanıldı.

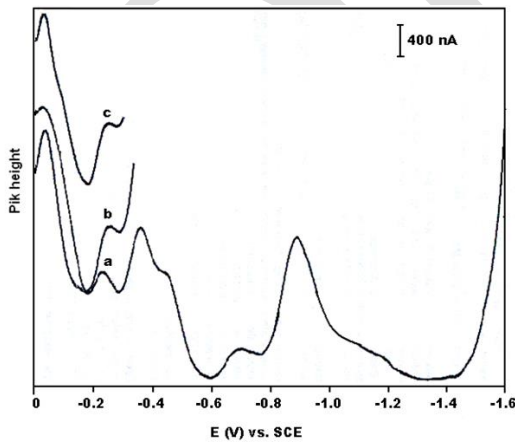
Cu (II) 'nin belirlenmesi, EDTA ve çay numunesi varlığında pH = 6.3, 1 M HAc / Ac elektrolitinde yapıldı. Şekil 1'den görülebileceği gibi, Cu (II) nin piki yaklaşık -3 V olarak görünmüştür ve standart ilavelere iyi cevap vermiştir. Bakır içeriği % 90 güven aralığı N = 4 için  $45 \pm 3 \mu\text{g} / \text{g}$  olarak bulundu.



- a) 12 mL 1 M HAc + 3mL 0.1M EDTA + 0.4mL numune (pH =6.24)
- b) a+ 0.1mL 10<sup>-3</sup> M Cu(II)
- c) b+ 0.1 mL10<sup>-3</sup> M Cu(II)

Şekil 1. Cu (II) Tayini

Fe (III) 'ün tespiti, EDTA ve çay numunesi varlığında, pH'da yaklaşık 7.0'da 1 M HAc / Ac elektrolitinde yapıldı. Görülebileceği gibi, Fe (III) zirvesi, pH = 7, Şekil 2'de yaklaşık -0.20 V idi ve bu nedenle Cu (II) ve Fe (III) zirveleri bu ortamda ayrılabilir. Fe (III) içeriği, standart ilaveler ile -0.20 olan tepe noktası kullanılarak belirlendi ve bulunan sonuç, % 90 güven aralığında N = 3 olan  $35 \pm 3 \mu\text{g} / \text{g}$  idi.



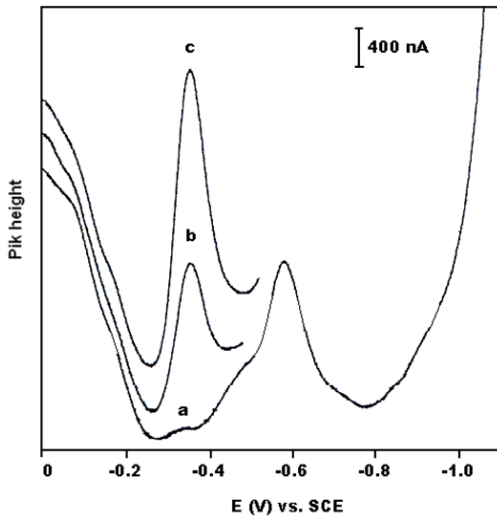
- a) 15 mL 1M HAc + 3 mL 0.1M EDTA + 0.4 mL numune (pH= 7.02)
- b) 0.1 mL 10<sup>-3</sup> M Fe(III)
- c) 0.1 mL 10<sup>-3</sup> M Fe(III)

Şekil 2. Fe(III) Tayini

## Kurşun Tayini

Kurşun, EDTA ilave edilmeksizin 15 mL 1 M HAc (pH = 2) elektrolit içinde yapıldı. EDTA varlığında daha yüksek pH değerlerinde, Pb (II) pik, çok daha yüksek negatif potansiyelde idi ve küçüktü, bu da tayinini zorlaştırdı. Pb (II) pik, 1 M HAc / Ac (pH = 2) koşullarında en büyük olduğu için, bu ortam tayin için kullanılmıştır. Ancak, burada önceki çalışmalarımıza göre (İnam ve Somer 1998), Pb (II) 'nin selenit, Se (IV) varlığında intermetalik bileşik oluşturabildiğini belirtmek zorundayız. Bu nedenle, Se (IV) oluşumundan korunmak için sindirim için HCl kullanmamak çok önemlidir. Se (IV) ve Pb (II) arasındaki bu girişim nedeniyle, doğru sonuçlar alınamıyor. Bununla birlikte, çözme işleminde HCl kullanılmadan yapılırsa, Se (VI) 'nın oluşturduğu Se (IV)' e indirgenemeyeceği için sorun olmaz.

Yukarıda verilen koşullar altında, çözme işleminde HCl eklenmemişse (HAc, pH = 2) kurşun içeriği, standart ilavelerle yaklaşık -0.35 V Şekil.3'te pikten saptanabilir ve bulunan sonuç  $28 \pm 2 \mu\text{g} / \% 90$  (CI) ve N = 4 için g.

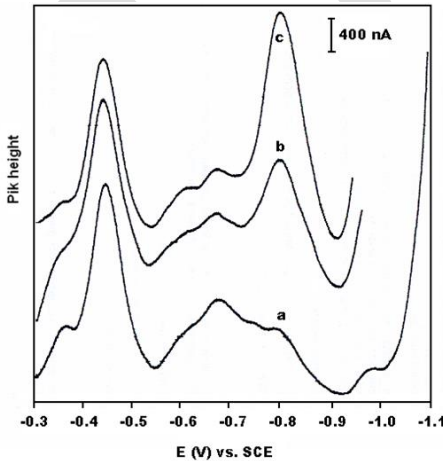


- a) 15 mL 1 M HAc +  
0.4 mL sample (pH= 2.1)  
b) a + 0.1 mL  $10^{-3}$  M Pb(II)

Şekil 3. Pb (II) Tayini

## Nikel ve Zn Tayini

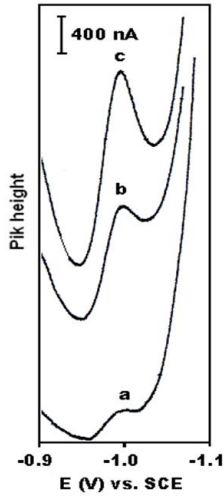
HAc tamponunda, Ni ve Zn, daha yüksek pH değerlerinde bile iyi bir şekilde ayrılamazlar, ancak yaklaşık pH 10'da amonyak tamponunda, pik tepeleri iyi bir şekilde ayrılır. pH = 9.8 olan 1 M  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$  ortamında, çay numunesi varlığında, Ni (II) zirve -0.8V idi ve Zn (II) piki -1.1V idi. Bu ilave değerden Ni (II) miktarı standart ilavelerle -0.8V, Şekil 4'te tespit edilmiş ve sonuç% 90 (CI) ve N = 4 için  $19 \pm 1 \mu\text{g} / \text{g}$  olarak bulunmuştur.



- a) 15 mL  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$  + 0.4 mL numune (pH = 9.8)  
b) a + 0.1 mL  $10^{-3}$  M Ni(II)  
c) b + 0.1 mL  $10^{-3}$  M Ni(II)

Şekil 4. Ni (II) Tayini

Zn'nin belirlenmesi için, amonyak tamponu pH = 10 kullanıldı. Şekil 5'den görülebileceği gibi, çinko yaklaşık -1.1 V'de gözlenmiştir. Zn içeriği bu tepe noktasından kesin olarak tespit edilebildi ve bulunan sonuç% 90 (CI) ve N = 4 için  $22 \pm 3 \mu\text{g} / \text{g}$  idi.

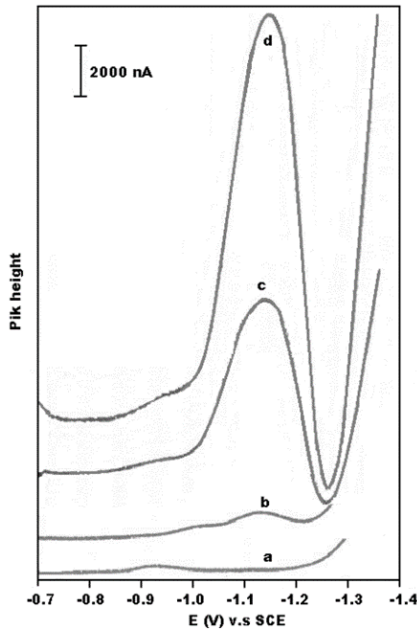


- a) 15 mL NH<sub>3</sub>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + 0.4 mL numune (pH = 9.8)
- b) a + 0.1 mL 10<sup>-3</sup> M Zn(II)
- c) b + 0.1 mL 10<sup>-3</sup> M Zn(II)

Şekil 5. Zn (II) Tayini

### Selenyum Tayini

Selenit tayini için, siyah çayın çözülmesi HCl varlığında yapılmak zorundaydı. Böylece selenatın HNO<sub>3</sub> ile çözülmesi sırasında oluşan selenite indirgenmesi mümkün olmuştur. Bu adım, selenit tayini için bizim tarafımızdan geliştirilen hidrojen katalitik pik oluşumunu kullanabileceğimiz için önemlidir (Inam ve Somer 2000). Bu yöntemle çok düşük selenit konsantrasyonlarını belirlemek mümkündür. Bu tür bir katalitik hidrojen pik, selenit varlığında yüksek konsantrasyonda Mo (VI) ilavesiyle elde edilebilir. Şekil 6'dan görülebileceği gibi, bu tepe heteropol asidi oluşturmak üzere Mo (VI) ilavesinden sonra yaklaşık -1.2 V'de oluşturulmuştur. Selenit konsantrasyonu, standart 10<sup>-5</sup> M selenit eklendikten sonra bu pikten belirlenebilir. Bulunan sonuç% 90 (CI) ve N = 4 için 77 ± 6 µg / g idi.



- a) 10mL KCl/ HCl (pH=2)
- b) + 0.2 mL sample
- c) + 0.5mL 10<sup>-3</sup> M Mo(VI)
- d) + 1.6 mL 10<sup>-5</sup> M Se(IV)

Şekil 6. Se (IV) Tayini

### SONUÇ VE TARTIŞMA

İnsan beslenmesinde kullanılan bitkiler gerekli unsurlar için en önemli kaynaktır. Bunlar arasında, çeşitli çaylar, sebzeler, bütün yıl boyunca yüksek miktarlarda kullanılan kuru üzüm. Türkiye'de çay büyük miktarda alkolsüz içecek olarak, dünyada da yüksek miktarlarda alkolsüz içecek olarak kullanılır. Mineralleri ve vitamin içeriği nedeniyle önemli bir içecektir.



Doğal bir numunede elementleri ve miktarlarını belirlemek kolay değildir çünkü kompozisyon başlangıçta bilinmemektedir. DP polarografi ile sorunlar kolayca çözülebilir. Bunun için, önce sindirilen numunelerin polarogramlarının çeşitli elektrolitlerde ve pH'da alınması gerekir. Her bir eleman için polarogramlardaki tepe noktaları standart ilavelerle tanımlanabilir. Elektrolit ve pH değiştirilerek olası üst üste binme ve parazitler ortadan kaldırılabilir. Bu adımlardan sonra, numunedeki her bir elemanın belirlenmesi için bir fikir edinilecektir.

Bu araştırmada çay yapraklarındaki iz elementlerin tayini için DP polarografik yöntem kurulmuştur. Sindirim prosedürü sırasında kayıplar ve girişimler en aza indirilecek şekilde özen gösterilmiştir.

Sindirimden sonra Cu, Fe, Ni, Zn, Pb ve Se gibi elementlerin yüksek hassasiyetle belirlenmesi mümkün olmuştur. Önerilen bu yöntem birçok biyolojik örnek için güvenle uygulanabilir.

## KAYNAKLAR

- İnam R, Somer G (1998) An Unusual polarographic behavior of Selenite in the Presence of some Cations, *Analytical Sciences*, 14; 399.
- İnam R, Somer G (1998) Simultaneous determination of selenium and lead in whole blood samples by differential pulse polarography, *Talanta*, 46; 1347.
- İnam,R, Somer G (1999) Determination of selenium in garlic by cathodic stripping voltammetry, *Food Chem.* 66; 381.
- İnam R, Somer G (2000) An unusual polarographic behavior of selenite in the presence of some cations, *Food Chem.* 69; 345.
- Somer G, Özyörük G, Green ME (1985) Determination of trace heavy elements in air particulates by differential-pulse polarography, *Analyst* 110; 151.
- Somer G, Kalaycı Ş (2015) A New and Simple Method for the Simultaneous Determination of Fe, Cu, Pb, Zn, Bi Cr, Mo, Se, and Ni in Dried Red Grapes Using Differential Pulse Polarography, *Food Analytical Methods*, 8; 604.

## Siyah Çayda bulunan İyodür ve Florürün İyodür ve Florür Seçici Elektrotlar ile Tayini

Şükrü Kalaycı\*<sup>1</sup>, Güler Somer<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>Gazi Üniversite, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, Türkiye

\*skalayci@gazi.edu.tr

### Özet

Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen çayın, içecek olarak tüketimi oldukça fazladır. Bu bölgede sıklıkla rastlanan guatr hastalığı, iyodür eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Dişlerin sağlığı için florürün önemi büyüktür. Bu nedenle biz de çalışmamızda bu bölgede çok tüketilen siyah çayda bulunan iyodür ve florürü, iyodür ve florür seçici elektrotlar ile ölçmek istedik.

Karadeniz bölgesinden alınan çay örnekleri sabit tartıma kadar kurutuldu. Yaş yakma metodu ile çözünür hale getirildi. Seyreltilerek içerisindeki iyodür ve florür iyonları tayin edildi. İyon değiştirici, PVC ve plastikleştiriciden oluşan elektrotumuz  $10^{-5} - 10^{-1}$  M iyodüre karşı 59 mV duyarlılık göstermektedir. Kalsiyum florür ve az çözünen gümüş tuzlarından oluşan elektrodumuz ise  $10^{-5} - 10^{-1}$  M florüre karşı 28 mV duyarlılık göstermektedir. Başka hiçbir anyon ve katyona duyarlı olmayan elektrotlarımızla iyodür ve florür ölçümleri yapılabilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Siyah çay, Tayin, Florür, İyodür, Seçici Elektrot

### GİRİŞ

Dünyada diş çürüğünü önlemede en yaygın olarak kullanılan koruyucu sağlık yöntemi florür alımıdır. Dişler için gerekli florür kaynağı ise içme sularıdır. Sulardaki florür miktarı tayini bu açıdan çok önemlidir. Bu amaçla kullanılan florür elektrotları hem azdır ve hem de çok pahalıdır.

İyot eksikliğinin yol açtığı hastalıkların en yaygınlarından biri basit guatrdır. Özellikle dağlık bölgelerde ve denizden uzak bölgelerde yaşayan insanlarda görülür. Deniz kıyılarında yaşayanlarda çok ender rastlanır. Eksikliği orta derecedeyse tiroid bezi normal miktarlarda hormon sentezlemek için daha fazla çalışır; böyle durumlarda guatr oluşmasını karşı bireyin sağlığı bozulmamış olabilir.

Bu amaçla Karadeniz Bölgemizde yetişen çayda bulunan iyodür ve florür miktarını iyon seçici elektrotlar ile tayin etmek istedik.

İlk iyodür seçici elektrot, 1961'de Pungor ve Hollos (Pungor ve ark. 1961) tarafından gümüş iyodür ve bunların parafilmli kullanılarak hazırlandı. Bu elektrotu Macaristan'daki maden sularında bulunan iyodid tayini için kullandılar. Aynı zamanda, kükürt dioksitin belirlenmesi için, SO<sub>2</sub> gazı iyot çözeltisi yoluyla atlamak için direkt olarak kullanıldı ve bu elektrot ile biçimlendirilen iyodür belirlendi. 1971 yılında, bir ömrü 35 gün olan bir AgI- Ag<sub>2</sub>S katı hal elektrotu hazırlandı (Ruzicka ve ark. 1971). Bu elektrot Budirmir ve Momir (Budirmir ve ark. 1987) tarafından alkollü içeceklerde siyanürün belirlenmesinde kullanıldı. Son on yılda, Nernst'e uygun eğimiyle karmaşık taşıyıcılara sahip bazı PVC membran elektrotları geliştirilmiştir (Amrani ve ark. 1996; Ying ve ark. 1997). Bazı katı hal iyodür elektrotlar, titrimetrik yöntem kullanılarak cıva tayini için kullanılmıştır (Overman ve ark. 1971; Somer 1981). Zehirli bir element olarak, cıva tespitinde çok önemlidir. Bununla birlikte, tayin edilmesi az miktarlarında olduğunda o kadar kolay değildir. Sıvı halde (Bailescu ve ark. 1976; Marin ve ark. 2000) ve bazıları katı halde (Van de Leest ve ark. 1977; Kopytin ve ark. 1979; Mazloum ve ark. 2000), bazıları da yanıt ve seçicilik problemleriyle birlikte, cıva cevabına sahip bazı elektrotlar önerilmiştir. İyon seçici elektrotların hazırlanmasında büyük boyutlu moleküllere sahip olan organik iyon değiştiriciler kullanılabilir. Ca iyon seçici elektrot için, organik fosfat iyon değiştiricili matris malzeme olarak PVC kullanılmıştır (Hobby ve ark. 1983). Kuaterner amonyum tuzları ile hazırlanan elektrotlar, çeşitli su örneklerinde nitrat iyonunun tayini için kullanılmaktadır (Davis ve ark. 1972; Brinkhoff 1978; Hopirtean ve ark. 1984). Aktif madde olarak QAD 86PI iyon değiştiriciyi kullanan bir selenit seçici elektrot hazırlandı ve selenit konsantrasyondaki 10 kat değişim başına 19 mV'lık bir eğim elde edildi (Ekmekçi ve ark. 2000).

Florür iyonu tespiti için, pratik ölçümler için muhtemelen en yaygın olarak kullanılan flüor iyon seçici elektrot olan LaF<sub>3</sub> membran elektrotu (Frant ve ark. 1966) geliştirilmiştir. Toryum, kalsiyum ve nadir toprak florürleri de uygun şekilde çözünmez olduğu için çalışma için kullanılmıştır (Macdonald ve ark. 1968). Bununla birlikte, bu florürlerin normal çökeltileri jelatinimsi olma eğiliminde olduğundan, çökeltme prosedürlerinin detaylı

araştırılması gerekli olmuştur. Yakın tarihli bir çalışmada (Bralic ve ark. 2001), LaF<sub>3</sub> membranlı ve paslanmaz çelik iç teması olan bir akışkan seçici elektrot hazırlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Cihaz

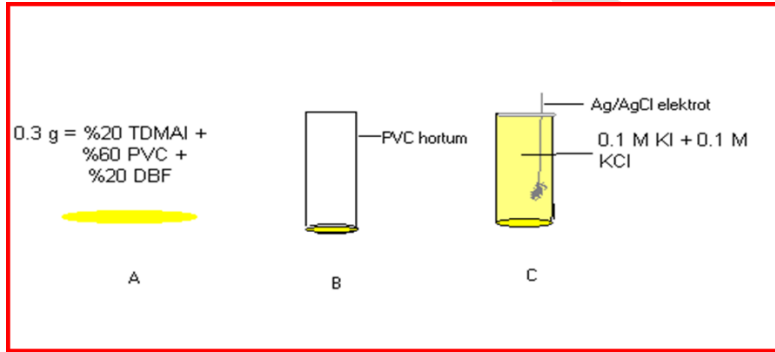
Elektrodumuzla potansiyel ölçümleri Jenway 1040 Ion Analizörü ile yapıldı. Karıştırıcı olarak Chiltern H531 ısıtıcılı karıştırıcı kullanıldı.

### Çalışma Ortamı

Ortamın iyonik şiddetini sabit tutmak amacıyla bütün çalışmalarda 0,1 M NaNO<sub>3</sub> kullanıldı. Çalışmalar oda sıcaklığında 22 ± 2 °C ' de yapıldı.

### İyodür Elektrodun Hazırlanması

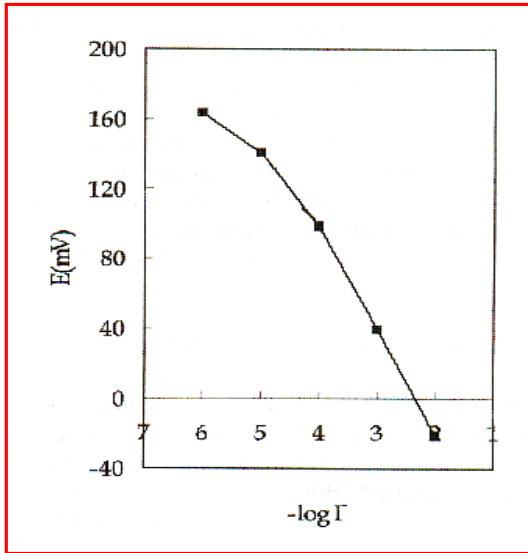
Toplam membran kütlesi 0.3 g olacak şekilde % 20 TDMAI,(tridodesilmetilamonyumiyodür) % 60 PVC, % 20 DBF capı 4.2 cm olan petri kabında 5 mL THF içerisinde çözünürleştirildi. Çözücüsünün uzaklaşması için 1 gün beklendi. Oluşan membran capı 1cm olan PVC hortuma PVC çözeltisi kullanılarak yapıştırıldı. Tekrar çözücüsü uzaklaşması için 1 gün bekletildi. Elektroda iç referans elektrodu olarak Ag/AgCl elektrodu ve referans çözeltisi olarak 0.1 M I ve 0.1 M Cl içeren çözeltiden 2 mL kondu. Elektrodun şartlanması için 10<sup>-4</sup> M iyodür çözeltisinde bekletildikten sonra ölçümlere geçildi.



Şekil 1. İyodür Seçici Elektrodun Hazırlanması

### İyodür Elektrodun [ I<sup>-</sup> ] Karşı Duyarlılığı

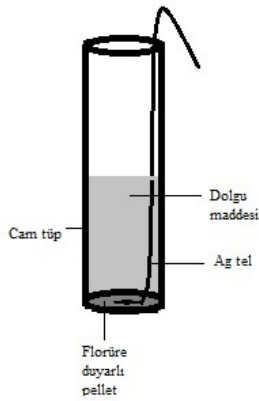
Hazırlanan İyodür seçici elektrot ile ortama 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-1</sup> M iyodürden 10 kat ilavelerdeki potansiyel değerleri kaydedildi ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu.



Şekil 2. İyodür Elektrodun Duyarlılığı

### Florür Elektrodun Hazırlanması

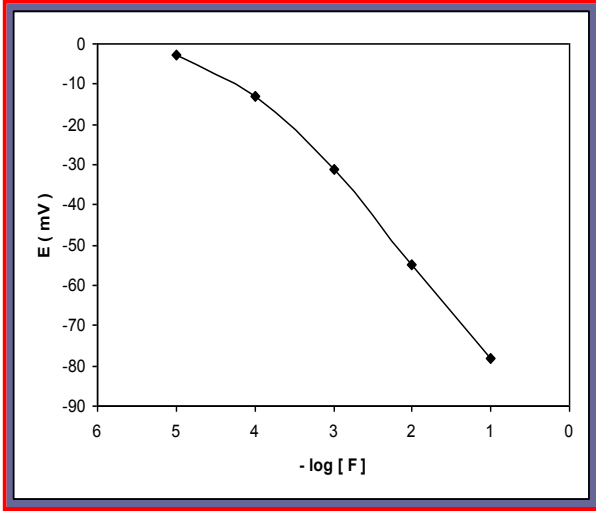
Toplam kütlesi 0.1 g % 70 Ag<sub>2</sub>S, % 10 Cu<sub>2</sub>S ve % 20 CaF<sub>2</sub> havanda ezildikten sonra hidrolik pres ile pellet haline getirildi. 7 mm çapındaki 0.1-0.3 mm kalınlığındaki pelletler cam tüpe içerisinde gümüş tel pelletlere temas edecek şekilde epoksi reçine ile yapıştırıldı. Reçinenin kuruması için bir gün bekletildi.



Şekil 3. Florür Elektrodun Hazırlanması

### Florür elektrodun [ F<sup>-</sup> ] Karşı Duyarlılığı

Hazırlanan Florür seçici elektrot ile ortama 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-1</sup> M florürden 10 kat ilavelerdeki potansiyel değerleri kaydedildi ve kalibrasyon grafiği oluşturuldu.



Şekil 4. Florür Elektrodun Duyarlılığı

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### İyodür Elektrodun Özellikleri

- % 20 TDMAI,(tridodesilmetilamonyumiyodür) % 60 PVC, % 20 DBF oluşan elektrot eğim 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-1</sup> M I<sup>-</sup> e karşı 59 mV `dur.
- Toplam membran kütlesi 0.3g
- pH`ya karşı duyarlılık göstermektedir.
- SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> e karşı duyarlı olmadığı tespit edilmiştir.
- Ömrü 4 aydır.

#### Florür Elektrodun Özellikleri

- % 70 Ag<sub>2</sub>S, % 10 Cu<sub>2</sub>S ve % 20 CaF<sub>2</sub> elektrodun 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-1</sup> florüre eğimi 28 mV dur.
- pH 8`e kadar çalışılabilir.
- Sülfat, nitrat, fosfat ve klorür anyonlarıyla gümüş, sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum ve bakır kanyonlarına duyarlı olmadığı tespit edilmiştir.
- Ömrü 6 aydır.

#### Numunenin Çözme İşlemi

Numune 110 OC`de sabit tartıma getirildi. Çay örneklerinden 1`er g tartılıp, 15 ml derişik HNO<sub>3</sub> ilavesiyle 1 hafta bekletildi. Bek alevinde yaklaşık 1 ml numune kalıncaya kadar uçuruldu. Çözülen numune 10 ml`lik balon jojeye alınarak saf su ile 10 ml`ye seyretildi.

## SONUÇ

Çayda Tayini Yapılan İyonlar	Hazırlanan ISE İle Tayin Edilen Derişim (ppm)	Orion Marka ISE İle Tayin Edilen Derişim (ppm)
I <sup>-</sup>	21 ± 1,4	24 ± 1,2
F <sup>-</sup>	4,5 ± 0,7	6,2 ± 0,5

## KAYNAKLAR

- Bailescu GE, Cosgofret VV (1976) A liquid state Hg<sub>2</sub> sensitive electrode, *Talanta* 23, 677-678.
- Bralic M, Radic N, Brinic S, Generalic S (2001) Fluoride electrode with LaF(3)-membrane and simple disjoining solid-state internal contact, *Talanta* 55,581-586.
- Brinkhoff HC (1978) Analysis of the nitrate-content of surface water and effluent water. Application of a plastic-membrane nitrate-selective electrode in water quality monitors, *Environ. Sci. Technol.* 12, 1392-1395.
- Budirmir V, Momir SJ (1978) The application of the Ruzicka-type iodide- selective electrode for the determination of cyanide in alcoholic drinks, *Anal. Chim Acta* 190, 293-297.
- Davies JW, Moody GJ, Thomas JDR (1972) Nitrate ion selective electrodes based on poly(vinyl chloride) matrix membranes, *Analyst* 97, 87-94.
- Ekmekci G, Somer G (2000) Selenite-selective membrane electrodes based on ion exchangers and application to anodic slime, *Anal. Sci.* 16, 307-311.
- El Amrani FZ, Sastre A, Aguilar M, Beyer L, Florido A(1996) Iodide- selective electrodes based on the silver(I) complex of a novel N- thiocarbamoylimine-dithioether derivate, *Anal. Chim. Acta* 329, 247-252.
- Frant MS, Ross JW ( 1966) Electrode for sensing fluoride ion activity in solution, *Science* 154, 1553-1557.
- Hobby PC, Moody GJ, Thomas JDR (1983) Calcium ion-selective electrodes studies: covalent bonding of organic phosphates and phosphonates to polymer matrices, *Analyst* 108 , 581-590.

- Hopirtean E, Stefaniga E (1984) Analytical applications of a nitrate-selective liquid membrane electrode, *Rev. Chim.* 35, 945-950.
- Kopytin AV, Zhukov AF, Yu.I. Urusov, Kopytina LA (1979), Research and development of selective membrane electrodes. Determination of mercury(II) and thallium(III), *Zh. Anal. Khim.* 34 (3), 465-68.
- Marin P, Miranda M, Perez A, Valdivia L, Sanchez O, Chamaro A (2000) Mercury(II) ion-selective electrode. Study of 1,3-diphenylthiourea as ionophore, *Analyst* 125, 1787-1790.
- Mazloun M, Amini MK, Baltork IM (2000) Mercury selective membrane electrodes using 2-mercaptobenzimidazole, and 2-mercaptobenzothiazole, and hexathiacyclooctadecane carriers, *Sens. Actuators B* 63 (125), 80-85.
- Overman FR (1971) Potentiometric titration of mercury using the iodide-selective electrodes as indicator, *Anal. Chem.* 43, 616-617.
- Pungor E, Hollos R (1961) The use of membrane electrodes in the analysis of ionic concentrations, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 27, 63-67.
- Ruzicka J, Lamm CG (1971) New halide solid-state electrodes, *Anal. Chim. Acta* 54, 1-12.
- Somer G (1981) Determination of mercury in the presence of iron(III) by iodide ion selective electrode, *Anal. Chem.* 53, 2143-2144.
- Van de Leest RE (1977) Solid-state ion selective electrodes for metal ions, *Analyst* 102, 509-514.
- Yang X, Hibbert DB, Alexander PW (1998) Flow injection potentiometry by poly(vinyl chloride)- membrane electrodes with substituted azacrown ionophores for the determination of lead(II) and mercury(II) ions, *Anal. Chim. Acta* 372, 387-398.
- Ying M, Yuan R, Zhang XM, Song YQ, Li ZQ, Shen GL, Yu RQ (1997) Highly selective iodide poly(vinyl chloride) membrane electrode based on a nickel(II) tetraazaannulene macrocyclic complex, *Analyst* 122, 1143-1146.

## Fabrication of superhydrophobic surfaces on aluminum substrates by dip coating method

Sahra Dandil<sup>1</sup>, Cetin Karagol<sup>1</sup>, Muhammet Kayikci<sup>1</sup>, Buse Yagmur Kisacik<sup>1</sup>, Caglayan Acikgoz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bilecik Seyh Edebali University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department, Bilecik, Türkiye.

\*Corresponding author e-mail: caglayan.acikgoz@bilecik.edu.tr

### Abstract

In general, the wettability of a solid surface has great significance because of self cleaning, corrosion behavior, etc. and is strongly influenced by the chemical composition and its geometric structure. The wettability of a surface can be determined by the contact angle (CA) measurements. A hydrophilic surface can be described with the CA is lower than 90° and a hydrophobic surface can be described with the CA is higher than 90°. Superhydrophobic surface with high CA (> 150°) and low sliding angle (SA) has many potential applications in industries and daily life. The fabrication of superhydrophobic surfaces generally includes roughening and modification steps. In the experimental studies, aluminum plates (5 cm x 2 cm x 1 cm) were sanded using emery paper, and then cleaned by using acetone and ethanol in an ultrasonic bath. The clean aluminum surfaces were immersed in NaOH solutions at different concentrations. Finally the etched surfaces were modified with palmitic acid at ambient temperature for 1 h by dip coating and dried in an oven at 100°C for 1 h. The surface morphology of the coated surfaces was characterized by scanning electron microscopy (SEM-EDX). The superhydrophobicity of the surfaces was determined by CA measurements. The best result was obtained by 1 M NaOH concentration and modification by 0.05 M palmitic acid. The maximum CA value was obtained as 156.93 °.

**Keywords:** aluminum, palmitic acid, sodium hydroxide, superhydrophobic.

### INTRODUCTION

Wettability is the contact of a liquid with a solid substrate due to intermolecular interactions. The degree of the wetting is related to the adhesive and cohesive forces between liquid and solid (Yao et al., 2019). Depending on the balance between these two forces, a material becomes less wetted, more wetted, or not wetted at all. Water repulsion, water retention or hydrophobic property is related to the absence of liquids on the surface of solids. Wettability is characterized by the contact angle. When a liquid is dropped on a solid surface, it shows various angles between 0° and 180°. The contact angle relates to the properties of the interface between the liquid and substrate (Yao et al., 2019). A surface having a contact angle of less than 90 is called a hydrophilic or wetted surface, and a surface having a contact angle of 90 ° or higher is called a hydrophobic or non-wetted surface.

Due to its low specific gravity, high corrosion resistance, high electrical and thermal conductivity, aluminum has become one of the metals commonly used in industry. Aluminum's atomic number is 13, atomic weight is 26,982, melting at 660,323 °C, and symbol is Al (RSC, 2019). Depending on their application, superhydrophobic aluminium plates has great interest.

Surface coating is a process made by using coating methods in order to give a new feature to the surface of the main material. These methods can be listed as spin coating, sol-gel coating, thermal spray coating, dipping method and spraying method. Dip coating method is one of the most useful and efficient process for the production of coatings (Sahoo et al., 2018). It involves immersing a substrate in a coating solution and then lifting it vertically from the solution (ten Elshof, 2015). Some advantages of dip coating method can be listed as coating of sample in every shape and size, uniform thickness and economical coating of large amount of sample at the same time.

In this study, dip coating method was applied to obtain superhydrophobic coatings on aluminum surfaces. The obtained surfaces were characterized by SEM-EDX and CA.

### MATERIALS AND METHODS

The substrates used in the experiment were aluminum plates (5 cm x 2 cm x 1 mm). Aluminum plates were polished with silica paper of Grade (Nos. 800, 1500). Then the plates were cleaned ultrasonically in distilled water and acetone for 10 min and dried in an oven for 15 min. The cleaned aluminum alloy plates were immersed in 1 M and 2 M NaOH solutions for different times at room temperature. The samples were then



cleaned with deionized water ultrasonically and dried in an oven at 80 °C. And the dried aluminium plates were then immersed in a palmitic acid solution. The plates were cured for 1 h at 100 °C.

The morphologies of the surfaces were observed by a SEM. Water contact angle measurements were used to evaluate the superhydrophobicity of the aluminium surfaces.

## RESULTS AND DISCUSSION

Superhydrophobic properties were obtained on aluminum plates through acid etching method. As seen in the Fig. 1, the contact angle of uncoated aluminum plates were measured as 72.8°.

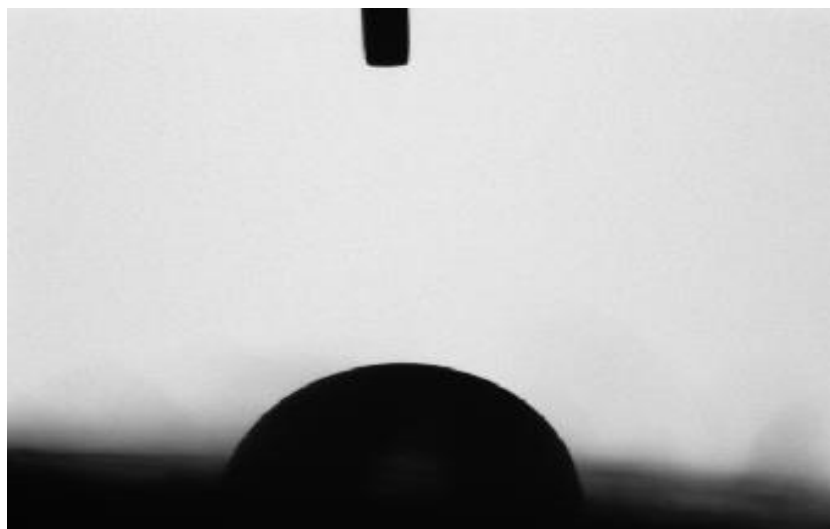


Fig 1. Contact angle of uncoated aluminum plates (72.8°)

The aluminum plates were modified by palmitic acid solution with different concentrations (0.01, 0.05) and the highest contact angle was obtained with 0.05 M palmitic acid solution (Fig. 2).

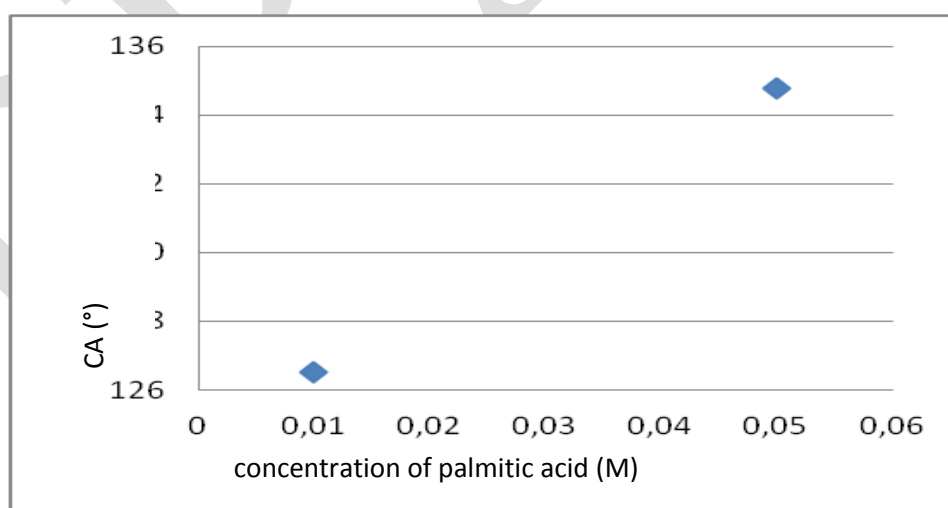


Fig. 2. Effect of palmitic acid concentration on contact angle of aluminum plates

As shown in Figure 3, the aluminum plates were etched by NaOH with various concentrations at different times (30 min, 60 min) and the best result was obtained for 1 M NaOH concentration and 60 min etching time.

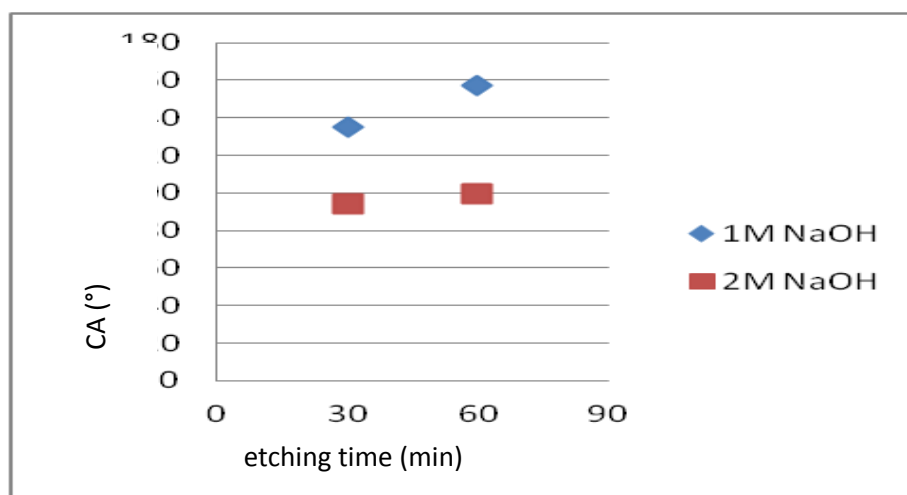


Fig. 3. Effect of different etching times with NaOH on contact angle

As given in Figure 4, the aluminium plates were polished with silica papers (Nos. 800 and 1500) and the best results were obtained with sandpaper with 800 mesh.

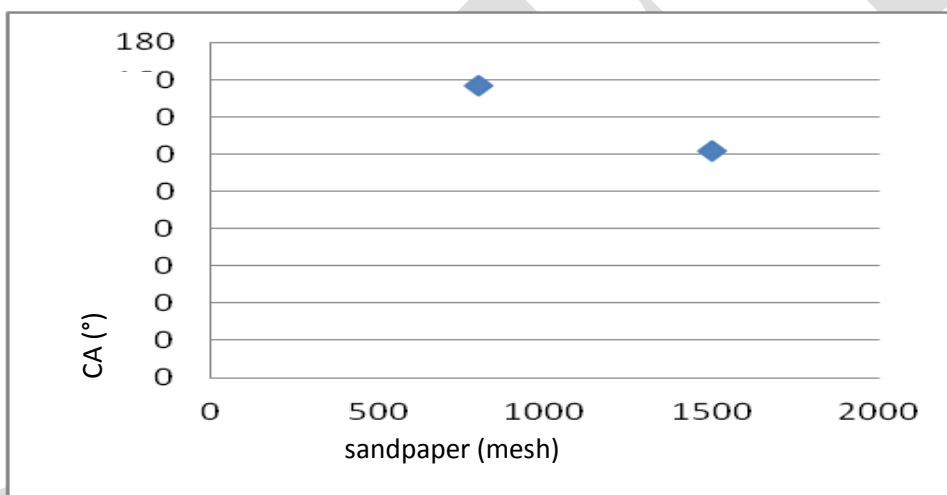


Fig. 4. Effect of sanding on contact angle

The highest contact angle was obtained as 156.48° by etching with 1 M NaOH for 60 min, 0.05 M palmitic acid modification for 60 minutes. The contact angle of the superhydrophobic surface produced by base etching was measured as 156.93°.

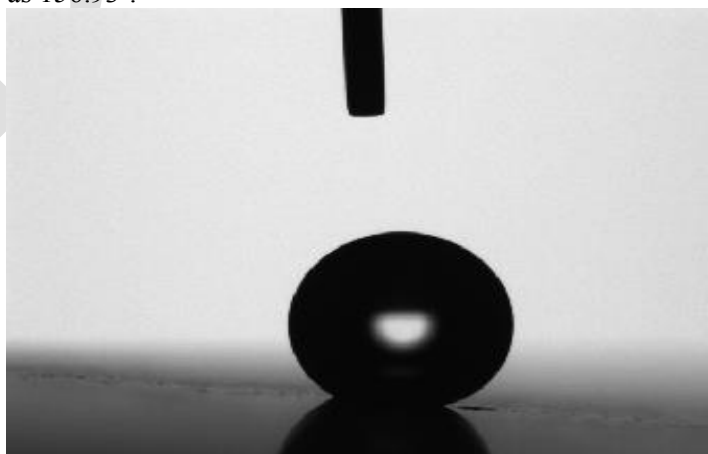


Fig. 5. Contact angle of the superhydrophobic surface obtained by base etching method

To confirm the roughness of the surfaces, the morphology of the superhydrophobic surfaces were showed by SEM. SEM-EDX image of the superhydrophobic surface obtained by acid etching method was given in Figure 6.

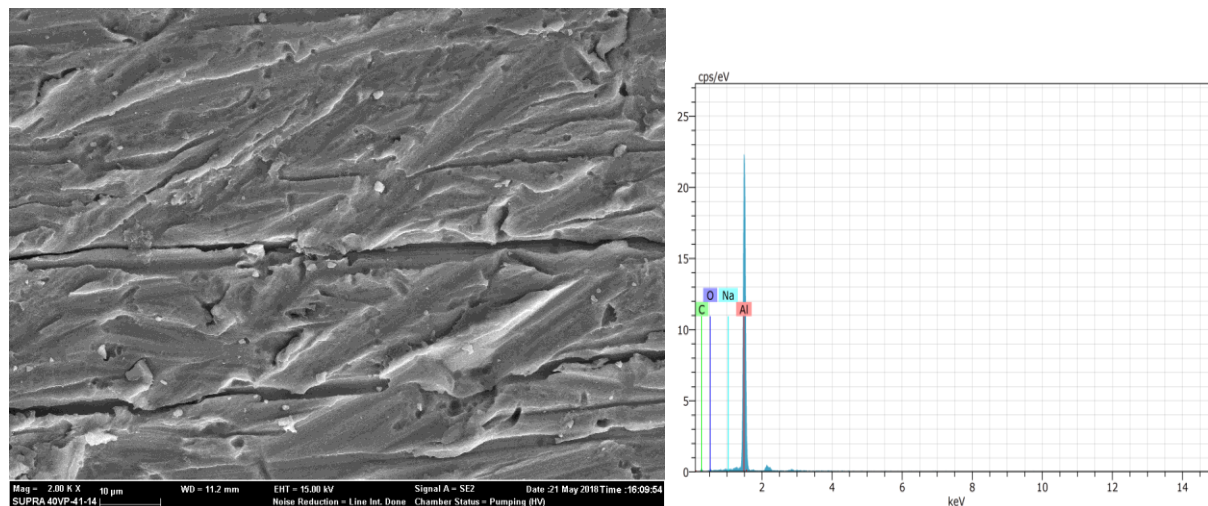


Fig. 6. SEM-EDX image of the superhydrophobic surface obtained by base etching method.

## CONCLUSION

In this study, superhydrophobic aluminum plates were obtained by dip coating method. The aluminum plates were etched by NaOH and modified by palmitic acid to produce a superhydrophobic coating on the aluminum surface. Various parameters such as sanding, etching time, concentration of etching agent and concentration of modification agent were investigated. The morphology and the superhydrophobicity of the synthesized surfaces was characterized by SEM-EDX analysis and CA measurements. The best superhydrophobicity was obtained by acid etching method with 1 M NaOH concentration and 60 min etching time and modification by 0.05 M palmitic acid for 1 h. As a result of CA measurements, maximum 156.93° value was obtained for coated aluminium surfaces. SEM image showed that the superhydrophobic aluminum surface.

## REFERENCES

- <http://www.rsc.org/periodic-table/element/13/aluminium>, 08.07.2019.
- Yao, H., Dai, Q., You, Z., Zhang, J., Lv, S., & Xiao, X. (2019). Evaluation of contact angle between asphalt binders and aggregates using Molecular Dynamics (MD) method. *Construction and Building Materials*, 212, 727-736.
- Sahoo, S. K., Manoharan, B., & Sivakumar, N. (2018). Introduction. *Perovskite Photovoltaics*, 1–24. doi:10.1016/b978-0-12-812915-9.00001-0.
- Ten Elshof, J. E. (2015). Chemical solution deposition techniques for epitaxial growth of complex oxides. *Epitaxial Growth of Complex Metal Oxides*, 69–93. doi:10.1016/b978-1-78242-245-7.00004-x.

## Improvement of superhydrophobic coatings on aluminum surfaces by acid etching method using phosphoric acid

Sahra Dandil<sup>1</sup>, Cetin Karagol<sup>1</sup>, Muhammet Kayikci<sup>1</sup>, Buse Yagmur Kisacik<sup>1</sup>, Caglayan Acikgoz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Bilecik Seyh Edebali University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department, Bilecik, Türkiye.

\*Corresponding author e-mail: caglayan.acikgoz@bilecik.edu.tr

### Abstract

Water repellency and self-cleaning properties are the most important characteristics for outdoor environment. The water contact angle (CA) of a surface is lower than 90°, the surface is described as a hydrophilic surface. In addition, a surface is higher than 90°, the surface is described as a hydrophobic surface. In superhydrophobic surfaces, CA is upper than 150° and the sliding angle (SA) is lower than 10°. They have attracted growing research attention, due to their important practical applications. In principle, superhydrophobic surfaces can be obtained by roughness of surface and reduction of surface tension. In this study, aluminum plates (5 cm x 2 cm x 1 cm) were polished with sandpaper. Then the plates were cleaned by sonication in acetone and ethanol. Afterwards, the cleaned aluminum surfaces were chemically etched by phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at different concentrations. Surface modification was done by dodecyltriethoxysilane at different concentrations and times. All these experiments were performed under atmospheric conditions. Finally coated samples were cured at 100°C for 1 h. The morphology of the synthesized surfaces was characterized by scanning electron microscopy (SEM-EDX). The superhydrophobicity of the surfaces was determined by CA measurements. The best superhydrophobicity was obtained by acid etching method with 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentration and modification by 0.01 M dodecyltriethoxysilane for 1 h. As a result of CA measurements, maximum 156.83° value was obtained for coated aluminium surfaces. SEM image showed that the etched aluminum surface.

**Keywords:** aluminum, dodecyltriethoxysilane, phosphoric acid, superhydrophobic.

### INTRODUCTION

When a liquid comes into contact with the surface, the angle formed between the liquid and the surface provides information about the surface's wetting behavior. The CA can be defined as the angle that a drop of liquid forms with the solid surface and is a measure of the wetting property of the liquid. If the CA of the water drop falling to the surface is less than 90°, this surface is defined as hydrophilic surface. If the CA measured between the water drop and the surface is greater than 90°, this surface is called a hydrophobic surface. A superhydrophobic surface refers to a surface whose CA for water is greater than 150° and SA is less than 10° (Chen et al., 2019).

The preparation and characterization of superhydrophobic surfaces and coatings is one of the most important research topics of recent years. They were employed in many areas, including self-cleaning, anti-icing, anti-bacterial applications, oil-water separation and corrosion prevention (Peng et al., 2018).

The wetting properties of a material depend on the chemical structure and the physical properties / roughness of the surface. The intense interest in superhydrophobic surfaces has led to the emergence of various methods for the preparation of these micro-nano double-scale surfaces. These methods include spin coating, sol-gel coating, thermal spray coating, dipping method and spraying method. The dip-coating method is an efficient and inexpensive and coating is easier from other methods (Rezayi et al., 2018).

One of many different materials to which superhydrophobic coatings can be applied is aluminum. It was discovered in 1825 by Danish Oersted (RSC, 2019). It was produced by Wöhler in 1845 for the detection of many properties in Germany. Its characteristics have attracted the attention of many scientists and many attempts have been made for its production. It's atomic number is 13, atomic weight is 26.982, melting at 660.323 °C, and symbol is Al. Aluminium has many applications including cans, foils, kitchen utensils, window frames, beer kegs and aeroplane parts. It's unique properties such as low density, is non-toxic, high thermal conductivity, excellent corrosion resistance and easily casting make aluminum one of the most important engineering materials of today (RSC, 2019).

In this study, chemical etching process was applied for superhydrophobic coatings on aluminum surfaces and surface modification was performed. The obtained surfaces were characterized by SEM-EDX and CA.

## MATERIALS AND METHODS

The substrates used in the experiment were aluminum plates (5 cm x 2 cm x 1 mm). Aluminum plates were polished with silica paper of Grade (Nos. 800, 1500). Then the plates were cleaned ultrasonically in distilled water and acetone for 10 min and dried in an oven for 15 min. The cleaned aluminum alloy plates were immersed in 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution for different times at room temperature. The samples were then cleaned with deionized water ultrasonically and dried in an oven at 80 °C. And the dried aluminium plates were then immersed in a dodecyltriethoxysilane solution. The plates were cured for 1 h at 100 °C.

The morphologies of the surfaces were observed by a SEM. Water contact angle measurements were used to evaluate the superhydrophobicity of the aluminium surfaces.

## RESULTS AND DISCUSSION

Superhydrophobic properties were obtained on aluminum plates through acid etching method. As seen in the Fig. 1, the contact angle of uncoated aluminum plates were measured as 72.8°.

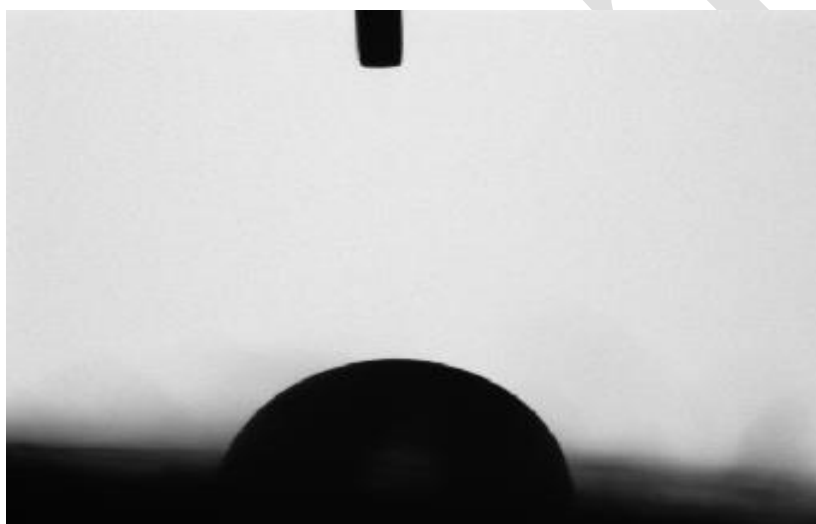


Fig 1. Contact angle of uncoated aluminum plates (72.8°)

The aluminum plates were modified by dodecyltriethoxysilane solution with different concentrations (0.01, 0.02, 0.05, 0.1) and the highest contact angle was obtained with 0.01 M dodecyltriethoxysilane solution (Fig. 2).

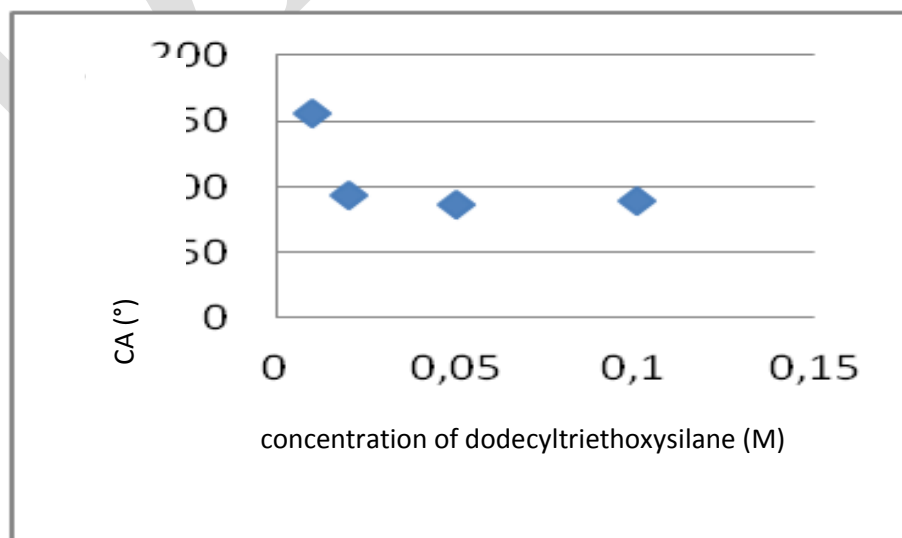


Fig. 2. Effect of dodecyltriethoxysilane concentration on contact angle of aluminum plates

As shown in Figure 3, the aluminum plates were modified by dodecyltriethoxysilane at different times (30 min, 60 min, 120 min) and the best result was obtained for 60 min.

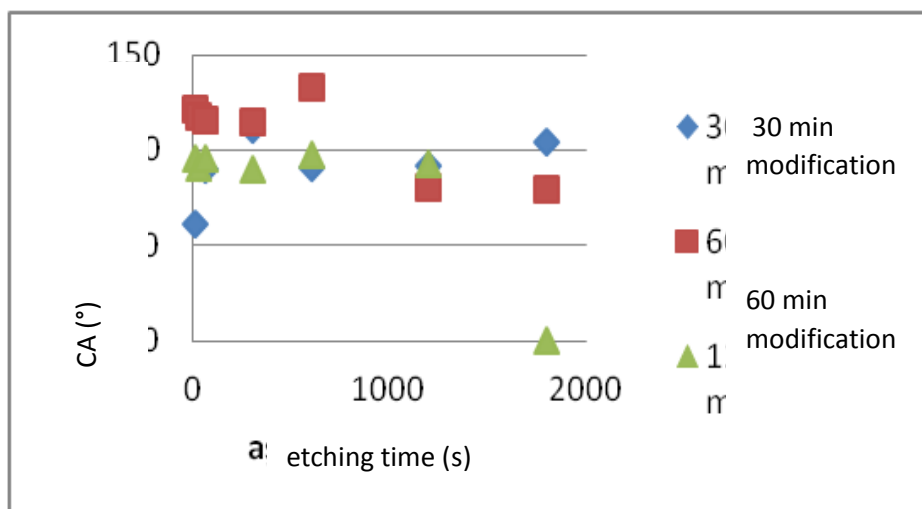


Fig. 3. Effect of different modification times with dodecyltriethoxysilane on contact angle value at different etching times

As given in Figure 4, the aluminium plates were polished with silica papers (Nos. 800 and 1500) and the best results were obtained with sandpaper with 800 mesh.

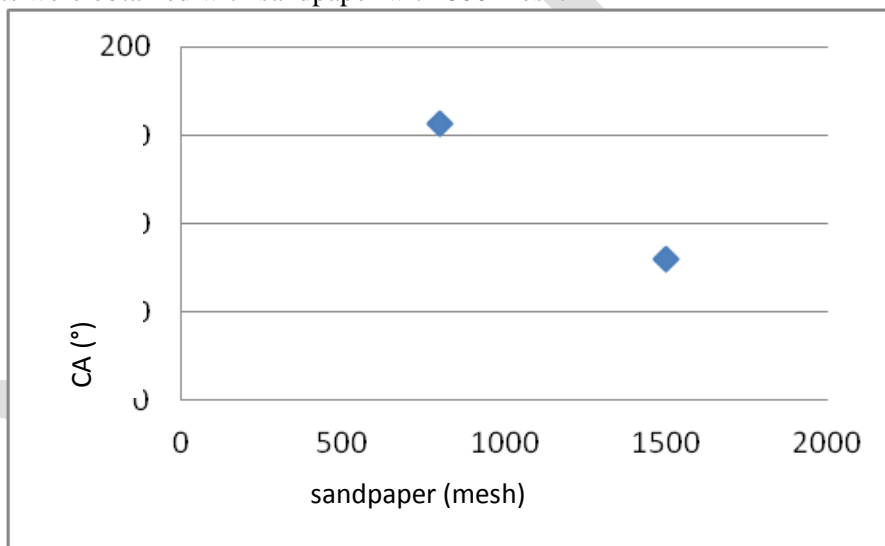


Fig. 4. Effect of sanding on contact angle

The highest contact angle was obtained as 156.48° by etching with %3 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> for 30 min, 0.01 M dodecyltriethoxysilane modification for 60 minutes.

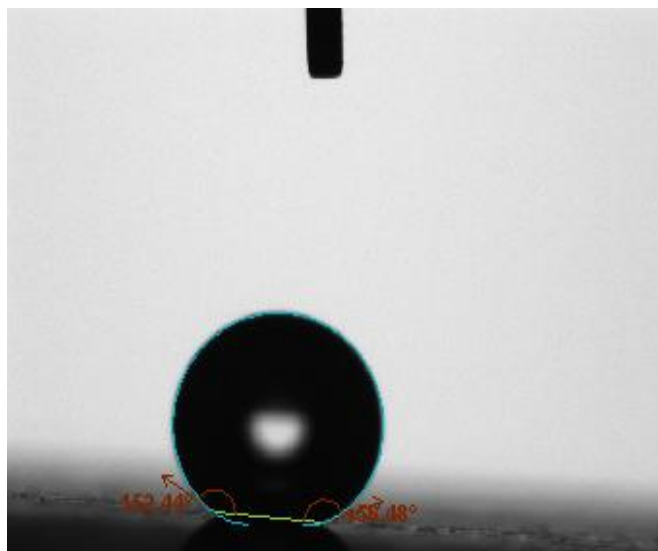


Fig. 5. Contact angle of the superhydrophobic surface obtained by acid etching method

To confirm the roughness of the surfaces, the morphology of the superhydrophobic surfaces were showed by SEM. SEM-EDX image of the superhydrophobic surface obtained by acid etching method was given in Figure 6.

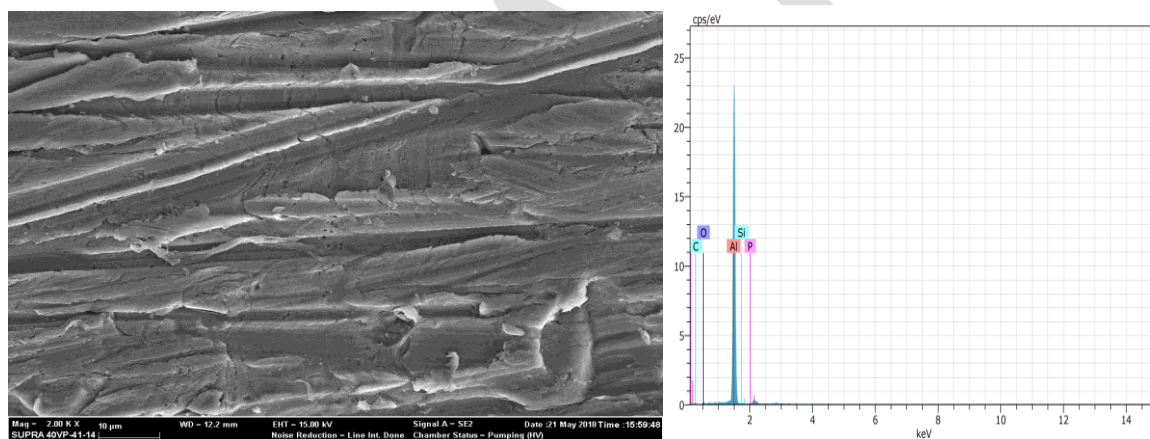


Fig. 6. SEM-EDX image of the superhydrophobic surface obtained by acid etching method.

## CONCLUSION

In this study, superhydrophobic coatings were obtained on aluminum plates by acid etching method. The aluminum plates were etched and modified to treat the aluminum surface. Various parameters such as sanding, etching time, concentration of modification agent and modification time were investigated. The morphology of the synthesized surfaces was characterized by SEM-EDX. The superhydrophobicity of the surfaces was determined by CA measurements. The best superhydrophobicity was obtained by acid etching method with 3%  $H_3PO_4$  concentration and modification by 0.01 M dodecyltriethoxysilane for 1 h. As a result of CA measurements, maximum  $156.83^\circ$  value was obtained for coated aluminium surfaces. SEM image showed that the resulting aluminum surface.

## REFERENCES

Chen, B., Jia, Y., Zhang, M., Li, X., Yang, J., & Zhang, X. (2019). Facile modification of sepiolite and its application in superhydrophobic coatings. *Applied Clay Science*, 174, 1-9.

<http://www.rsc.org/periodic-table/element/13/aluminium>, 08.07.2019.

Peng, W., Gou, X., Qin, H., Zhao, M., Zhao, X., & Guo, Z. (2018). Creation of a multifunctional superhydrophobic coating for composite insulators. *Chemical Engineering Journal*, 352, 774-781.

Rezayi, T., & Entezari, M. H. (2015). Achieving to a superhydrophobic glass with high transparency by a simple sol-gel-dip-coating method. *Surface and Coatings Technology*, 276, 557-564.

DRAFT



## Investigation of spectral properties of newly synthesized organometallic ruthenium complexes

Beyza Yıldırım<sup>1\*</sup>, Elif Muslu<sup>2</sup>, Elif Subaşı<sup>3</sup>, Kadriye Ertekin<sup>3</sup>

<sup>\*1</sup> Dokuz Eylül University/The Graduate School of Natural and Applied Sciences/ Chemistry Department, Izmir, Turkey

<sup>2</sup> Dokuz Eylül University/The Graduate School of Natural and Applied Sciences/ Nanoscience and Nanoengineering Department, Izmir, Turkey

<sup>3</sup> Dokuz Eylül University/Faculty of Science/Department of Chemistry, Izmir, Turkey

\*beyzayildirim@gmail.com

### Abstract

Ruthenium (Ru) complexes are unique organometallic compounds with a wide range of uses including cellular imaging, cancer treatment, oxygen sensing devices and dye sensitive solar cells due to their suitable photophysical, photochemical and electrochemical properties, long luminescence lifetime and large Stokes Shifts [1, 2]. In this work newly synthesized organometallic ruthenium complexes of  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^1)]$ ,  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^2)]$  and  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^3)]$  have been investigated in terms of emission based spectral properties in solvents and polymer embedded forms. The synthesis reactions of organometallic ruthenium complexes were carried out under argon atmosphere, using dry solvents and Schlenk technique. The polymeric matrices of poly (methyl methacrylate) (PMMA), polyvinyl chloride (PVC), ethyl cellulose (EC) and silicone were chosen. Polymer embedded dyes were spread onto a 125  $\mu\text{m}$  polyester support (Mylar TM type) by spin coating technique. Absorption, excitation and emission spectra of the thin films of these composite materials were recorded by spectroscopic methods.

**Keywords:** Ruthenium, organometallic compound, composite, luminescence.

### INTRODUCTION

Up to now the ruthenium complexes have been extensively synthesized and studied for many different applications including anti-tumor and anti-microbial agents, optical sensors, solar energy conversion systems, electronic devices and chemical/electrochemical catalysis (Murat et al., 2017; Toshikazu and Koichiro, 2001; Veronique et al., 1993). They have been designed with a variety of ligands bearing hydride, halide, hydrate (Sean et al., 2004) carboxylate, phosphane, amine, oxygen or nitrogen chelating groups, Schiff bases, arenes, carbenes, etc. (Claudio et al., 1996). As a result of the variety of ligands, ruthenium complexes exhibit different activity, selectivity and functionality in organic transformations and applications (Atsushi et al., 2002; Abirami et al., 2003; Antony et al., 1998). Ruthenium (II) complexes have also been widely used as oxygen indicators (Martin and Dan, 2000) due to their efficient luminescent properties, relatively long-life metal-to-ligand charge transfer excited states (Hu et al., 2000), fast response times, strong visible absorptions, large Stoke's shifts and high photochemical stabilities (Toshikazu and Shinya, 1998; Toshiyuki et al., 2001; Yuki and Yutaka, 2004). However, investigations on the thiosemicarbazones (TSCs) are limited in spite of their useful structural motif that is of the potential to display chemical functionality in biologically active molecules (Shirani et al., 2011). As a consequence, spectral characterization studies of the TSC equipped Ru complexes is rare. Herein, we focused on spectral investigation of TSC bearing Ru (II) complexes. In this paper, we present spectral properties of new and conformationally stable forms of  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^1)]$ , (TSC<sup>1</sup>: 5-chloro-2-acetylthiophen-4-phenyl-3-thiosemicarbazone);  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^2)]$ , (TSC<sup>2</sup>: 5-methyl-2-acetylthiophen-4-phenyl-3-thiosemicarbazone) and  $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}_2(\text{S-TSC}^3)]$ , (TSC<sup>3</sup>: 5-chloro-2-acetylthiophen-4-methyl-3-thiosemicarbazone) in tetrahydrofuran, and in polymeric matrices of polymethyl methacrylate (PMMA), polyvinyl chloride (PVC), ethyl cellulose (EC) and silicone.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Polymethyl methacrylate (PMMA), polyvinyl chloride (PVC), ethyl cellulose (EC), silicone, tetrahydrofuran (THF  $\geq$  99%), ruthenium (III) chloride hydrate, thiosemicarbazides, 2-acetyl-5-chloro/methyl thiophen,  $\alpha$ -phellandrene and other reagents were obtained from Sigma-Aldrich. During the studies, high purity solvents and reagents were used without further purification. The precursors of [ $\eta^6$ -*p*-cym)RuCl<sub>2</sub>( $\mu$ -Cl)<sub>2</sub>] and all of the TSC ligands (TSC<sup>1-3</sup>) were prepared in accordance with previous publications (Pelin et al., 2017). The purity of the synthesized compounds was checked by TLC on aluminum plates covered with silica gel 60 F254. Argon gas cylinders was of 99.9% purity and obtained from Linde Gas, Izmir, Turkey.

### Instrumentation

The synthesis reactions of organometallic ruthenium complexes were performed under an argon atmosphere using Schlenk line techniques following literature information (Zehra et al., 2018). LECOCHNS-O-9320 was used for the elemental analyses. IR spectra and <sup>1</sup>H NMR data were recorded by Varian 1000 FT spectrophotometer (KBr pellets) in deuterated chloroform and Digital FT NMR (500 MHz), respectively.

The UV-VIS spectra were recorded by Thermo-Scientific Evolution 600 Instrument. Excitation-emission spectral characteristics of the complexes were measured in steady-state mode of a fluorescence spectrometer (Edinburgh Instruments of FLS920). The decay times were recorded by time resolved fluorescence spectrometer of FLS920 which works on the principle of time correlated single photon counting (TCSPC). During the decay time measurements, the samples were excited with a nanosecond pulsed diode laser at the wavelength of 464 nm. The excitation and emission slits were set to 10 nm. Instrument Response Function (IRF) data were acquired by using a suspension of a colloidal silica (LUDOX 30%, Sigma Aldrich) in water.

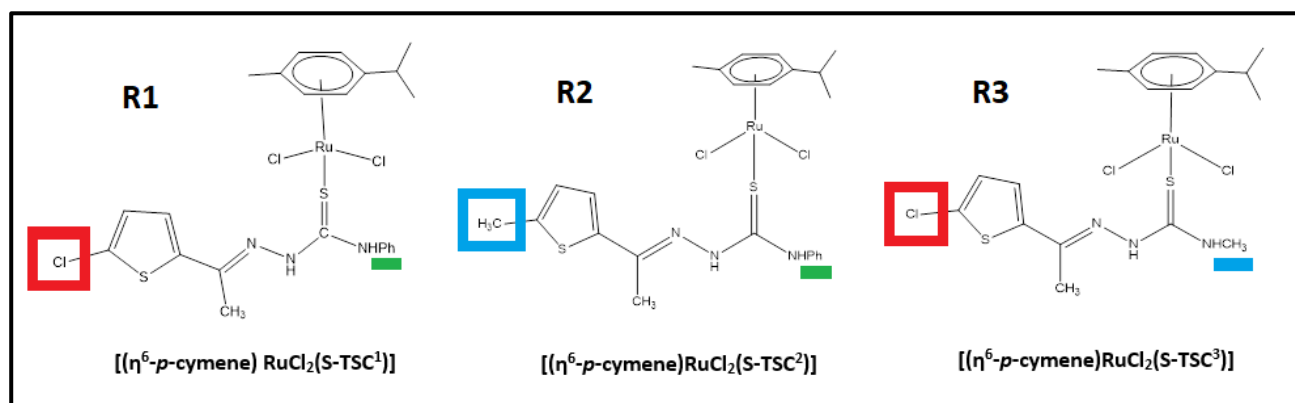
### Characterization of the organometallic ruthenium complexes

The procedures of the synthesis of the complexes which were encoded as R1, R2 and R3, were performed according to Literature (Pelin et al., 2017; Zehra et al., 2018). Characterization of the synthesized forms are as follows. Schematic structures of the utilized Ru complexes were shown in Figure 1.

**[ $\eta^6$ -*p*-cym)RuCl<sub>2</sub>(*S*-TSC<sup>1</sup>), R1:** Orange solid, 448 mg, 71% yield. C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>Ru: Calc. %C: 45,68; H: 4,63; N: 6,66. Found: %C: 45,20; H: 4,22; N: 6,13. IR (KBr pellet),  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3236 (m), 3072 (s), 2959 (m), (N (3)H+N (2)H), 1618 (s), 1585 (s), (C=N+NH), 1051 (m), (N-N), 935 (s), (C=S), 804 (m), 770 (m), 705 (m) (thiophen ring stretching). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), ( $\delta$ :ppm): 10.54 (s, 1H, N (2)H), 8.63 (s, 1H, N (3)H), 7.92-5.06 (m, *p*-cymene, phenyl and thiophen ring protons), 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C=N), 2.27 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**[ $\eta^6$ -*p*-cym)RuCl<sub>2</sub>(*S*-TSC<sup>2</sup>), R2:** Orange solid, 451 mg, 74% yield. M.p: 145-150°C. C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Ru: Calc.: %C: 49,17; H: 5,28; N: 6,88. Found: %C: 48,20; H: 5,42; N: 6,13. IR (KBr pellet),  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3249 (m), 3198 (w), 2913 (m) (N (3)H+N (2)H), 1574 (s), 1535 (s), 1496 (s), 1443 (s), (C=N+NH), 1051 (m) (N-N), 897 (m), (C=S), 760 (m), 693 (m) (thiophen ring stretching). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), ( $\delta$ :ppm): 10.82 (s, 1H, N (2)H), 8.15 (s, 1H, N (3)H), 7.50-4.56 (m, *p*-cymene, phenyl and thiophen ring protons), 2.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C=N), 2.41 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.63 (s, 3H, Me-thiophen), 1.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.32 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**[ $\eta^6$ -*p*-cym)RuCl<sub>2</sub>(*S*-TSC<sup>3</sup>), R3:** Orange solid, 432 mg, 76% yield. C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>S<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>Ru: Calc.: %C: 40,11; H: 4,78; N: 7,38; Found: %C: 40,20; H: 4,22; N: 7,13. IR (KBr pellet),  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3365 (m), 3124 (m), (N (3)H+N (2)H), 1574 (m), 1507 (s), 1412 (s), (C=N+NH), 1045 (m) (N-N), 895 (s), (C=S), 668 (m) (thiophen ring stretching). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), ( $\delta$ :ppm): 10.82 (s, 1H, N (2)H), 8.24 (s, 1H, N (3)H), 7.58-6.82 (m, *p*-cymene and thiophen ring protons), 3.74 (s, 3H, N (3) Me), 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C=N), 2.84 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).



**Figure 1.** Utilized organometallic ruthenium complexes (R1, R2 and R3).

In all of the Ru complexes the p-cymene group is the same. However, they exhibit differences in terms of the thiosemicarbazone ligands which are chloro and phenyl, methyl and phenyl and chloro and methyl substituted forms, respectively. Among them, phenyl is an electron withdrawing group by inductive effect and electron donating by the resonance depending on the substituents attached to the ring. On the other hand, chloro and methyl are weak electron withdrawing and electron donating groups, respectively. Therefore, variations observed on the spectral properties of the Ru complexes are dependent upon these substituents.

### Preparation of solutions and thin films of complexes

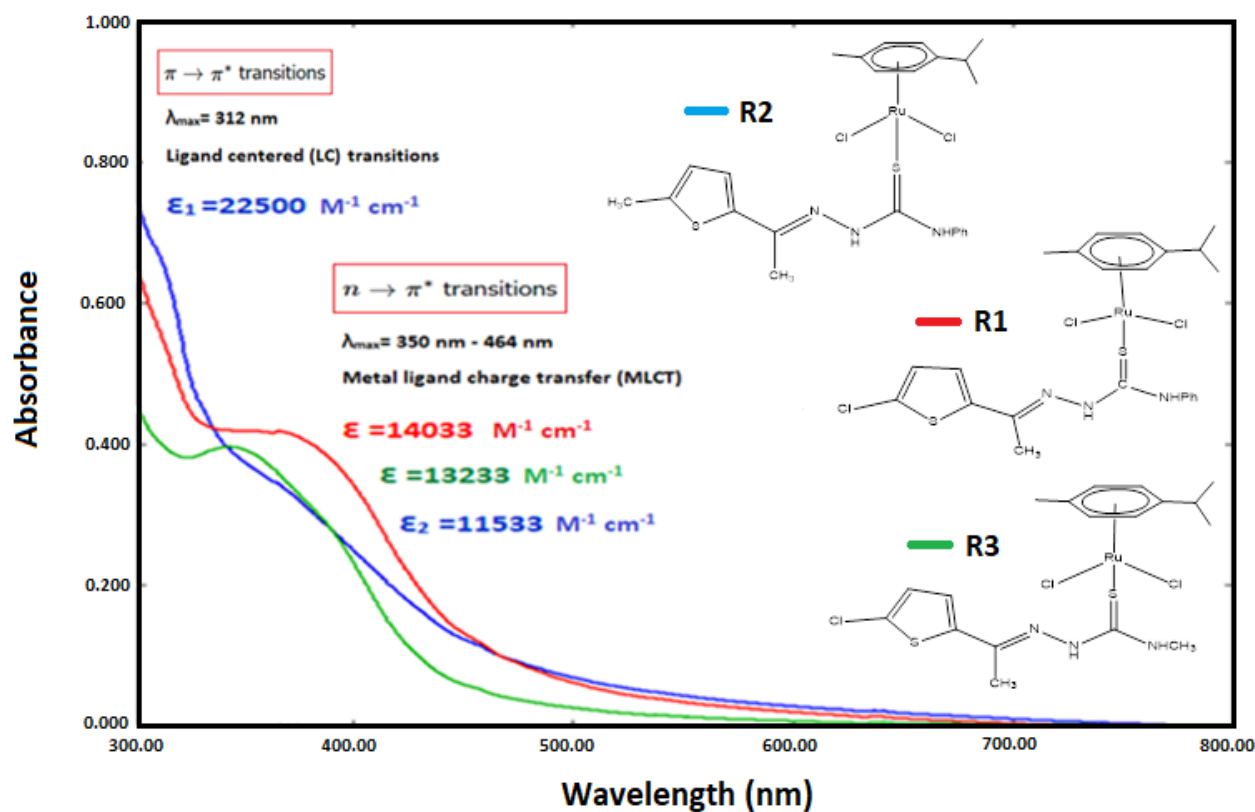
Organometallic ruthenium based complexes (R1, R2, R3) were dissolved in 5 mL of THF and 3.10<sup>-5</sup> M of solutions of the complexes were prepared. The R1, R2 and R3 based polymeric composites were prepared in 5 mL of glass vials. 120 mg of the selected polymer (PMMA, PVC, EC and silicone) was dissolved in 2 mL of THF under magnetic stirring. Then 0.5 mg complex was added and the cocktail was obtained. The resulting composite materials were spread onto a 125 μm polyester support (Mylar TM type) by spin coating technique. Thickness of the films was measured using Tencor Alpha Step 500 Prophyloimeter and were found to be 20.11 ± 0.08 μm (n=16). The thin films were cut to appropriate size and placed diagonally into the sample holder or the cuvette of the spectrofluorometry for the measurements.

## RESULTS and DISCUSSION

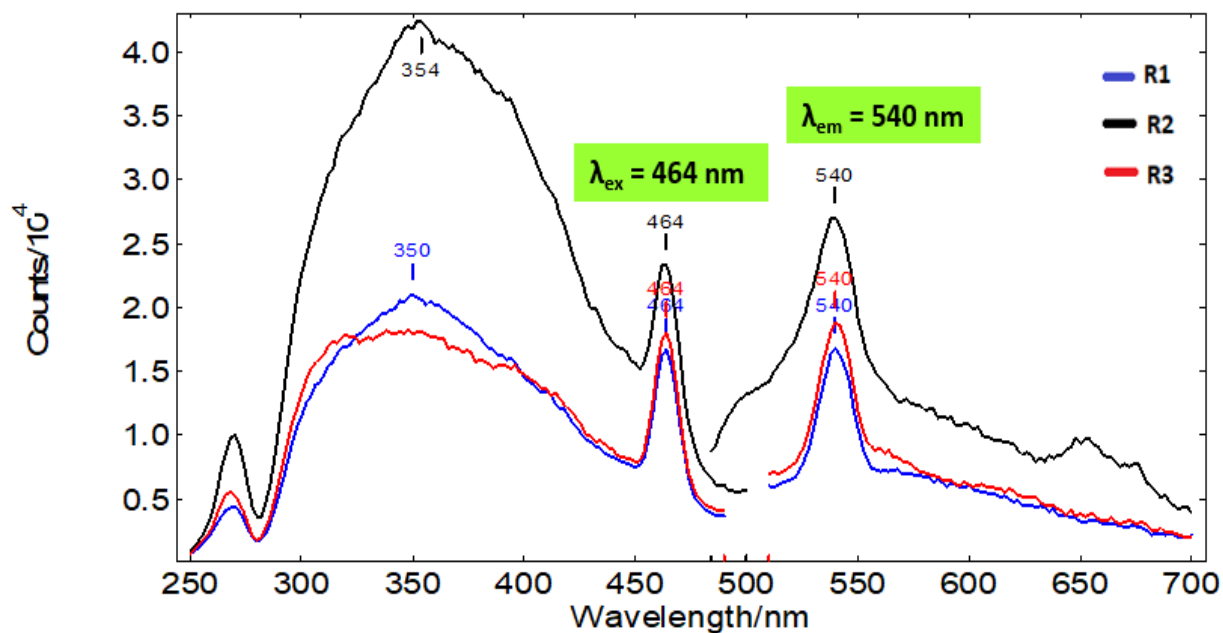
### Spectral properties

Spectral characteristics of the R1, R2 and R3 were investigated both in THF and in embedded forms in the polymers of PMMA, PVC, EC and silicone, respectively. Utilized polymers provided excellent optical transparency at the excitation wavelength of the complexes, high light guidance. Table 1 reveals excitation-emission maxima of the 3.10<sup>-5</sup> M of Ru complexes in THF and in the thin film forms of the selected polymers. The R1, R2 and R3 can be excited at 464 nm. When excited at this wavelength, they exhibit broad emission bands centered between 518-540 nm arising from metal-ligand charge transfer (MLCT) transitions.

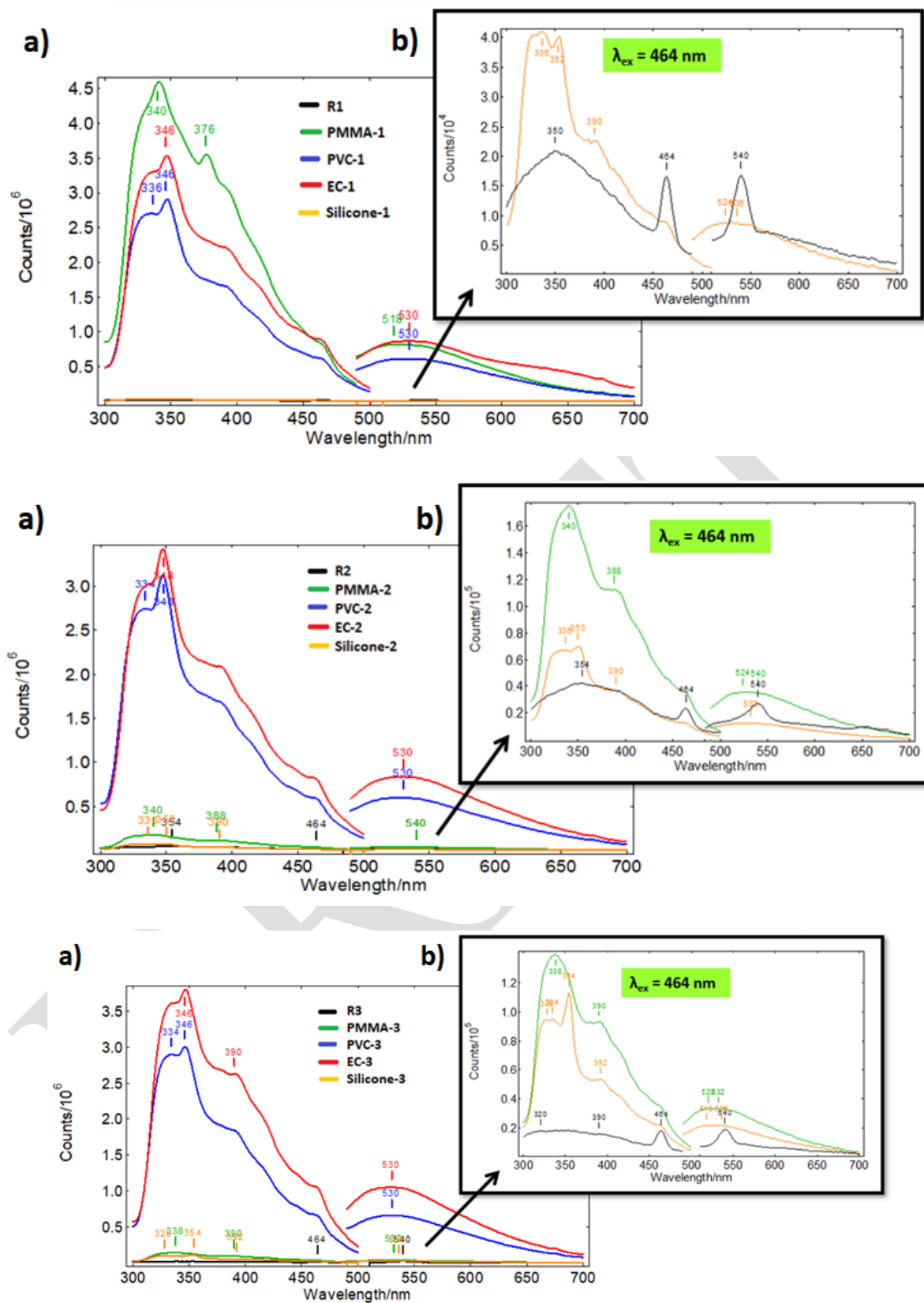
The following figures (Figure 2-4) indicate absorption, excitation and emission spectra of the individual complexes. Comparative absorption, excitation and emission spectra of the 3.10<sup>-5</sup> M solutions of the R1, R2 and R3 were recorded in THF. Among them, the methyl and phenyl bearing derivative R2, exhibited highest molar extinction coefficient and emission performance with respect to the R1 and R3. This can be attributed to the presence of chlorine atoms in the structure of the R1 and R3, which causes a quenching related to spin-orbit coupling arising from heavy-atom effect.



**Figure 2.** Absorption performance of the  $3.10^{-5}$  M Ru complex solutions in THF.



**Figure 3.** Excitation-emission spectra of the  $3.10^{-5}$  M Ru complex solutions in THF.



**Figure 4.** Excitation and emission spectra of the a)  $3.10^{-5}$  M Ru complex solutions in THF (R1, R2 and R3) and when embedded in the selected polymeric matrices. b) Enlarged luminescence spectra.

**Table 1.** Excitation-emission wavelengths and decay times of the  $3.10^{-5}$  M Ru complexes in THF and in embedded forms in PMMA, PVC, EC and silicone matrix ( $\lambda_{\max}^{\text{ex}}$ : excitation maximum,  $\lambda_{\max}^{\text{em}}$ : emission maximum and  $\Delta\lambda$ : Stoke's shift in nm).

Sample	$\lambda_{\max}^{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\max}^{\text{em}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$\chi^2$	Decay time (ns)	Std.Dev. (ns)	Rel. (%)
R1	464	540	76	1.152	$\tau^1$	0.80	12.55
					$\tau^2$	3.91	66.60
					$\tau^3$	31.58	20.85
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>9.30 ns</b>	
R2	464	540	76	1.026	$\tau^1$	2.18	33.51
					$\tau^2$	6.35	48.31
					$\tau^3$	70.71	18.18
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>12.73 ns</b>	
R3	464	540	76	1.161	$\tau^1$	0.97	14.49
					$\tau^2$	4.17	66.91
					$\tau^3$	31.52	18.60
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>8.59 ns</b>	
PMMA-1	464	518	54	1.143	$\tau^1$	2.48	55.91
					$\tau^2$	9.49	33.34
					$\tau^3$	77.99	10.75
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>13.09 ns</b>	
PMMA-2	464	524	60	1.455	$\tau^1$	2.32	52.67
					$\tau^2$	8.96	37.59
					$\tau^3$	79.51	9.74
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>12.20 ns</b>	
PMMA-3	464	532	68	2.001	$\tau^1$	2.06	52.10
					$\tau^2$	8.00	37.69
					$\tau^3$	81.14	10.21
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>12.07 ns</b>	
PVC-1	464	530	66	1.258	$\tau^1$	2.47	52.45
					$\tau^2$	9.58	35.79
					$\tau^3$	88.42	11.76
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>15.34 ns</b>	
PVC-2	464	530	66	1.344	$\tau^1$	2.36	47.44
					$\tau^2$	9.43	37.54
					$\tau^3$	93.11	15.02
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>18.56 ns</b>	
PVC-3	464	530	66	1.224	$\tau^1$	2.65	55.39
					$\tau^2$	9.39	34.61
					$\tau^3$	77.78	9.99
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>12.52 ns</b>	
EC-1	464	530	66	1.287	$\tau^1$	2.65	52.39
					$\tau^2$	9.49	37.48
					$\tau^3$	84.74	10.14
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>13.35 ns</b>	
EC-2	464	530	66	1.311	$\tau^1$	2.45	56.86
					$\tau^2$	9.33	32.74
					$\tau^3$	83.36	10.41
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>12.80 ns</b>	
EC-3	464	530	66	1.217	$\tau^1$	2.55	57.95
					$\tau^2$	9.06	34.40
					$\tau^3$	80.16	7.66
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>10.16 ns</b>	
Silicone-1	464	536	72	5.038	$\tau^1$	1.79	37.28
					$\tau^2$	11.83	27.56
					$\tau^3$	114.48	35.15
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>43.86 ns</b>	
Silicone-2	464	532	68	1.649	$\tau^1$	2.07	26.81
					$\tau^2$	10.74	34.31
					$\tau^3$	119.12	38.88
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>49.46 ns</b>	
Silicone-3	464	536	72	3.754	$\tau^1$	1.93	21.41
					$\tau^2$	11.24	35.94
					$\tau^3$	111.11	42.65
					$\tau_{\text{avr}}$	<b>52.21 ns</b>	

All of the Ru complexes exhibited blue-shift in the emission maxima when embedded in the solid matrices with respect to the solution phase. The largest shifts were observed in the PMMA which were 22 and 16 nm for the R1 and R2, respectively. The R3 exhibited 10 nm of blue-shift when embedded in EC and PVC matrices

with respect to the THF. In case of solutions, transitions are shifted to shorter wavelengths with increasing solvent polarity where the number of the lone pairs increases, which in turn lowers the energy of the n orbital. However, herein, the higher blue shifts observed in the solid states can be attributed to the restricted motions of the molecules.

The Ru complexes were excited with a diode laser emitting at 464 nm. Decay curves of complexes were acquired at emission maxima of each complex. Table 1 reveals the extracted three exponential decay times of the complexes in all of the studied moieties. The studied Ru complexes exhibited similar average decay times in THF, PMMA, PVC and EC lying between 9-18 ns. However, the R1, R2 and R3 revealed approximately four times longer decay times in silicone. From these results, it can be concluded that silicone provides a solvent similar moiety for the studied Ru complexes in terms of excitation-emission wavelengths. However, the complexes exhibit longer decay times when encapsulated in the silicone.

## CONCLUSION

Herein, characterization and spectral properties of the newly synthesized TSC-based Ru complexes were studied. The offered complexes exhibited typical broad band emission centered around 530-540 nm and large Stoke's shifts between 54-76 nm when excited with blue light at 464 nm. They exhibited high molar extinction coefficients, stable excitation and emission behavior and moderated three exponential decay times. When embedded in polymeric matrices of PMMA, PVC, EC and silicone, they exhibited similar spectral response observed in the solution phase. However, when studied in solid state, the Ru complexes exhibited blue-shifted emission with respect to the THF. Encapsulation of the complexes in silicone resulted with four times longer decay times compared to the solution phase and other polymeric matrices. The offered organometallic ruthenium complexes are excitable with blue LEDs which can be concluded as an advantage for the imaging and potential opto-electronic applications.

## ACKNOWLEDGEMENT

We gratefully acknowledge that funding of this project was provided by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) numbered TUBITAK 218Z026. We also thank to the Scientific Research Funds of Dokuz Eylul University (project number: 2017.KB.FEN.041).

## REFERENCES

- Abirami S, Gopalpur N, Srinivasan C 2003. Catalytic epoxidation of cyclic vinylsilanes by ruthenium(II) complexes under aerobic conditions. *Tetrahedron*, 59: 7761-7765.
- Antony R, Tembe GL, Ravindranathan M, Ram RN 1998. Polymer supported Ru(III) complexes, synthesis and catalytic activity. *Polymer*, 39(18): 4327-4333.
- Atsushi M, Mizuki F, Ryo I, Tsutomu K 2002. Catalytic aerobic oxidation of diols under photo-irradiation: highly efficient synthesis of lactols. *Tetrahedron Letters*, 43(19): 3481-3484.
- Claudio B, Juan AC, Maurizio P, Antonio R, Fabrizio Z 1996. The mechanism of the Ru-assisted C-C bond cleavage of terminal alkynes by water. *Journal of the American Chemical Society*, 118(19): 4585-4594.
- Hu YZ, Tsukiji S, Shinkai S, Oishi S, Durr H, Hamachi I 2000. Coupling covalent and noncovalent electron transfer in a catenane-type donor-sensitizer-acceptor triad. *Chemistry Letters*, 5: 442-443.
- Martin MFC, Dan X 2000. Single standard calibration of an optical oxygen sensor based on luminescence quenching of a ruthenium complex. *Analytica Chimica Acta*, 403(1-2): 57-65.
- Murat Y, Pelin KY, Nurdan Ö, Suna T, Elif S 2017. p-cymene based organometallic ruthenium(II)-arene complexes with benzaldehyde derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antimicrobial activity. *Dicle Medical Journal*, 44(4): 381-394.
- Pelin KY, Betül S, Cansu SK, Elif S 2017. Half-sandwich ruthenium-arene complexes with thiophen containing thiosemicarbazones: synthesis and structural characterization. *Journal of Organometallic Chemistry*, 832: 27-35.

- Sean EC, Alen H, Robert HM 2004. Mechanisms of the H<sub>2</sub>-hydrogenation and transfer hydrogenation of polar bonds catalyzed by ruthenium hydride complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 248(21-24): 2201-2237.
- Shirani KH, Adriano AS, Gentil JV, Percycles VS, Francielle PG, Raissa BP, Celso VN, Cecília MAO Cleuza CS 2011. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. *Molecules*, 16(2): 1166-1180.
- Toshikazu H, Shinya F 1998. An Organic Catalytic system for dehydrogenative oxidation. *Journal of Organic Chemistry*, 63: 7534-7535.
- Toshikazu H, Koichiro I 2001. Ruthenium complexes bearing p-conjugated pendant moieties for a redox-switching system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 5: 431-432.
- Toshiyuki M, Seiji B, Manabu M, Toshikazu H 2001. Novel redox-active conjugated palladium homobimetallic complex. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 3: 651-657.
- Veronique G, Anthony H, Jean ML 1993. An electro-photoswitch: redox switching of the luminescence of a bipyridine metal complex. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 12: 1034-1036.
- Yuki F, Yutaka A 2004. Novel optical oxygen sensing material: 1-pyrenedecanoic acid and perfluorodecanoic acid chemisorbed onto anodic oxidized aluminium plate *Sensors and Actuators B: Chemical* 99(1): 130-133.
- Zehra T, Pelin KY, Elif S, Hulya AK 2018. Screening organometallic thiophene containing thiosemicarbazone ruthenium (II/III) complexes as potential anti-tumour agents. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(3): 425-435.



## Investigation of the antimicrobial effects of red beet root (*Beta vulgaris* L.) wastes from Turkey

Aysegul Mutlu-Ingok<sup>1,2\*</sup>, Dilara Nur Dikmetas<sup>1</sup>, Funda Karbancioglu-Guler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Food Engineering, Istanbul, Turkey.

<sup>2</sup>Duzce University, Akcakoca Vocational School, Food Technology Department, Duzce, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: aysegulmutlu@duzce.edu.tr

### Abstract

Natural antimicrobials have gained interest to inhibit pathogenic microorganisms and to control food borne diseases. In recent years there has been a growing interest in positive effects of red beet root (*Beta vulgaris* L.) in addition to its coloring effects. Studies on antimicrobial effects are limited when there is evidence of antioxidant effects. In this study, antimicrobial activity of *Beta vulgaris* wastes from Duzce province of Turkey were tested against Gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*), Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and *Candida albicans* and *Candida krusei* with common antimicrobial testing method disk diffusion method. Present study has demonstrated that beet root wastes has antimicrobial activity especially against Gram positive microorganisms.

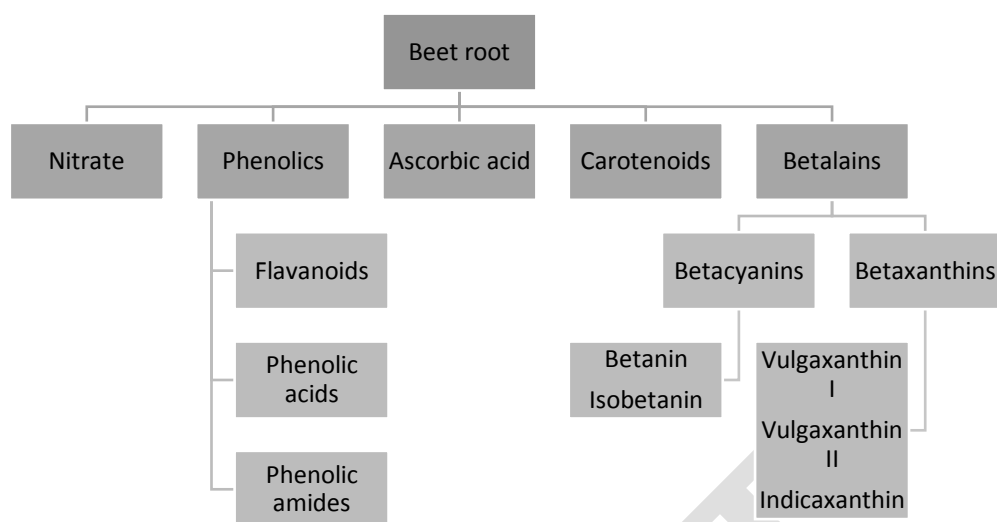
**Keywords:** *Beta vulgaris* L., hydrosol, antimicrobial activity.

### INTRODUCTION

Secondary compounds of steam distillation of plants were called as hydrosols (or hydrolates or aromatic waters). They are generated during essential oil processing. They are quite complex mixture containing traces of essential oils and several water-soluble components. It is easy and cheap to produce. They are also less toxic when compared with essential oils. Their antimicrobial activity may be as a result of their hydrophobic nature by acting through destroying the cytoplasmic membrane. In addition to their antimicrobial properties, they also have antioxidant activity. In addition to their above mentioned activities, they can prevent biofilm formation and antibiotic resistance (D'Amato et al., 2018).

Red beet root (*Beta vulgaris*) is cultivated all over the world and generally known as 'cukundur' or 'kizillkok' in Turkey. In recent years there has been a growing interest about biological activity of red beet root (*Beta vulgaris rubra*) due to positive effects as health promoting functional food. It is also being considered as a promising therapeutic treatment agent (Clifford et al., 2015). Its antioxidant effects were determined previously. These effects were principally depending on its betanin content. Betanin is a natural pigment with antioxidant properties used as a food colourant (Gonçalves et al., 2012). In addition to betanin, sugar beet molasses contains rich phenolic compounds, flavonoids and phenolic acid compounds (Chen et al., 2017). It has been proved that products from red beet can be used to provide protection against certain oxidative stress-related disorders in humans (Kanner et al., 2001).

Oxidative stability of sugar beet pulp found equivalent to synthetic antioxidant BHT (Mohdaly et al., 2010). In addition to their antioxidant activity, it can be used to cross diabetes, hypertension and cancer due to its antioxidant properties (Abbas et al., 2017). Red dye extracted from red beet roots (*Beta vulgaris*) are also used as natural colorant (Nisa et al., 2015). Outside the food industry, sugar beets could also be used as a feedstock for novel renewable chemicals, including biofuels (Günan Yücel and Aksu, 2015; Zayed et al., 2014). The chemical composition of the oil of aerial parts of *Beta vulgaris* was firstly reported by Zardi-Bergaoui et al. (2017) as oxygenated sesquiterpenes (39.2%), followed by sesquiterpene hydrocarbons (30.3%) and one apocarotenoids (26.3%). The bioactive compounds of beet root were showed in Figure 1.



**Figure 1.** Overview of Potentially Bioactive Compounds in Beet Root (Clifford et al., 2015).

In literature it is thought that industrial sugar beets has antimicrobial properties depending on their lignin and high sucrose content (Shen and Kamdem, 2015; Isaac et al., 2017). But to date, very few investigations on beet root activity have been performed. One of these studies was about polyphenols from sugar beet molasses against *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium*. This study also suggested that the Gram negative bacteria were more sensitive to the sugar beet molasses polyphenols than the Gram positive bacteria (Chen et al., 2017). In another study, *Beta vulgaris* showed highest antibacterial activity among tested fruit and vegetables against *E.coli* and *Lactobacillus* (Narender et al., 2017).

Several extraction processes were applied to get essential oils and extracts from natural substances for years. Although solvent extraction was the most conventional one, it has several disadvantages like the use of harmful solvents, degradation of compounds because of high temperature, long extraction time, economic and energy costs (Jacotet-Navarro et al., 2015).

Current study was designed to evaluate the *in vitro* antimicrobial effects of *Beta vulgaris* wastes from Turkey against two strains of Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* NCTC 12967), two strains of Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Escherichia coli* ATCC 25922) bacteria and four strains of *Candida* spp. (*Candida albicans* 36802, *Candida albicans* 2655, *Candida albicans* 10231 and *Candida krusei* KUEN 1001).

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials and Microorganisms

Red beet roots were obtained from Duzce province of Turkey. Two strains of Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* NCTC 12967), two strains of Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Escherichia coli* ATCC 25922) bacteria and four strains of *Candida* spp. (*Candida albicans* 36802, *Candida albicans* 2655, *Candida albicans* 10231 and *Candida krusei* KUEN 1001) were used. The cultures were preserved at -80 °C in medium with 20% glycerol.

### Hydrodistillation

Hydrosols were obtained by hydrodistillation unit with Clevenger type apparatus. Firstly, the plants were watery washed, disinfected, rinsed with distilled water and dried. After peeling of red beet root, dried peels of material was grounded into small pieces (3 mm). After the addition of distilled water, it was left in the distillation unit at 100 °C for 6-8 hours. The collected hydrosols were stored in sterile dark bottles in the refrigerator at + 4 °C until use.

### Agar Well Diffusion Assay

Inhibition zone diameters were determined by using a previously described method of Deans and Ritchie (1987) with slight modifications. Cultures were grown in Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Darmsdat,

Germany) at 37 °C for 24 hours for bacteria and in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) at 28 °C for 48 hours for yeasts. Concentrations of bacterial suspensions were adjusted to approximately 10<sup>6</sup> CFU/mL. 100 µL of bacterial suspensions were spread onto Tryptic Soy Agar (TSA (for *S. aureus* and *E. coli*) Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (for *C. albicans* and *C. krusei*) and plates were allowed to dry. Three wells were cut out of agar using a sterile cork borer and 20 µL pf hydrosol was placed into each well. The inoculated plates were incubated suitable conditions. After incubation, zones of inhibition (including well) were measured and recorded in mm. All experiments were performed in triplicate. Results were expressed as mean values with ± standard deviation.

## RESULTS AND DISCUSSION

Red beet root peels were investigated to evaluate their antimicrobial activity against microorganisms including two strains of Gram positive (*S. aureus* and *E. faecalis*), two strains of Gram negative (*P. aeruginosa* and *E. coli*) and four strains of *Candida* spp. using agar well diffusion assay. Tested hydrosol had varying degrees of inhibition activity against tested microorganisms. Although it was dependent on the microbial culture generally antimicrobial activity was obtained against both *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans*. Table 1 summarizes the inhibition zone diameter values as a result of the agar well diffusion test.

**Table 1.** Inhibition Zone Diameters of Red Beet Root hydrosol.

	Red Beet Root Hydrosol (Seeds)
<b>Bacteria</b>	
Gram positive	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	12.75±0.43
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 12967	12.50±0.50
Gram negative	
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	12.75±1.30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12924	ND
<b>Yeast</b>	
<i>Candida albicans</i> 36802	12.13±0.33
<i>Candida albicans</i> 2655	12.38±0.48
<i>Candida albicans</i> 10231	ND
<i>Candida krusei</i> KUEN 1001	ND

Essential oils are well known as effective inhibitors with a broad antibacterial spectrum against both Gram negative and Gram positive bacteria (Mutlu-Ingok et al., 2019). But, hydrosols have several advantages against essential oils. Firstly, hydrosols are by products of essential oil purification process, generally they don't have uncomfortable smell, they do not cause contact irritation. Moreover, they can be directly applied to skin and in some cases they have been consumed as beverage (D'Amato et al., 2018). In addition, their promising antimicrobial and antioxidant effects has an important basis for further researchs. By performing the current study, it was planned to contribute to the literature by determining the antimicrobial effects of hydrosols obtained from red beet root by-product.

Despite the high number of studies on the antimicrobial effects of essential oils, studies conducted with hydrosols were still limited (Mutlu-Ingok and Karbancioglu-Guler, 2017). From these studies, in most cases several promising results were reported about plant hydrosols. In a study conducted with hydrosols of thyme, black cumin, sage, rosemary and bay leaf, it was reported that the thyme hydrosol could be used as natural sanitizing agents for the purpose of washing fresh fruit and vegetable cuts. As a result, it was concluded that plant hydrosols have a potential as natural food sanitizing agents to wash fresh cut fruits (Tornuk et al., 2011). As a result of a study in literature, it was reported that all the hydrosols from arecanut and coconut could effectively scavenge DPPH and ABTS radicals and exhibited potent antioxidant activity (Shen et al., 2017). In another study, antimicrobial and antioxidant activities of orange peel hydrosols were also determined which were cultivated in Dalaman, Köyceğiz and Finike provinces of Turkey (Dikmetaş et al., 2019). In addition to antimicrobial and antioxidative potentials of plant hydrosols, citrus hydrosols was also reported as antibrowning agents (Lante and Tinello, 2015).

As can be seen in Table 1, the tested hydrosol exhibited inhibitory effects towards tested microorganisms to varying degrees. Generally, inhibition zone diameters obtained in the current study are similar to the results from other researchers. Slight differences among studies could be related to the methods used, differences in the EOs on the disc, disc/well size, broth and/or agar composition, and the volatility of the oil in the open-air system (Viljoen et al., 2003). In a study conducted with polyphenols from sugar beet molasses showed bacteriostatic activity against the growth of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* by leaking of proteins of cells. In line with current study, inhibition zone diameter values were determined as  $13.3 \pm 0.14$  and  $15.6 \pm 0.17$  mm against Gram positive;  $16.8 \pm 0.15$  and  $18.9 \pm 0.21$  mm against Gram negative bacteria. As a result of that study, it is stated that sugar beet molasses contains natural components which can significantly inhibit the growth of foodborne pathogens (Chen et al., 2017). It is also proved by Čanadanović-Brunet et al. (2011), that beet root pomace extracts showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 0.75 mg/ml), one of the most common Gram positive bacterium causing food poisoning although a weak antimicrobial activity was found against *Escherichia coli* (MIC = 1.5 mg/ml) and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 4.5 mg/ml). In another study, similar to current results Gram positive bacteria were found as more sensitive than Gram negative ones (Bellahsene et al., 2015).

In another study, Gram negative bacteria (*Salmonella Typhimurium*, *Citrobacter freundii*) and Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus cereus*) showed high susceptibility, while yeasts and moulds were resistant against industrial beetroot pomace extract (Vulić et al., 2013). This case was also confirmed by the current study as although Gram positive and Gram negative bacteria were generally found as susceptible, two strains of *Candida* spp. was found as resistant to red beet root seed hydrosol. In a study which investigates the Total Phenolic Content (TPC), antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of Beet root (*Beta vulgaris*) revealed that inhibition zone diameters were in the range of  $7.2 \pm 0.25$  to  $8.2 \pm 0.2$  mm. Among the four bacterial strains *Bacillus subtilis* was found most susceptible to Beet root extracts (Saani et al., 2018).

Based on the present research, our results indicated that tested hydrosol was effective inhibitor with a broad antibacterial spectrum against both Gram negative and Gram positive bacteria. Antimicrobial activity of components was previously ranked as: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > ethers > hydrocarbons (Kalemba and Kunicka, 2003). Considering the findings of Kalemba and Kunicka (2003), which showed that phenols are placed first in the ranking of antimicrobial activity of essential oil components, the high antimicrobial effects of red beet root may be as a result of its phenolic content. Antimicrobial activity of hydrosols was mainly affected by their chemical composition, being mainly constituted of phenolic compounds have also been proved by D'Amato et al. (2018).

## CONCLUSION

Resistance of microorganisms to antibiotics and consumer concerns about using chemical preservatives have forced scientists to investigate alternative methods for controlling microorganisms. In this case plant hydrosols which were secondary compounds of steam distillation of plants gained importance. According to the results of agar well diffusion assay, antimicrobial activity of red beet root hydrosol especially against Gram positive microorganisms have been found in the current study. Our *in vitro* results suggested that red beet root seed hydrosol can be used by taking advantage of its antimicrobial activity.

## REFERENCES

- Abbas A, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MK, Khan JA, Mahmood MS, Saleemi MK 2017. In vivo anticoccidial effects of *Beta vulgaris* (sugar beet) in broiler chickens. *Microbial Pathogenesis*, 111: 139-144.
- Bellahsene C, Bendahou M, Khadir A, Zenati F, Benbelaïd F, Aissaoui N, Muselli A, Costa J 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. *amethystina* (Poir.) Briq. from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(09): 021-025.
- Čanadanović-Brunet JM, Savatović SS, Četković GS, Vulić JJ, Djilas SM, Markov SL, Cvetković DD 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(6): 575-585.

- Chen M, Zhao Z, Meng H, Yu S 2017. The antibiotic activity and mechanisms of sugar beet (*Beta vulgaris*) molasses polyphenols against selected food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 82: 354-360.
- Clifford T, Howatson G, West DJ, Stevenson EJ 2015. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients*, 7(4): 2801-2822.
- D'Amato S, Serio A, López CC, Paparella A 2018. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control* 86: 126-137.
- Deans SG, Ritchie G 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 165-180.
- Dikmetaş DN, Konuşur G, Mutlu-İngök A, Gülsünoğlu Z, Karbancıoğlu-Güler F 2019. Portakal (*Citrus sinensis*) Kabuğundan Elde Edilen Hidrosol/Esansiyel Yağların Antimikrobiyal ve Antioksidan Özellikleri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(1): 274-283.
- Gonçalves LCP, de Souza Trassi MA, Lopes NB, Dörr FA, dos Santos MT, Baader WJ, Oliveria Jr. VX, Bastos EL 2012. A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry*, 131(1): 231-238.
- Günan Yücel H, Aksu Z 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. *Fuel* 158: 793-799.
- Isaac IC, Wootton SA, Johnson TJ, Baldwin EL, Gu L, Karki B, Williams AN, Halfmann C, Zhu H, Vargas-Ramirez JM, Zhou R, Wiesenborn DP, Ribbons WR 2017. Evaluating the efficacy of genetically engineered *Escherichia coli* W (ATCC 9637) to produce limonene from industrial sugar beets (*Beta vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products*, 108: 248-256.
- Kalemba DAAK, Kunicka A 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10): 813-829.
- Kanner J, Harel S, Granit R 2001. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5178-5185.
- Lante A, Tinello F 2015. Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27: 154-159.
- Mohdaly AAA, Sarhan MA, Mahmoud A, Ramadan MF, Smetanska I 2010. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. *Food Chemistry*, 123(4): 1019-1026.
- Mutlu-İngök A, Karbancıoğlu-Güler F 2017. Cardamom, Cumin, and Dill Weed Essential Oils: Chemical Compositions, Antimicrobial Activities, and Mechanisms of Action against *Campylobacter* spp. *Molecules*, 22(7): 1191.
- Mutlu-İngök A, Tasir S, Seven A, Akgun N, Karbancıoğlu-Güler F 2019. Evaluation of the single and combined antibacterial efficiency of essential oils for controlling *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and mixed cultures. *Flavour and Fragrance Journal*. Early view. <https://doi.org/10.1002/ffj.3501>.
- Narender BR, Rajakumari M, Sukanya B, Harish S 2017. Antimicrobial Activity on Peels of Different Fruits and Vegetables. *Journal of Pharma Research*, 7(1):1-7.
- Nisa A, Saeed K, Hina S, Zahra N, Mazhar S, Kalim I, Syed Q 2015. Nutritional, antioxidant, Microbiological and Toxicological Studies on Red Dye Extracted from Red Beet Roots (*Beta vulgaris*). *Research Journal of Chemical Sciences*, 5(4):1-6.
- Saani M, Lawrence R, Lawrence K 2018. Evaluation of pigments from methanolic extract of *Tagetes erecta* and *Beta vulgaris* as antioxidant and antibacterial agent. *Natural Product Research*, 32(10): 1208-1211.
- Shen X, Chen W, Zheng Y, Lei X, Tang M, Wang H, Song F 2017. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L. *Industrial Crops and Products*, 96: 110-119.
- Shen Z, Kamdem DP 2015. Antimicrobial activity of sugar beet lignocellulose films containing tung oil and cedarwood essential oil. *Cellulose*, 22(4): 2703-2715.
- Tornuk F, Cankurt H, Ozturk I, Sagdic O, Bayram O, Yetim H 2011. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1): 30-35.
- Viljoen A, Van Vuuren S, Ernst E, Klepser M, Demirci B, Başer H, van Wyk B.E 2003. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-The antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. *Journal of Ethnopharmacology* 88:137-143.
- Vulić JJ, Čebović TN, Čanadanović VM, Četković GS, Djilas SM, Čanadanović-Brunet JM., Velićanski AS, Cvetković DD, Tumbas VT 2013. Antiradical, antimicrobial and cytotoxic activities of commercial beetroot pomace. *Food & function*, 4(5): 713-721.

- Zabed H, Faruq G, Sahu JN, Azirun MS, Hashim R, Nasrulhaq Boyce A 2014. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal* 2014: 957102.
- Zardi-Bergaoui A, Ben Nejma A, Harzallah-Skhiri F, Flamini G, Ascriczzi R, Ben Jannet H 2017. Chemical composition and biological studies of the essential oil from aerial parts of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* (L.) arcang. growing in Tunisia. *Chemistry & biodiversity*, 14(10): e1700234.

DRAFT

## Kanser hastalığının tedavisinde kullanılan bazı bitkiler ve bunların etnobotanik olarak kullanımları

Selin Erdinç<sup>1\*</sup>, Mehmet Özaslan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gaziantep Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gaziantep, Türkiye

<sup>2</sup> Gaziantep Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gaziantep, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: sln\_s92@hotmail.com

### Özet

Bitkilerin bir kısmının veya tamamı binlerce yıldır tedavi amacıyla kullanılması (fitoterapi) kanser hastalığı için düzenlenen ilaçlara öncüllük etmiştir. Bitkilerin yanında mikroorganizmalar ve deniz kaynaklı ürünler de antikanser ilaçlar geliştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bitki içeriğinde bulunan fitokimyasallardan alkaloidler ve fenolik bileşikler anti-kanser veya anti-tümör aktiviteye sahip olup, alkaloidler ise iğ ipliklerine etki ederek kanserli hücrelerin döngüsü boyunca ilerlemelerini engelleyerek etki gösterirler. Karotenoidler ise farklı bir etki mekanizması göstererek kanseri engelleyici etkileri ile ön plana çıkmaktadır. Yani her bitki içeriğinde bulunan etken madde ile bağlantılı olarak etki göstermektedir. Antikanser özelliği olan bu bitkilerin çoğu günlük hayatta kullanılan besinlerden örnek verilebilir. Bitki içerisinde bulunan etken madde ile bağlantılı olarak birden fazla kanser çeşidini etkileyebilmektedir. Tıbbi bitkilerin ön plana çıkması ve araştırılmasının artmasının sebebi ise kanserin beslenme, karsinojen maddeler, hormonal düzensizlikler ve genetik faktörler gibi birçok etmeni bir arada bulundurmasından kaynaklanmaktadır. Sunulan bu çalışmada, kanser hastalığının tedavisinde kullanılan bazı bitkiler ve fitokimyasal bileşenleri ile bunların etnobotanik kullanımları hakkında bilgiler verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, tıbbi bitki, etnobotanik

### Some of the plants that using for threatment of cancer and their ethnobotanical usage

### Abstract

The use of some or all of the plants for thousands of years for treatment (phytotherapy) has pioneered medicines for cancer. Besides plants, microorganisms and marine products are also used to develop anticancer drugs. Alkaloids and phenolic compounds from phytochemicals in plant content have anti-cancer or anti-tumor activity, while alkaloids act by inhibiting the progression of cancerous cells through the spindle strands. Carotenoids show a different mechanism of action and come into prominence with their cancer-preventing effects. That is, each plant acts in connection with the active substance contained in its content. Most of these anticancer plants can be used in daily life. It can affect more than one type of cancer in connection with the active substance present in the plant. The reason for the emergence and investigation of medicinal plants is due to the fact that cancer contains many factors such as nutrition, carcinogenic substances, hormonal disorders and genetic factors. In this study, some plants and phytochemical compounds used in the treatment of cancer and their ethnobotanical uses are given and discribed.

**Keywords:** Cancer, medicinal plant, ethnobotany

### GİRİŞ

İnsanoğlu var oluşundan beri bitkileri, hastalıklardan korunmak veya hastalıkların tedavisi amacıyla kullanmıştır (Lev ve Amar, 2000). Bitkiler ilaç kaynakları içerisinde en yaygın olarak kullanılan gruptur (Başer 2008). İlaçlar başlangıçta; tentür, çay, lapa, toz ve diğer bitkisel formülasyonlar şeklinde hazırlanırken zamanla içerisindeki etken maddeler keşfedilmiş ve daha uygun uygulama yöntemleri (hap, toz, infüzyon, dekoksion, merhem, yakı) kullanılmaya başlanmıştır (Brian, 2002).

Etnobotanik olarak bitki kullanımı dünyada 1900'lü yılların başında hız kazanırken, Türkiye'de 1970'li yıllarda ele alınmaya başlamıştır.

Kuşaktan kuşağa aktarılan bilgiler ile pek çok insan sağlıklı yaşamayı ve hastalıklardan korunmayı başarırken, hastalananlar ise bilgilerden yararlanarak sağlıklarına kavuşmuşlardır. Zamanla endüstriyel devrim, organik kimya, tekstil ve ilaç sanayinin gelişimi ile insanlar doğadan uzaklaşmış ve bitkisel çözümlerin yerine sentetik

ürünler ön plana çıkmıştır (Çırak ve Kevseroğlu, 2004). Yirminci yüzyılda tıp biliminin gelişmesine rağmen, ilaç endüstrisinin pahalı olması ve sentetik ürünlerin sakıncalarının ortaya çıkması, insanların çareyi tekrar doğal bitkisel ürünlerde aramasına neden olmuş ve organik kökenli tedavi konusunda yeni arayış başlamıştır (Yue ve Shu, 1998.) Ayrıca bitkisel tedaviye olan ilginin gün geçtikçe artmasının nedeni ilaçların doğal bileşiklere göre daha az biyo uyumluluğa sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Top, 2008).

## **Fitoterapi**

Fitoterapi bitkilerin tamamının veya bir bölümünün (kök, yaprak, çiçek, meyve, tohum vb.) veya sekonder olarak elde edilen bitkisel maddelerin (süt, terementi, sakız, balsam vb.) kullanılması ile hazırlanan doğal ilaçlar vasıtasıyla hastalıkları önlemeyi ve hastalıkları tedavi etmeyi amaçlamaktadır (Aslantürk, 2010).

Bitki ve tedavi sözcüklerinden oluşan fitoterapi terimi 1939 yılında Fransız hekim Henri Leclerc tarafından ilk kez 'La Presse Medical' adlı dergide kullanılmıştır (Aslantürk, 2010).

WHO kayıtlarına göre dünyanın yaklaşık %80' i geleneksel tıptan yararlanıyor olduğu ve 21.000 kadar tıbbi bitki ilaç hazırlamak için uygun bulunduğu rapor edilmiştir (Brian, 2002).

## **Fitokimyasallar**

Bitki kimyasalları (fitokimyasal) birçok hastalığın riskini azaltan ve bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyolojik olarak aktif bileşikler olarak tanımlanmaktadır.

Bitki içeriğinde bulunan fitokimyasallardan alkaloidler ve fenolik bileşikler anti-kanser veya anti-tümör aktiviteye sahip olup, alkaloidler iğ ipliklerine etki ederek kanserli hücrelerin döngüsü boyunca ilerlemelerini engelleyerek etki gösterirler (Pillai ve ark., 2004).

Fenolik bileşikler daha çok hücre döngüsü kontrol proteinleri ve apoptozis mekanizmasının uyarılması üzerinde etki yaparlar. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin nedeni, redoks özelliği olup (Rice-Evans ve ark.,1996; Morel ve ark.,1994) bu özellik bileşiklerin kimyasal yapılarıyla yakından ilişkilidir. Ayrıca yapılarında en az bir aromatik halka bulunduran fenolik bileşiklerin anti kanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğu belirtilmektedir (Bhattacharya ve ark., 2010).

Küçük dozlarda bile kuvvetli etkiye sahip olan alkaloidler, katı ve genellikle renksiz olan maddelerdir. Bazı halde suda çözünmez ancak, tuzları suda çözünebilir. İlk alkaloid 1803 yılında Fransız eczacı Derosne tarafından elde edilmiş olan morfindir (Sağında, 2014).

Karotenoidler ise farklı bir etki mekanizması göstererek kanseri engelleyici etkileri ile ön plana çıkmaktadır (Pillai ve ark., 2004).

Bugüne kadar 5000'in üzerinde farklı bitki kimyasalının tanımlandığı tahmin edilmektedir. Ancak bitki kimyasallarının büyük bir çoğunluğu halen bilinmemekte ve yararları ile birlikte tanımlanması beklenmektedir (Liu, 2004) .

Bitkilerin yapısında bulunan aktif bileşenlere olan ilgi son yıllarda artmış olup bu konu ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Cragg ve Newman, 2005; Yalçın ve ark ., 2017). Anti mutajenik, anti kanserojenik, anti aging (yaşlanmayı geciktirici) gibi birçok biyolojik fonksiyon, antioksidant özellikli bileşiklere (askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler) dayandırılmaktadır (Endo ve ark., 1985).

## **Bitkisel tedavinin Dünyadaki yeri**

Dünya pazarlarında tıbbi ve aromatik bitkilere olan talep her geçen gün giderek artmaktadır.

Bitkisel ürünler genellikle meme kanseri (%2), karaciğer hastalıkları (%21), HIV (%22), astım (%24) ve romatolojik bozuklukları (%26) da içeren kronik tıbbi durumları olan hastalar tarafından kullanılmaktadır (Sarışen ve ark., 2005).

Birçok Avrupa ülkesinde fitoterapi oldukça yaygındır. Almanya bu konuda ilk sırada olup ikinci sırada Fransa ve İtalya yer almakta, sonra sırasıyla İngiltere ve Belçika gelmektedir.

Ayrıca Avrupa'da bitkinin etkili kısımları eczanelerde ilaçlar gibi satılmaktadır (Doğan ve ark., 2018).



## **Bitkisel tedavinin Türkiye'deki yeri**

Türkiye 10.000 civarındaki bitki türü ile zengin bir floraya sahip olup bu bitkilerin yaklaşık 1/3'ü endemik yani Türkiye'ye özeldir (Meriçli 2009).

Bu nedenle; Anadolu, bitki örtüsünün zenginliği açısından dünyanın en önemli bölgelerinden biridir. Bu bölgede birçok yabancı bitki doğal olarak yetişmektedir (Kökosmanlı ve Keleş, 2000). Ülkemizin farklı iklim ve ekolojik koşullara sahip olması, floranın çok sayıda bitki türü ve çeşitliliği içermesi bakımından doğadan toplanan ve kültürü yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler açısından büyük bir ekonomik potansiyele sahiptir (Sağında, 2014).

Türkiye'de toplum, tamamlayıcı ve alternatif tıp uygulamaları ile ilgili bilgi ve kullanımları kanser hastaları dışında oldukça sınırlıdır (Bülbül ve ark 2009).

Türkiye'de tıbbi olarak kullanılan bitki sayısının 600 civarında olduğu bilinmektedir (Baytop, 1999). Bu bitkilerin yurdumuzda en çok bilinen ve en sık kullanılan geleneksel ilaç şekilleri olarak infüzyon (demleme) ve dekoksasyon (kaynatma) şeklinde kullanılır (Sağında, 2014).

## **Kanser**

Kanser; hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin aşırı hücre proliferasyonu ya da azalmış apoptoz nedeniyle bozulması ve kendisi ile hiçbir ilişkisi olmayan diğer doku ve organları işgal ederek bunların görevlerini engellemesidir. Kanser oluşum sürecinde baskılanmış ya da azalmış apoptozun önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Demir ve ark., 2016a).

Kanser günümüzde ciddi bir sağlık problemidir. Kanser tanınmasına, engellenme çabalarına ve tedavideki modern ilerlemelere rağmen bu hastalık dünya çapında milyonlarca insanı etkileyerek yaşam kalitelerini düşürmekte ve ölümlere neden olmaktadır. 1990 yılından bu yana dünyada en sık görülen ve ölüme en çok sebep olan akciğer, meme, kolon ve mide kanserlerinde %22 oranında artış olmuştur (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Amerikan Kanser Derneği verilerine göre dünya üzerindeki yıllık ölümlerin yaklaşık % 2-3'ünün kanser kaynaklı olduğu ve yılda yaklaşık 3.5 milyon insanın kanserden öldüğü bildirilmektedir (Kathiresan ve ark., 2006)

Kanser için ilaç geliştirme süreçleri ve kanserin etyopatogenezi üzerine süren araştırmalar birçok ilaç molekülünün kullanımına olanak sağlamıştır. Ancak bu moleküllerin bir kısmının yan etkilerinin fazla oluşu, bir kısmının sadece kanserin oluşmasında rol oynayan birden fazla yoldan sadece birine etki etmesinden dolayı klasik kemoterapi ilaçları kanser üzerinde istenen başarıya ulaşamamıştır. Bunun üzerine, hücresel sinyal yollarına çok hedefli olarak etki eden bitkisel kaynaklı moleküller ve analogları üstüne de çalışmalar yoğunlaşmıştır (Giordano ve ark., 2008).

Ayrıca son yıllarda kanser hücrelerine karşı kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç gelişimi ve bu ilaçların kronik kullanımının normal hücrelerde toksisite göstermesi sebebiyle de yeni nesil antikanser ajanlar geliştirme önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir (Cenic-Milosevic ve ark., 2013).

Sunulan çalışmada günümüzde kullanımı yaygın olan bitkinin toprak üstü kısımlarının, meyve ve tohum gibi bölümlerinin antikanser özellikleri ile etki mekanizmaları açıklanmıştır.

## ***Curcuma longa* (Zerdeçal/Hint safranı)**

Zerdeçalın içerisinde bulunan kurkumin etken maddesi birçok kanser yolağını özellikle meme kanserini hedef alır. Bu bitki içeriğinde bulunan fenolik madde nedeniyle antikanser etkisi gösterir. Akciğer, meme, deri ve mide kanseri zerdeçal ile sınırlandırılmıştır. Kurkumin'in insan akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı ve hücre döngüsünü durdurarak etkide bulunduğu ortaya konmuştur (Pillai, 2004).

Hayvanlardaki meme kanseri çalışmalarında kurkumin akciğer metastazını önemli derecede önleyebilmiştir. Kurkumin aynı zamanda antiinflamatuar etki gösterebilmektedir. Kanser gelişiminin her aşamasında kurkumin inhibitör aktiviteye sahiptir. Zerdeçal tarafından nitrozamin üretimi inhibe edilmektedir (Somers-Edgar vd., 2008).

## **Panax ginseng**

Ginseng dünyada en çok satışı olan tıbbi bitkisel ürün olarak dördüncü sırada yer almaktadır. Avrupa, Almanya, Avusturya, İngiltere ve ABD de kapsamlı olarak yer almaktadır.

Ginseng kök, gövde ve yapraklarında 36 farklı ginsenosid ve birçok farklı bileşen (esansiyel yağlar, fitosteroller, aminoasitler, peptidler, vitaminler ve mineraller) içermektedir (Wilkie ve Cordess 1994 ).

Ginseng meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. İn vitro denemeler ve in vivo çalışmalar, ginsenositlerin, stres ve yorgunluğa karşı antikarsinojenik etkileri olduğunu doğrulamaktadır (Yalçınkaya ve ark., 2018).

Kanserli hücrelerin metastazını ve progresyonunu bloke eden, hücre farklılaşmasını ise stimüle eden ginsengin, kanser riskini insanlarda azalttığını belirten çalışmalarda DNA sentezine müdahale ederek tümör gelişimini durdurabildiği şeklinde açıklama yapılmaktadır (Yalçınkaya ve ark., 2018).

## **Urtica dioica (Isırgan otu)**

Ülkemizde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bitkilerden biri de ısırgan otudur. İçeriğinde potasyum tuzları, histamin, asetilkolin, C vitamini ve formik asit bulunmaktadır. Isırgan otunun en fazla kendisi, tohumu yenilerek ve bitki çayları şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Isırgan otunun kanser hücreleri üzerine etkisini araştıran çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Isırgan otunu antiproliferatif etkisi, in vitro ve in vivo deneylerle ortaya konulmuştur. Isırgan otu bazı farmakolojik ajanlar ile yan etki göstererek allerjik reaksiyon ve zehirlenmeye neden olabilmektedir (Deniz ve ark., 2010).

## **Viscum album (Ökseotu)**

Avrupada kanser tedavisi amacıyla 1920'lerden beri kullanılmaktadır. *Viscum album* (Ökseotu)'dan Almanya'da onkoloji kliniklerinde yararlanılmaktadır. Yarı parazit bir bitki olması nedeniyle, farklı konak bitkilerde (elma, meşe, çam ağaçları gibi) bulunur. Ökseotunun kemoterapi ve radyoterapi ile birlikte kullanılabilen formları mevcuttur. Ayrıca ökseotunun, apoptoz ve hücre-hücre adhezyon yollarından sorumlu olan genlerin aşırı regülasyonunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Johansson ve ark.,2003; Fritz ve ark., 2004; Eggenschwiler ve ark., 2006; Büssing ve ark., 2007; Büssing ve ark., 2008).

## **Allium sativum (Sarımsak)**

Sarımsak (*Allium sativum* L); antilipidemik, antikanser ve antibakteriyel etkileri nedeniyle dünyada en yaygın kullanılan 12 bitki arasında yer almaktadır.

Sarımsakta bulunan kükürtlü aminoasit olan alliin ezildiği durumlarda alisine dönüşür ve bu bileşik kokudan ve terapötik aktiviteden sorumlu olan yapıdır.

Sarımsak metastazı kanser hücrelerinin adhezyonu ve bağlanmasını önleyerek sağlar. Ayrıca ajoen sarımsakta bulunan ve selenyum varlığında antioksidan etkisi yaratan etken madde kanser oluşumunu geciktirdiği belirtilmiştir. Sarımsak ekstresi, karsinojenlerin DNA'ya zararlı etkilerini önlemekte ve vücuttan karsinojenleri uzaklaştırmaktadır. Ayrıca detoks edici enzim aktivitesini artırarak immün sistemi desteklemektedir (Nicastro ve ark., 2015).

## **Physalis peruviana (Altın çilek)**

Altın çilek antik çağlardan bu zamana kadar çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan tıbbi bir bitkidir (Demir ve ark., 2014). Altın çilek zengin yağ asidi, karoten ve vitamin içeriğiyle dikkat çeken bir bitkidir (Ramadan, 2011).

Wu ve ark. (2009) altın çilek özütünün akciğer kanseri hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğunu, ayrıca antikanser etkiye sahip olan flavonoid ve fenolik bileşikler yüksek düzeyde içeriğini belirtmiştir. Aynı bileşiğin, kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve kanserli hücrelerde apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Chang, 2016). Bitki özütünün, sitotoksik etki gösterdiği ve bitki özütünün dozuna bağlı olarak güçlü bir antikanser etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

## **Nigella sativa(Çörek Otu)**

*Nigella sativa* L. tohumundaki antioksidan özellikli fenolik bileşen olan timokinon'un, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanser etkileri gösterilmiştir. Timokinon'un en önemli etkisi sağlıklı hücrelerde sitotoksikite göstermezken, tümör hücrelerinde güçlü sitotoksik etkiye yol açmasıdır. Çörek otu yağı ve

timokinon bileşiği DNA hasarına karşı koruyucu etkili olup, ortamdaki serbest radikalleri toplayan güçlü bir antioksidandır.

Uçucu yağ olan timokinon analjezik ve antimikrobiyal aktiviteye sahip bir biyoaktif molekül olarak gösterilmektedir. Timokinonun beyin tümörleri, meme ve ovaryum adenokarsinomu, prostat kanseri, mide kansinomu, kolorektal kanser, akciğer kansinomu, lösemi gibi kanserlerde kanser oluşumunu baskılayıcı etkisi literatüre girmiş, çörek otu tohumları ve yağının immün sistemi uyararak T hücrelerini % 30-55 kadar artırdığı, gösterilmiştir (Aslan ve Borazan, 2014).

## Sonuç

Dünyanın birçok coğrafi bölgesinde yaşayan insanlar hastalıkların tedavisinde kendilerine özel hazırladıkları yöntemlerle bitkisel ilaçları kullanmaktadır. Günümüzde bitki ekstraktlarının antikanserojenik etkileri bulunmuş ve antikanserojenik ilaçların % 63'ünün bitkilerden elde edildiği, ayrıca bu ilaçların yan etkilerinin az olduğu ve tedavide başarı oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, klinik açıdan kanser tedavisinde kullanılabilecek çeşitli bitkiler ile bitkilerden elde edilen ekstraktlarla ilgili çalışmalar günümüzde devam ederken, modern ilaçların %20 si geleneksel tıbbi bitkilerden hazırlanmaktadır (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Antikanser etkisinin ortaya çıkmasında bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin öncüllük etmektedir. Bitkisel tedavi geleneksel tıbbın da bir parçası olarak kullanılmış, bazı insanlar bitkisel tedavilerin “doğal” ve “güvenli” olduğunu düşündüğünden dolayı hastalar bitkisel ilaçları, doktor reçetesi ile alınan ilaçlara destek olması için ilaveten veya alternatif olarak kendi istekleri ile kullanmaktadır (Gözüm ve ark.,2003; WHO 2002). Halk ilaçlarında bitkiler çoğunlukla tek başına bazen de birlikte kullanılır. Bu ilaçların hazırlanışında özel reçeteler oluşturulmuştur ve miktarlar buna göre ayarlanır.

Bir bitkinin etkisi diğer bitkilerle birlikte kullanıldığında artabilmektedir (Sağında, 2014). Aynı zamanda bitkilerin bilinçsizce kullanımı ilaçlar ile etkileşime girme ihtimalleri göz önünde bulundurulduğunda tıbbi tedavi ile birlikte uygulanacak ise mutlaka hekimlerin kontrolünde olması gerekmektedir.

## Kaynaklar

- Aslan R, Borazan S 2019. Siyah reçete: Çörek otu (*Nigella sativa*). Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi, 7 (74) 41.
- Aslantürk ÖS 2010. Aydın Yöresinde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidan ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Aydın.
- Balunas MJ, Kinghorn AD 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences, 78: 431-441.
- Baser HC 1998. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Endüstriyel Kullanımı. TAB Bülteni, 13(14): 19-43.
- Baytop T 1984. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3255, Eczacılık Fakültesi, No : 40, İstanbul.
- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. Molecular Plant Pathology, 11: 705-719
- Bocci V 1993. Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 7(1): 1-6.
- Brian WR 2002. Isolation and Structure Elucidation of Cytotoxic Natural Products from Suriname and Madagascar. Virginia polytechnic institute and state university  
[<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd11182002213441/unrestricted/Chapter1.pdf>] Erisim tarihi: 23.05.2008
- Bülbül H, Turgut M, Köylüoğlu S 2009. Çocuklarda tıp dışı uygulamalar konusunda ailelerin görüşleri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 52: 195-202.
- Cenic-Milosevic D, Tambur Z, Bokonjic D, Ivancajic S, Stanojkovic T, Grozdanic N, Juranic Z 2013.

- Antiproliferative effects of some medicinal plants on HeLa cells. Archives of Biological Sciences, 65,(1): 65-70.
- Chang LC, Sang-ngern M, Pezzuto JM 2016. Poha Berry (*Physalis peruviana*) with potential anti-inflammatory and cancer prevention activities. Journal of Medicine and Public Health, 75 (11): 353-359.
- Cragg GM, Newman DJ. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal Ethnopharmacology, 100:72-9.
- Çırak C, Kevseroğlu K 2004. Kantaron bitkisinin eski çağlardan günümüze kullanım şekilleri ile modern tıptaki yeri ve önemi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19: 74-84.
- Demir S, Aliyazicioglu Y, Turan I, Misir S, Mentese A, Ozer YS, Akbulut K, Kilinc K, Deger O 2016a. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. Nutrition and Cancer, 68(1): 165-172.
- Deniz L, Serteser A, Kargioğlu M 2001. Uşak Üniversitesi ve Yakın Çevresindeki Bazı Bitkilerin Mahalli Adları ve Etnobotanik Özellikleri. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 1: 57-72
- Doğan Ö, Avcı A 2018. Bitkilerle Tedavi ve İlaç Etkileşimleri. Türkiye Klinikleri Dergisi Public Health-Special Topics, 4(1): 49-54
- Büssing A, Stumpf C, Tröger W, Schietzel M 2007. Course of mitogen-stimulated T lymphocytes in cancer patients treated with *Viscum album* extracts. Anticancer Research, 27(4): 2903-2910.
- Eggenschwiler J, Patrignani A, Wagner U. 2006. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album L.*) extracts Iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) *in vitro*. Arzneimittel-Forschung, 56(6): 483-496.
- Endo Y, Usuki R, Kareda T 1985. Antioxidant Effects on Chlorophyll and Pheophytin on the Autoxidation of Oils in the Dark II. Journal of the American Oil Chemists Society, 62(9):1387-90.
- Fritz P, Dippon J, Kierschke T 2004. Impact of mistletoe lectin binding in Breast Cancer. Anticancer Research, 24(2): 1187-1192.
- Giordano S, Petrelli A 2008. From single-to multi-target drugs in cancer therapy: when a specificity becomes an advantage. Current Medicinal Chemistry, 15(5): 422-32.
- Gözüm S, Tezel A, Koc M. 2003. Complementary alternative treatments used by patients with cancer in eastern Turkey. Cancer Nurs, 26: 230-6.
- Johansson S, Gullbo J, Lindholmet P 2003. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly selective cytotoxicity to human breast cancer cells. Cellular and Molecular Life Sciences, 60(1): 165-175.
- Kathiresan K, Boopathy, NS, Kavitha S 2006. Coastal vegetation-an underexplored source of anticancer drugs. Natural Product Radiance, 5: 115-119.
- Kökösmanlı M, Keleş F 2000. Erzurum' da Yetiştirilen Kızılcık Meyvesinin Marmelat ve Pulpa İşlenerek Değerlendirilmesi. Gıda Dergisi, 25(4): 289-298.
- Lev E, Amar Z 2000. Ethnopharmacological Survey of Traditional Drugs Sold in Israel at the end of the 20th Century. Journal of Ethnopharmacology, 72: 191–205.
- Liu RH 2004. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. The Journal of Nutrition, 134: 3479-3485.

- Meriçli HA 2009. Türkiye' de fitoterapinin bugünkü durumu. Aydın Eczacı Odası Dergisi, 36-48.
- Morel I, Lescoat G, Cillard P, Cillard J 1994. Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. Methods Enzymology Journal, 234: 437-443.
- Nicastro HL, Ross SA, Milner JA 2015. Garlic and onions: Their cancer prevention properties. Cancer Prevention Research (Philadelphia), 8(3): 181-189.
- Pillai GR, Srivastava AS, Hassanein TI., Chauhan DP, Carrier E 2004. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. Cancer Letters, 208: 163-170.
- Ramadan MF 2011. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. Food Research International, 44 (7): 1830-1836
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology Medicine Journal. 20(7): 933-956
- Sarışen Ö, Çalışkan D 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat 14: 182-187
- Sağında A 2014. Silifke Bölgesindeki Bitkisel Halk İlaçlarının Araştırılması. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Top R 2008. Aydın Yöresinde yetişen bazı endemik bitkilerden elde edilen ekstraktların sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Wilkie A, Cordess C. 1994. Ginsenga rootjustlike a carrot?. Journal of the Royal Society of Medicine, 87(10): 594-595.
- Wu S, Chang S, Lin D, Wang S, Hou F, Ng L 2009. Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. Food and Chemical Toxicology, 47: 1132-1138.
- Yalçınkaya E, Özgüç S, Aydınalp A, Zeybek U 2018. Antikanser Aktivite Araştırmalarında *Artemisia annua L.* bitkisinin önemi. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 41(3): 1-8.
- Yalçın AS, Yılmaz AM, Altundağ EM, Koçtürk S 2017. Kurkumin, Kuersetin ve Çay Kateşinlerinin Anti-kanser Etkileri. Marmara Pharmaceutical Journal, 21(19): 29.
- Yue Z, Shu U 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Product, 61: 1053-1071.

## Kitosan Bazlı Enjekte Edilebilir Kemik Greftlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Volkan Yalman<sup>1\*</sup>, Funda Alkan<sup>2</sup>, Murat Demirbilek<sup>3</sup>, Nelisa Türkoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye.

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD, Ankara, Türkiye.

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ankara, Türkiye.

\*Corresponding author e-mail: volkanyalman@hotmail.com

### Özet

Kemik vaskülarize bir dokudur ve önemli bir rejeneratif kapasiteye sahiptir. Buna rağmen, kemik defektleri, tümör rezeksiyonları ve ciddi kırıklardan sonra oluşan, belirli bir büyüklüğün üzerindeki defektler gibi osteojenik hasarlarda, kemik dokusunun yenilenmesi problemlidir. Kemik rejenerasyonu konusunda biyomalzemeye dayalı tedaviler, klinik ihtiyaçların bir sonucu olarak gün geçtikçe önem kazanan bir alandır. Kemik yapısındaki bileşenlerden olan çok çeşitli biyoaktif biyomalzemeler, klinik çalışmaların ilgi konusudur.

Bu çalışmada yeni bir enjekte edilebilir jel formunda kemik greft formülasyonu sentezlendi ve karakterize edildi. İlk olarak, kitosan-stearik asit polimeri sentezlendi. Enjekte edilebilir jeller daha sonra nanohidroksi apatit polimer çözeltisine dahil edilmesiyle sentezlendi. ATR-FTIR sonuçlarına göre, kitosan-stearik asit polimeri başarıyla sentezlendi. Sentezlenen jelin THP-1 ve MC3T3 hücre hatlarında sitotoksik olmadığı belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda sentezlenen jellerin oksidant özellikleri belirlendi. Sentezlenen jellerin, THP-1 hücrelerinin IL1 $\beta$  ekspresyonunu indüklediği belirlendi. Bu çalışma sonucunda, % 80 (ağırlık / hacim) hidroksi apatit içeren % 1 kitosan stearik asit polimerinin kemik dokusu rejenerasyonu için yüksek bir potansiyele sahip olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Kitosan-g-stearik asit, nanohidroksi apatit, kemik grefti, enjekte edilebilir

### Synthesis and Characterization of Chitosan Based Injectable Bone Grafts

#### Abstract

Bone is a vascularized tissue and has the significant regenerative capacity. Despite this, bone defects larger than a certain size; such as defects formed following tumor resections, and severe fractures, bone tissue regeneration is a problematic issue. Biomaterial-based treatments for bone regeneration is a growing field as a result of clinical needs. A wide range of bioactive biomaterials with a similar composition to the bone structure is of clinical interest.

In the present study, a novel injectable bone graft formulation was synthesized and characterized. Initially, chitosan-g-stearic acid (Ch-Sa) polymer was synthesized. The injectable gels were then synthesized by incorporation of nano-hydroxyapatite into the polymer solution. According to the ATR-FTIR results, the chitosan-g-stearic acid polymer was successfully synthesized. The results revealed that the gel was not cytotoxic on the THP-1 and MC3T3 cell lines. Different concentrations of the gel were used to perform the oxidant test on MC3T3 cells. Results revealed that the gels did not induce IL1 $\beta$  expression of THP-1 cells. As a result of this study, 1% chitosan-g-stearic acid polymer, containing 80 % (w/v) hydroxyapatite was found to have a high potential for bone tissue regeneration.

**Keywords:** chitosan-g-stearic acid, nano-hydroxy apatite, bone graft, injectable gels

### GİRİŞ

Kemik dokusu mühendisliği uygulamalarında, kalsiyum fosfat bileşikler sıklıkla kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin biyolojik olarak degrade olduğu ve zamanla doku oluşumunu güçlendirdiği bilinmektedir. Bu bileşikler kemiğe benzerliğinden dolayı hasarlı bölgede doğal doku oluşumunu sağlar (Block ve Thorn, 2000). Son yıllarda yapılan çalışmalarda enjekte edilebilir jellerin; hidrofiliklikleri, doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit etme kabiliyetleri ve kusurlu alanlara uygulama kolaylıkları gibi özelliklerinden dolayı kemik greftleri olarak kullanımı konusunda önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Low ve ark., 2010).

Kalsiyum fosfat macunları, işlem sırasında macun tozunun sıvı faz ile karıştırıldığı toz-sıvı ürünler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Macunlar bir spatula ile uygulanabilir veya minimal invaziv teknikler kullanılarak enjekte edilebilir. Toz-sıvı ürünlerin kullanımı kolaydır, çalışma süresini kısaltır ve hasarlı bölgenin şeklini alır. Kalsiyum fosfat bileşiklerinin metallere kıyasla en önemli avantajı, dokularla biyolojik etkileşime girebilmeleridir (Apelt ve ark., 2004).

Polimerik malzemelerin ve kalsiyum fosfat bileşiklerinin sert doku mühendisliğinde ortak kullanımının amacı, sırasıyla kemiğin organik ve inorganik kısımlarını taklit etmektir. Stearik asit, 18 karbonlu katı bir yağ asididir ve hücre dışı ve hücre içi ortamda bulunur. Ayrıca hücre zarı lipitleri arasında bulunur (Abdelmagid ve ark., 2015). Kitosan, bir muko-yapışkan polimerdir. Hücre dışı matrisin ana bileşeni olan glikozaminoglikanlara yapısal benzerlik göstermektedir. Kitosan sünger, membran tozu, ve enjekte edilebilir jel formlarında bir biyomateryal olarak geniş ölçüde çalışılmaktadır. Kitosanın mekanik özelliklerinin zayıf olduğu düşünülmektedir. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için, kitosan matrislerine farklı polimerler eklenmektedir, örneğin, poli (laktik asit-ko-glikolik asit) - kitosan karışımı (Nie ve Wang, 2007). Bu çalışmada, stearik asit katkı maddesi olarak kullanıldı ve kitosan zincirlerine kovalent olarak bağlandı.

## **MATERYAL VE METOT**

Hücre kültür ortamı ( $\alpha$ MEM), fetal sıgır serumu (FBS), cam şişeler, kitosan, stearik asit, N-hidroksisüksinimid (NHS), 1-Etil-3- (3-dimetilaminopropil) -karbodiimid (EDC), MTT, dutoro asetik asit Sigma'dan satın alındı (ABD). Toplam Oksidan Durum Test Kiti (TOS), Rel Assay Diagnostics'ten (Türkiye) satın alınmıştır.

### **Kitosan- stearik asit matriksin hazırlanması**

% 1 asetik asit içeren 50 ml saf su içerisinde 2 g kitosan çözeltisi hazırlanmıştır ve 300 rpm'de 80 ° C'de manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığına soğutuldu ve polimer metanol ile yıkandı, 4 ° C'ye soğutuldu. Yıkanan polimer -80 ° C'de donduruldu ve iki gün boyunca liyofilize edildi. Polimerin kimyasal yapısı ayrıca Fourier-dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak da tanımlanmıştır.

### **Greftlerin hazırlanması**

Kitosan – Sitearik asit polimerlerin ayrı ayrı, % 1, %2 ve % 4'lük çözeltileri hazırlandı. Solüsyonlara % 80 (ağırlık / hacim) oranında nano-hidroksi apatit eklendi ve homojenleştirildi. Çözeltilere damla damla 10M glukozamin fosfat ilave edildi. Çözeltiler bir saat 37 ° C'de inkübe edildi ve greftler elde edildi.

### **In Vitro Bozunma testi**

Enjekte edilebilir greftlerin in vitro bozunma özellikleri gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Greftlerin başlangıç ağırlığı tartıldı. Greftler 37 ° C'de pH 7.4 PBS tamponu içinde inkübe edildi. Her 7 günde bir jellerin kuru ağırlığı ölçüldü.

### **Hücre Kültürü Çalışmaları**

Sitotoksinite çalışmaları MTT testi ile indirekt olarak belirlenmiştir. Greftleri ekstrakte etmek için; greftler 72 saat boyunca 37 ° C'de, % 5 CO<sub>2</sub>'de hücre besi ortamında inkübe edildi.

Toplam oksidan durum çalışması için MC3T3 hücreleri, 2000 hücre / ml konsantrasyonunda 48 oyuklu plakalara ekildi ve gece boyunca inkübe edildi. Hücrelerdeki toplam oksidan seviyeleri, ticari bir kit kullanılarak belirlendi. Numune içindeki oksidan moleküller, ferrik iyon kompleksini ferrik iyon okside eder ve ferrik iyonları, asidik bir ortamda kromojenli renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunedeki toplam oksidan molekül miktarı ile doğrudan orantılıdır. Çalışmada kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit cinsinden ifade edilir ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eşd. / L}$ ).

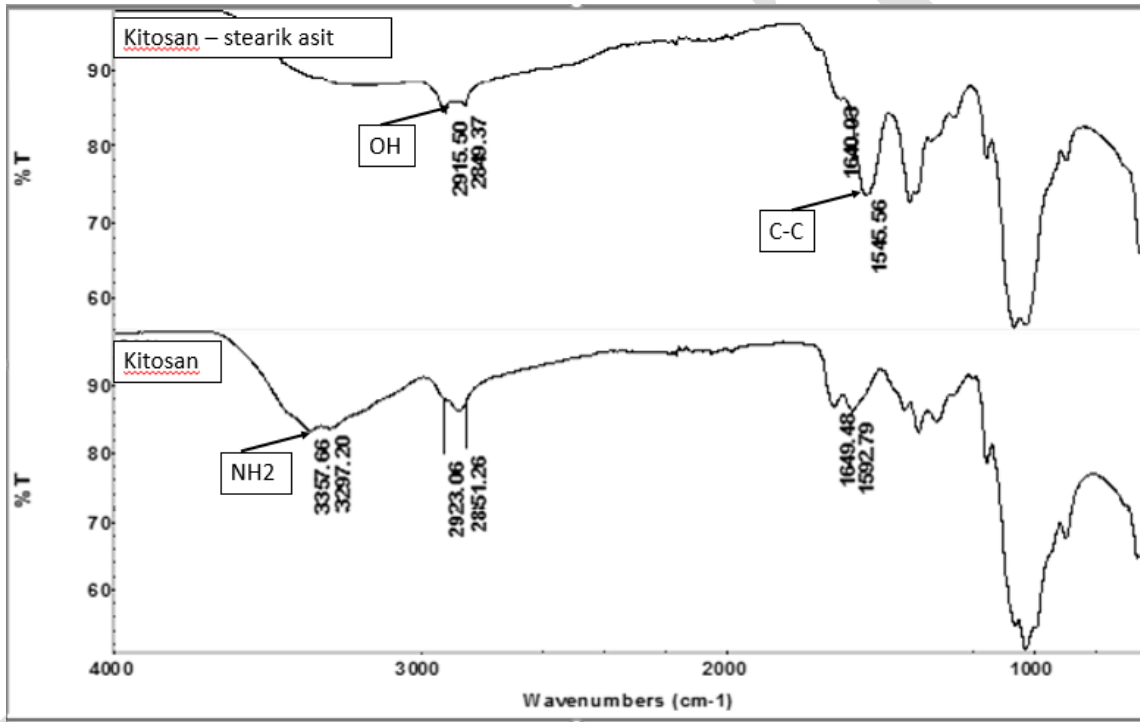
Pro-enflamasyon çalışma için THP-1 hücreleri, 2000 hücre / ml konsantrasyonunda 24 kuyulu plakalara ekilmiştir. 200nM forbol miristat asetat (PMA) kuyulara pipetlendi. Monositlerin makrofajlara dönüşümü ışık

mikroskobu ile izlendi. Kuyulardaki makrofaj oranı % 90'a ulaştığında, besiyeri atıldı ve jel özütleri pipetlendi. Plakalar 48 saat kuluçkada bırakılmıştır. Kuyulardaki besiyeri, sitokin seviyesi ölçümü için toplandı. Sitokin seviyesi, ticari insan IL1 $\beta$  kiti ile belirlendi. Kuyularda kalan makrofajlar ile MTT testi yapılarak jellerin makrofajlar üzerindeki sitotoksitesisi' de incelendi.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Kitosan- stearik asit matriksin hazırlanması

Kitosanın ATR-FTIR spektrumunda (Şekil 1), 3297 ve 3357 cm<sup>-1</sup>'de NH<sub>2</sub> grubuna ait pik noktaları görülmüştür (Bayramoğlu, 2017). Bu piklerin kitosan – stearik asit polimerinin spektrumunda kaybolduğu gözlenmiştir. 3000-3500 cm<sup>-1</sup> arasında OH grubuna ait pikler gözlemlendi. Kitosan spektrumunda 1592 cm<sup>-1</sup>'de C-C grubunun piki gözlenmiştir. Kitosan – stearik asit polimerinde, stearik asidin düz zincirlerindeki C-C uzantıları olduğu varsayılan pik C-C gruplarının yoğunluğu arttırılmıştır. Tüm bu verilerin ışında kitosan-stearik asit polimerin başarılı bir şekilde sentezlendiği gösterilmiştir.

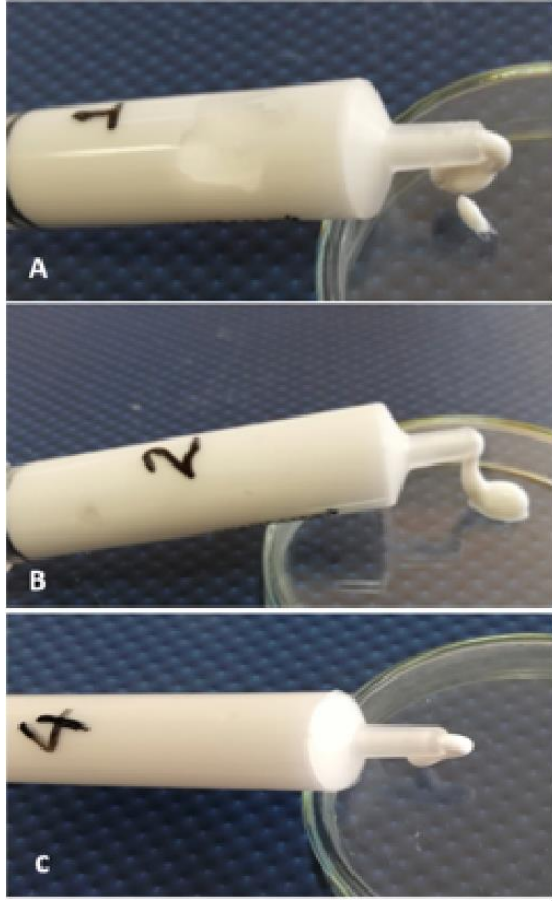


Şekil 20 Kitosan ve kitosan-stearik asit polimerlerinin FTIR sonuçları

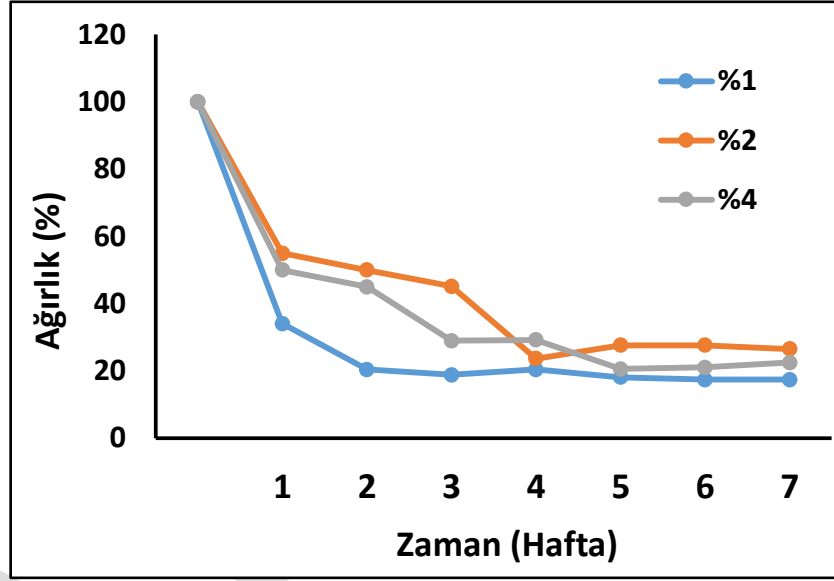
### In Vitro Bozunma testi

Hazırlanan % 1, %2 ve % 4 kitosan-stearik asit polimeri içeren greftlerin (Şekil 2) in vitro bozunma testi gravimetrik yöntem ile yapılmıştır. Şekil 3'te görüldüğü üzere greftlerin sıvı fazının ilk haftalarda yapıyı hızlıca terk ettiği ve sıvı fazın yapıyı terk ettikten sonra kalan kısmının ağırlığında 7 haftaya kadar önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Grefti oluşturan ana polimer yapının katı kısımda kalarak vücut içinde haftalar boyunca vücut içinde bozunmadan kalacağı bu çalışma ile gösterilmiştir.





Şekil 22 %1'lik greft (A), %2'lik greft (B),  
%4'lük greft (C)

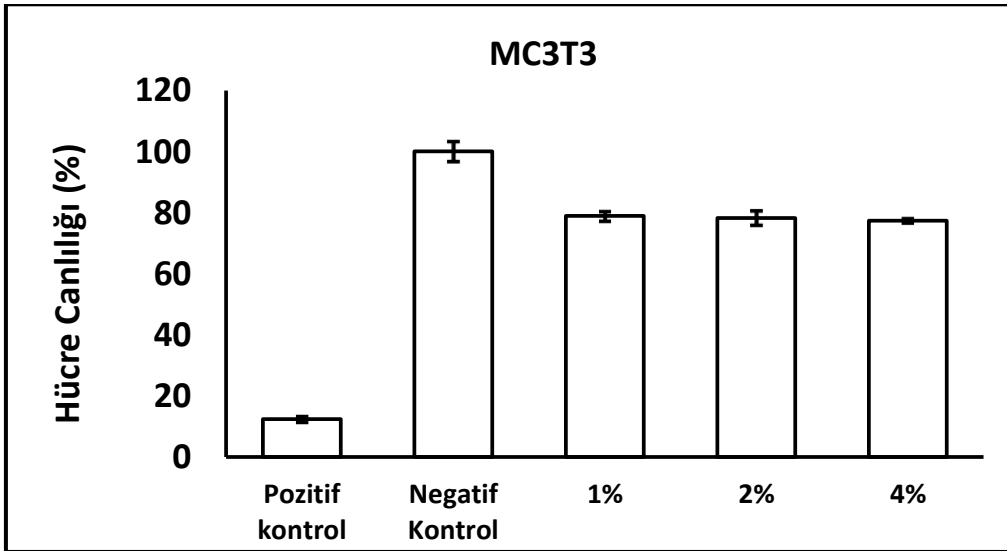


Şekil 21 Greftlerin in vitro bozunma

profilleri

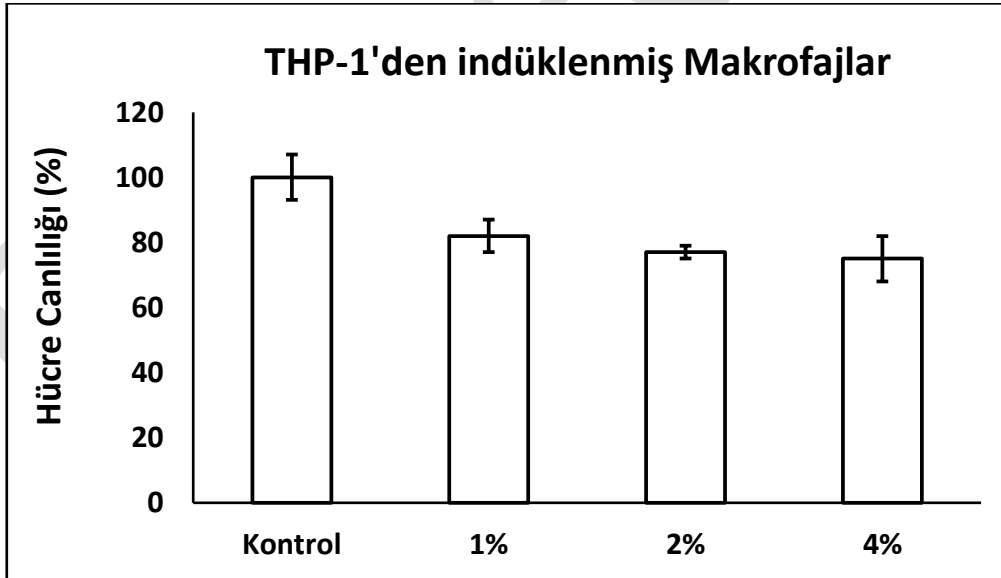
### Hücre Kültürü Çalışmaları

MC3T3 hücrelerinde sitotoksosite, THP-1 hücrelerinde pro-enflamatuar etki ve MC3T3 hücrelerinde oksidasyon etkisi in vitro olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, indirekt sitotoksosite yöntemi ve MTT testi ile greftlerin hücre canlılığı belirlenmiştir (Şekil 4). Sitotoksosite sonuçları incelendiğinde, % 1, % 2 ve % 4 kitosan-steraik asit polimeri içeren greft özleri ile kullanılan hücrelerin canlılığı sırasıyla % 80, % 78 ve % 77 olarak bulundu. Negatif kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında tüm greft içeren grupların hücre canlılığı %70'in üzerinde çıkmıştır. Bu sonuçlara bakılarak 3 greft grubunda da MC3T3 hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye neden olmadığı söylenebilir.



Şekil 23 Greftlerin MC3T3 hücre hattındaki hücre canlılığına etkileri

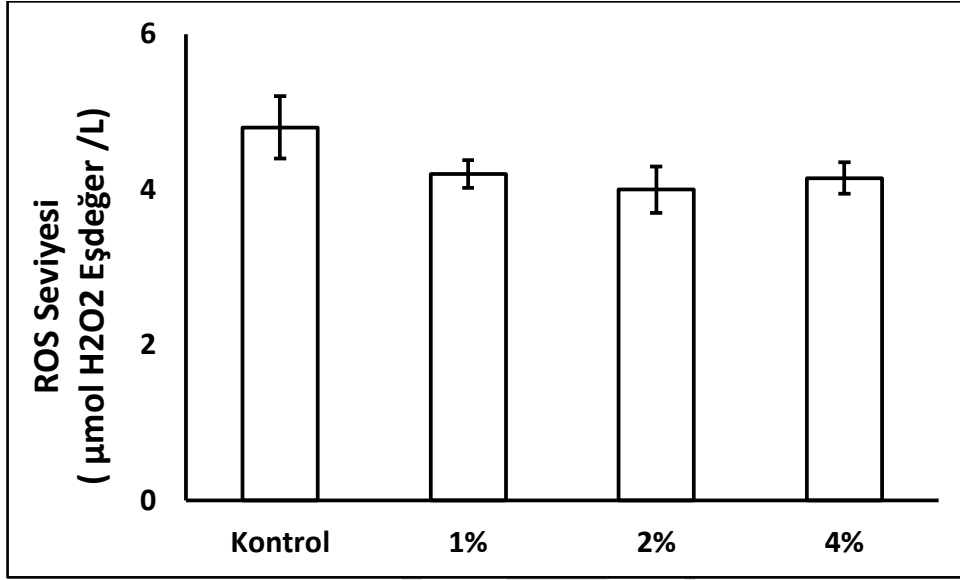
Greftlerin makrofajlar üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi (Şekil 5). Sonuçlar, deney grubundaki hücre canlılığının kontrol grubuna göre azaldığını gösterdi. Hücre canlılığı artan polimer konsantrasyonları ile ters orantılı olduğu gözlemlendi. Greftler ile muamele edilen hücrelerdeki en düşük sitotoksosite, % 1'lik konsantrasyondaki greftte gözlemlendi (%87). MC3T3 ve makrofajlarla yapılan sitotoksosite çalışmalarında, ISO 10993-5'te belirtilen hücre canlılığının %70'ten fazla olması durumunda malzeminin toksik olmadığı gerçeği göz önüne alınarak, sentezlenen greftlerin her iki hücre hattında da sitotoksik olmadığını ortaya konuldu (Standart, 2009).



Şekil 24 Greftlerin makrofajlardaki hücre canlılığına etkileri

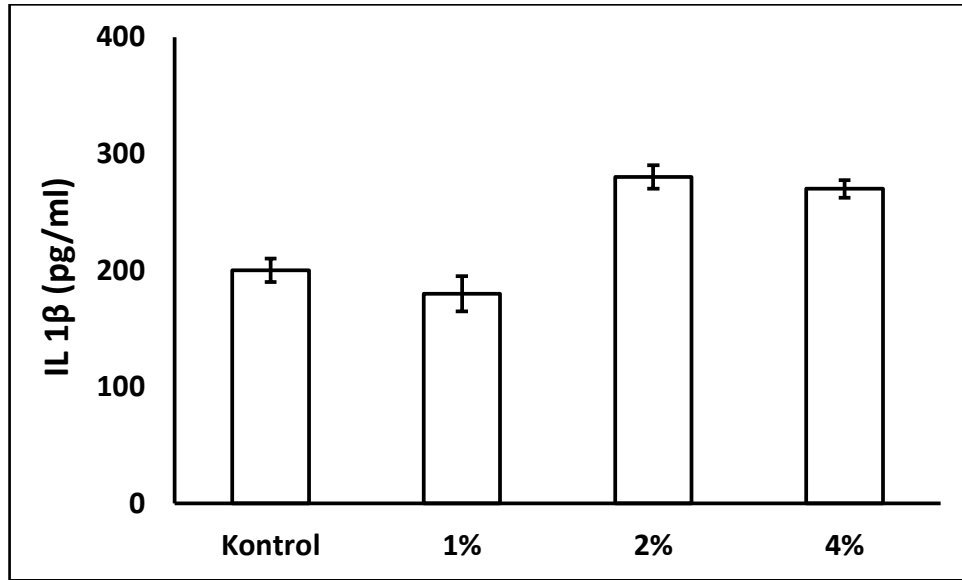
Reaktif oksijen türleri (ROS) normal metabolik aktiviteler ve patolojik koşullar nedeniyle vücutta üretilir. Normal şartlar altında, ROS'lar antioksidan sistem tarafından aktifleştirilir. ROS birikimi, farklı biyomoleküller ile reaksiyona girdiğinde hasara neden olur. Tamer ve arkadaşları ami kitosan ve sadece kitosanın antioksidan sistem üzerindeki etkisini araştırdı ve kitosan aminasyonunun antioksidan sistemi uyardığını tespit etti (Mohy Eldin ve ark., 2016). Makoto Anraku ve arkadaşları, kitosanın hemodiyaliz hastalarında oksidatif stres düzeylerini azalttığını bildirdi (Anraku ve ark.,

2014). IMo Fang ve diğ. paraquatın farelere intravitreal enjeksiyonundan sonra, retina hücrelerinde kitosan oligosakaritlerinin nükleer faktör kappa B (NF-kB) seviyesini düşürdüğünü ve böylece serbest radikal oluşumunu baskıladığını bildirdi. (Fang ve ark., 2013). Bu çalışmaların aksine, Hsien-Tsung Yao ve arkadaşları, kitosanın anti oksidanları,  $\alpha$ -tokoferol ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini azalttığını ve lipid peroksidasyonunu arttırdığını bildirdi (Yao ve ark. 2010). Bu çalışmada, grefler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MC3T3 hücrelerinin toplam oksidan seviyesinde (Şekil 6) azalma gözlemlendi. Bu azalma, greftlerin antioksidan aktivitesinin varlığı olarak yorumlandı. Farklı konsantrasyonlardaki greftler karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $P > 0.05$ ).



Şekil 25 Greftlerin MC3T3 hattı üzerinde ROS'lara etkisi

Pro-enflamatuar sitokinler çoğunlukla makrofajlar tarafından üretilir ve enflamatuar reaksiyonların şiddetini artırır. IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  pro-enflamatuar sitokinlerdir. IL-1 $\beta$  fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi immün olmayan hücreler ve ayrıca bakteriyel enfeksiyon sırasında makrofajlar tarafından salgınır (Zhang ve An, 2007). Greftlerde bulunan nano hidroksiapatitin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi, THP-1 hücre hattının IL-1 $\beta$  ifadesiyle araştırılmıştır. Sonuçlar (Şekil 7), % 1 konsantrasyonlu greftin, IL-1 $\beta$  ekspresyonunu indüklediğini gösterdi. Bununla birlikte, % 2 ve % 4 greftler kontrol grubuna kıyasla IL-1 $\beta$  ekspresyonunu arttırmıştır. % 2 ve % 4 greftler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $P > 0.05$ ). Zheng-Shun Wen ve diğ. kitosan nanopartiküllerinin anti-enflamatuar sitokin seviyesini arttırdığını bildirmiştir (IL-2, IFN-anti ve IL-10) (Wen ve ark., 2011). Baek KS ve arkadaşları 5.1 g / gün seviyesindeki kitosanın insanda IL-2, IL-12 ve TNF-alfa seviyelerini arttırdığını bulmuştur, ancak bu artış anlamlı değildi. (Baek ve ark., 2007). N. Scholer ve diğ. fare peritoneal makrofajlarındaki stearik asit parçacıklarının IL-6 seviyelerini azalttığını bulmuştur. Bununla birlikte, hücrelerde IL-12 ve TNF-alfa ekspresyonunda bir değişiklik saptamadılar (Scholer ve ark., 2002).



Şekil 26 Greftlerin makrofajlarda sentezlenen IL 1β seviyesine etkileri

## TARTIŞMA

Bu çalışma streaik asit ve kitosan polimerleri içeren enjekte edilebilir kemik greftleri hazırlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları ile polimerin sentezinin başarılı olduğu gösterilmiştir. In vitro degradasyonu belirlenmiş polimer yapısının PBS tamponu içinde haftalarca degrade olmadı ortaya konulmuştur. Hücre kültürü çalışmaları ile sentezlenen tüm greftlerin MC3T3 ve THP-1'den indüklenen makrofaj hücre hatlarında herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı bulunmuştur. Yapılan oksidasyon çalışması ile greftlerin anti oksidan kapasitesi olduğu göz önüne serilmiştir. Son olarak yapılan pro-enflamasyon çalışması ile %1'lik greftin immün sistemi uyarmadığı, diğer greftlerin immun sistemi azda olsa uyaracağı ön görülmüştür. Tüm bu yapılan analizler sonucunda streaik asit ve kitosan içeren bu polimerin enjekte edilebilir kemik greftlerinde kullanım potansiyeli yüksek bir malzeme olduğu söylebilir.

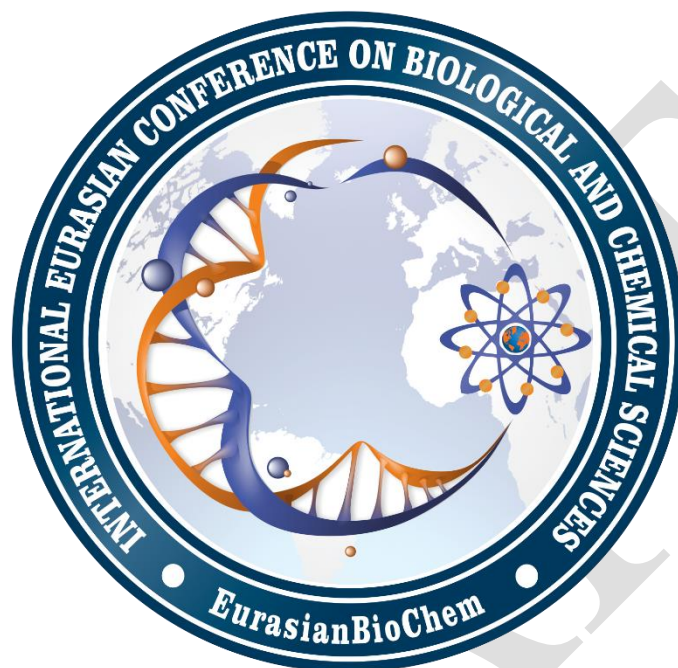
## SONUÇ

Elde edilen sonuçlar gösteriyor ki, çalışmamızda üretilen streaik asit – kitosan greftlerinin, enjekte edilebilir kemik greftleri alanında önemli bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmanın devamında, sentezlenen greftlerin hücre döngüsüne etkileri, MC3T3 hücrelerinin ALP ve RUNX2 gen ekspresyon seviyeleri bakılarak incelenecektir.

## KAYNAKLAR

- Abdelmagid, S. A., Clarke, S. E., Nielsen, D. E., Badawi, A., El-Sohemy, A., Mutch, D. M., & Ma, D. W. L. (2015). Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PloS One*, 10(2), e0116195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116195>
- Anraku, M., Tanaka, M., Hiraga, A., Nagumo, K., Imafuku, T., Maezaki, Y., ... Otagiri, M. (2014). Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. *Carbohydrate Polymers*, 112, 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.078>
- Apelt, D., Theiss, F., El-Warrak, A. O., Zlinszky, K., Bettschart-Wolfisberger, R., Böhner, M., ... von Rechenberg, B. (2004). In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 25(7–8), 1439–1451.
- Baek, K. S., Won, E. K., & Choung, S. Y. (2007). Effects of chitosan on serum cytokine levels in elderly subjects. *Archives of Pharmacal Research*, 30(12), 1550. <https://doi.org/10.1007/BF02977324>

- Bayramoğlu, G. (2017). Methacrylated Chitosan Based UV Curable Support for Enzyme Immobilization. *Materials Research*, 20(2), 452–459. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2016-0789>
- Block, J. E., & Thorn, M. R. (2000). Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures. *Calcified Tissue International*, 66(3), 234–238.
- Fang, I.-M., Yang, C.-H., Yang, C.-M., & Chen, M.-S. (2013). Chitosan oligosaccharides attenuates oxidative-stress related retinal degeneration in rats. *PloS One*, 8(10), e77323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077323>
- Low, K. L., Tan, S. H., Zein, S. H. S., Roether, J. A., Mourino, V., & Boccaccini, A. R. (2010). Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 94(1), 273–286. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31619>
- Mohy Eldin, M., Abd el-razik, T., Valachova, K., & Soltes, L. (2016). Free radical scavenger activity of chitosan and its aminated derivative. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6.
- Nie, H., & Wang, C.-H. (2007). Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, 120(1), 111–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.03.018>
- Scholer, N., Hahn, H., Muller, R. H., & Liesenfeld, O. (2002). Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 231(2), 167–176.
- Standard, I. (2009). International Organization for Standardization. ISO 10993-5. Biological Evaluation of Medical Devices- Tests for in Vitro Cytotoxicity, 2009, 34. <https://doi.org/10.1081/E-ELIS3-120044716>
- Wen, Z.-S., Xu, Y.-L., Zou, X.-T., & Xu, Z.-R. (2011). Chitosan nanoparticles act as an adjuvant to promote both Th1 and Th2 immune responses induced by ovalbumin in mice. *Marine Drugs*, 9(6), 1038–1055. <https://doi.org/10.3390/md9061038>
- Yao, H.-T., Lii, C.-K., Chou, R.-H., Lin, J.-H., Yang, H.-T., & Chiang, M.-T. (2010). Effect of Chitosan on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Oxidative Stress in Rats Fed Low- and High-Fat Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5187–5193.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>



## 2.2. POSTER PRESENTATIONS

---

---

## Study of some detergents effects against the fungi isolated from dog's shed in Baghdad

Israa A. Al-Temimay

University of Baghdad/ Collage of Science/ Biology Department.

Corresponding author e-mail: israaahmed51@yahoo.com

### Abstract

Pet dogs have been considered to be involved in the contamination of indoor air by serving as a source of providing molds at houses. In this study was executed on 38 samples that collected from dogs sheds and cages soil floor from dog market in Al-Adamia- and sok Al-kazeal in Baghdad; the isolated fungi were 97 isolate. The mold isolated were 73 isolates (75.25%) while the yeast isolated were 24 isolates (24.74%). The subsequent fungi species were isolated: *Aspergillus* spp. 28 isolate (28.86%), *Microsporum flavum* 16 isolate (16.49%) and another species in Table (2). *Aspergillus* was divided to 3 species. In the current study 6 detergents was used to determination inhibitory effect on *Aspergillus fumigatus* and *Microsporum flavum*. Dettol showed the highest inhibitory growth effect on both *Aspergillus fumigatus* and *Microsporum flavum* with inhibition zone 42 mm and 18mm in diameter respectively followed by Al Emlaaq with inhibition zone 25mm on *Aspergillus fumigatus* and 19mm on *Microsporum flavum*. Ultra Doux shampoo and One Step Gel floor cleaner they were not have any effective on growth of both *Aspergillus fumigatus* and *Microsporum flavum*.

**Keyword:** Fungi in dogs, dogs shed, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fumigatus*, detergents, Dettol.

### Introduction

During the last decades the manufacturing of big countries decreased the population's liaison with nature and animals and the transition from big homes with garden to small houses and apartments was the more significant variation that occurred (Queiroz1, 2013). To preserve the relationship contact with nature. Human has choose the smaller animals as pets such as reptiles, birds and fish, addition their publicity over other ones such as the cat and the dog.

The spores of fungi are common contamination agents of both indoor and outdoor environment (Taylor *et al.* 2013). However, the dogs shed conceders a sources of some fungi pathogens to human and animals (Moriello *et al.*, 2017). Fungi they are important from the point of contamination to foodstuffs, deterioration of diverse natural materials, and deleterious effect to human health. Regarding human health, the organisms can cause not only infection to human body such as lung and skin but also symptoms such as nasal stuffiness, eye irritation, wheezing, or skin irritation to some peoples. Exposed to molds may also cause more severe reactions to those people with serious allergies that from time to time accompany fever and shortness of breath. Recently, with the increase of people's concern on indoor environment (Jang *et al.*, 2007). Veterinary medical mycology often differs from the human counterpart by, among others, the clinical aspects the variety of fungi involved and the antifungal drugs available for use. Immunocompromised, induced by other infective agents or by medications, has led to a significant leap in the number of people affected and the species of fungi involved in human infections since the 1980s (Enoch *et al.*, 2017; Elad, 2018). In veterinary mycology, this phenomenon was not observed. Thus, changes in the range of fungi involved in animal mycoses stems mostly from emergence of new pathogens such as *Cryptococcus gattii* or *Sporothrix brasiliensis*, increased awareness, or changes in taxonomy due to improved molecular techniques such as has happened for the *Pseudallescheria/Scedosporium/Lomentospora* group (Elad, 2011). The aim of this study, isolation and identification the fungi (yeast and molds) which associated with dogs shed and tested the activity of some detergents (found in local market in Baghdad and dog breeder may be used to cleaning the houses of dogs) to inhibition the growth of this fungi.

### Materials and methods

#### Collection of Samples

In this study samples were collected from the soil floor of 38 dogs sheds or cages during the period 2-30 November 2018 from dog market in Al-Adamia- and suke Al-kazeal in Baghdad governorate figure 1. The soil was collected in clean continuers and was cultured in mycology lab.

Figure (1)- Dogs sheds and cages in Baghdad (Al-Adamia- and suke Al-kazeal).



### Culture Media:-

Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) and potatoes Dextrose Agar (PDA) (Himedia/ India) were used in this research as fungal media. This media were prepared depending to the manufactory and it sterilized by autoclave at 15 psi pressure and 121 C° for 15 minute. This medium (with antibiotic Ceftriaxone (5ml/L)) (Nevakson/Turky) was used for culture purposes to isolated and growth fungi. The samples (38 samples) were cultured and examined by dilution plate method. The plates media were incubated at room temperature (25±1 °C) and at (37±1°C) for 2- 5 days depending on the growth rate of fungi. The growth of molds and yeasts colonies was appeared on both Sabouraud's Dextrose Agar (SDA) medium and Potato Dextrose Agar (PDA) medium, and then all cultures were identified according to their colonial morphology and microscopic characteristics. (Koneman *et al*,1978; Al-Temimay and Hasan, 2016).

### Fungi Isolation and identification

To get pure cultures Sub-culturing was applied then the growth cultures were microscopically examined to check for fungi colony. The purified fungal isolates were identified up to species level as far as possible by a detailed study of their colonial characters and microscopic morphology in lactophenol cotton blue, and comparison of their characteristics with the descriptions of the species in the standard books and manuals (McGinnis, 1980; De Hoog *et al.*, 2000). Yeast isolates were identified according to macroscopic observation, microscopic morphology, and by the rapid identification method API 20 C (Tietz *et al.*, 1995). The identification of the molds was based on macroscopic morphology and microscopic observation and by applying standard taxonomic criteria (De Hoog *et al.*, 2000).

### Detergents

In this study detergents were available in local market in Baghdad was used as antifungal against. The types of these detergents was listed in table (1). The inhibitory effect of them was studied on the most frequent isolates species of fungi (by using the well diffusion method); all detergents were prepared by serial dilution method, to give the concentration of 10-1 mg/ml. vol /vol.

Table (1) - Types of detergents was used in this study.

No.	Detergent type	Manufacturer company	original
1	Fairy platinum	Cleanright	Czech Republic
2	Al Emlaaq	Humoda	Jordan
3	Dettol	Reckitt Benckiser	Malaysia
4	Splash power gel	Spartan modern industry	Jordan
5	Ultra Doux shampoo	Garnier	Egypt
6	One Step	Venus for chemicals	Jordan

### Results

This research was executed on 38 samples that collected from dogs sheds and cages soil floor from dog market in Al-Adamia- and sok Al-kazeal in Baghdad governorate; the isolated fungi were 97 isolate all identified according to (Chandler *et al.*, 1989) Table (2). The mold (Filamentous fungi) isolated were 73

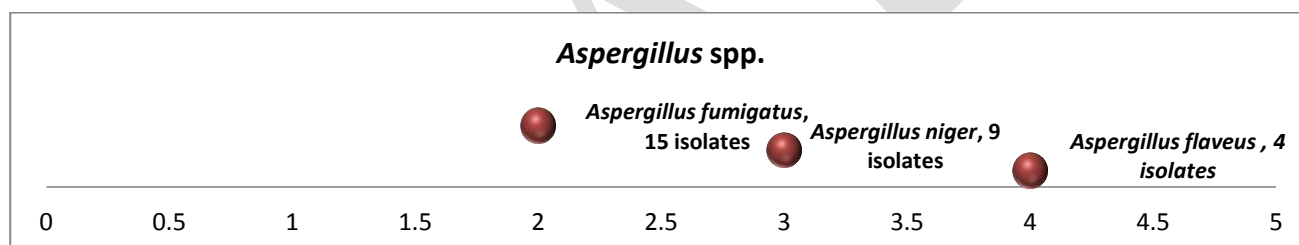


isolates (75.25%). There were growth on SDA and PDA media at 25C° and 37C°, while the yeast isolated were 24 isolates (24.74%). All fungal isolates were identified according to the feature of the colony in culture medium and chemical test API 20C as well as the microscopically examination. The subsequent fungi species were isolated: *Aspergillus* spp. 28 isolate (28.86%), *Microsporium flavum* 16 isolate (16.49%) and another species in Table (2). *Aspergillus* was divided to 3 species; figure (2) showed that *Aspergillus fumigatus* gave the highest frequency (15) isolate, while *Aspergillus flavus* gave the lowest frequency (4) isolate.

In the current study 6 detergents (are available in local markets in Baghdad which could be used by dogs breeder) was used to study their inhibitory effect on the most frequent isolated fungi (mold) in this research, such as *Aspergillus fumigatus* and *Microsporium flavum*. The six detergents were used as inhibitory growth factors for above two fungi were investigated of table (3). Dettol showed the highest inhibitory growth effect on both *Aspergillus fumigatus* and *Microsporium flavum* with inhibition zone 42 mm and 18mm in diameter respectively Figure (3) followed by Al Emlaaq with inhibition zone 25mm on *Aspergillus fumigatus* and 19mm on *Microsporium flavum*. Ultra Doux shampoo and One Step Gel floor cleaner they were not have any effective on growth of both *Aspergillus fumigatus* and *Microsporium flavum*.

**Table (2) - The frequency of fungal isolated from dogs sheds.**

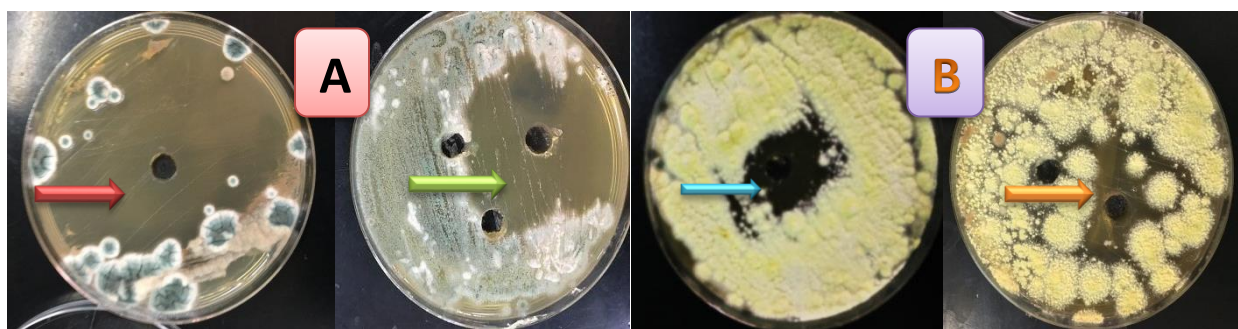
No.	Fungal isolated	No. of isolated fungi	Percentage%
1	<i>Aspergillus</i> spp.	28	28.86
2	<i>Microsporium flavum</i>	16	16.49
3	<i>Trychophyton</i> spp.	12	12.37
4	<i>Penicilium</i> spp.	10	10.30
5	<i>Hortaea werneckii</i>	7	7.21
6	<i>Candida</i> spp.	24	24.74



**Figure (2)-** *Aspergillus* spp. frequency that isolated from dogs sheds.

**Table (3)-**Inhibition growth zones of detergents types with concentration of 10<sup>-1</sup> mg/ml. vol /vol. on *Aspergillus fumigatus* and *Microsporium flavum*.

No.	Detergent types	Inhibition zone of <i>Aspergillus fumigatus</i> (mm)	Inhibition zone of <i>Microsporium flavum</i> (mm)
1	Fairy platinum	15	10
2	Al Emlaaq	25	19
3	Dettol	42	18
4	Splash power gel	5	3
5	Ultra Doux shampoo	0	0
6	One Step	0	0



**Figure 3-**( A)Inhibition zone of Dettol (red raw) and Al Emlaaq (green raw) on *Aspergillus fumigatus* with concentration  $10^{-1}$  mg/ml. vol /vol. (B) Inhibition zone of Dettol (blue raw) and Al Emlaaq (orang raw) on *Microsporium flavum* with concentration  $10^{-1}$  mg/ml. vol /vol.

## Discussion

Dogs breeding were increased at the last years in Iraq; so the study foxed on the fungi that may isolated from dogs shed and investigated what molds are present on pet dogs cared in houses in Baghdad. The isolated fungi in present study were *Aspergillus spp.*, *Microsporium flavum*, *Trychophyton spp.*, *Penicilium spp.*, *Hortaea werneckii* and *Candida spp.* These results was compatible with the research of (Jang *et al.*, 2007) when he isolated the fungi from hair and skin of 70 pet dog. Both from hairs and skin, *Aspergillus* was the most commonly found genus and followed by *Cladosporium* and *Penicillium*. These results indicate that *Aspergillus*, *Cladosporium*, and *Penicillium* are common groups of molds in pet dogs.

Household detergents are different types of chemical that is better identified for their enormous use in washing manufactures and household cleaning product (Chaturvedi and Tiwari, 2013). Disinfectants may cause microbial demolition either by remove a sulphonydic group from organisms or by destroy the cell membrane (Reeder *et al.*, 2011; Adenike *et al.*, 2011). Also, the mode of action of disinfectants is thought to be existing to destroy the protein, lipids or nucleic acids in the cells or its cytoplasmic membranes, even though microorganisms differ in degree of response to chemical germicide (Obi and Onyekaozuru, 2015). As for Dettol disinfectant, according to (Atayese *et al.*, 2010), it has been found that Dettol contains antifungal activity since it produced 100% lethal effect of *C. albicans*. The study of (Abed and Hussein, 2016) in this study antifungal effects of formalin and Dettol® were more potent than other agents (Iodine, Sodium Hypochlorite, Ethanol alcohol and Potassium Permanganate) according to laboratory tests ((MIC, sensitive test, Zone growth diameter and inhibition zone) that used to evaluate the effects these agents as antifungal. When he tested different Antiseptics and Disinfectans agent against *A. flvus* (The age of colonies 7 days at 28 °C ) and *C. albicans* , the age of colonies 24 h at 37 °C ) in the SDA media. Chloroxylenol (Dettol) also known as 4-chloro-3,5-dimethylhydroxybenzene, parachlorometaxyleneol, 4 chloro 3,5-dimethyl phenol, 4 chloro 3,5 xyleneol, and 4 chloro meta xyleneol) is a substituted phenol with a molecular formula of  $C_8H_9ClO$  . Its mechanism of antimicrobial action is by the denaturation of proteins and inactivation of enzymes in the microorganisms, alters the permeability of the cell membrane that could result in the uncoupling of oxidative phosphorylation, inhibition of active transport, and loss of pool metabolites due to cytoplasmic membrane damage (Abed and Hussein, 2016).

## References

1. Taylor, M.; Gaskin, S.; Bentham, R.; Pisaniello, D. Airborne (2013). Fungal profiles in office buildings in metropolitan Adelaide, South Australia: Background levels, diversity and seasonal variation. *Indoor Built Environ*, 23; 1002–1011.
2. Moriello, K. A.; Coyner, K.; Paterson, S. and Mignon, B. (2017). Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology*. *Vet Dermatol*, 28: 266–e68. DOI: 10.1111/vde.12440.
3. Elad, D. (2018). Therapy of Non-Dermatophytic Mycoses in Animals. *Journal of fungi*, 4,120; 2-16. doi:10.3390/jof4040120.
4. Enoch, D.A.; Yang, H.; Aliyu, S.H.; Micallef, C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. in *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols*. *Methods Mol. Biol.*, pp: 1508-1513.

5. Elad, D. (2011). Infections caused by fungi of the *Scedosporium/ Pseudallescheria* complex in veterinary species. *Vet. J.* 2011, 187, 33–41.
6. Queiroz<sup>1</sup>, B.; Pereyra, C. M.; Keller<sup>1</sup>, K. M.; Almeida<sup>1</sup>, T.; Cavaglieri, L. R.; Magnoli, C. E. and da Rocha Rosa, C. A. (2013). Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 57, 405-411.
7. Jang, K. S.; Yun, Y. H.; Yoo, H. D. and Kim, S. H. (2007). Molds Isolated from Pet Dogs. *Mycobiology* 35(2): 100-102.
8. Al-Temimay, I. A. and Hasan, A. M. (2016). Isolation and identification of fungi from the droppings of some poultry and some detergents effect on some of them. *Iraqi Journal of Science*, Vol. 57, No.4B, pp: 4362 -2640.
9. McGinnis, M.R. (1980). *Laboratory handbook of medical mycology*. Academic Press. New York. pp. 80-94.
10. De Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J. and Figueras, M. J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2nd ed. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, & Universitat Rovira I Virgili, Reus.
11. Tietz, H. J., Kssner, A., Thanos, M., de Andrade, M. P, Presber, W. and Schonian, G. (1995). Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginalisolates of *Candida albicans* from Africa. *J Clin Microbiol*, 33: 2462-65.
12. Chandler, F.W.; Kaplan, W. and Ajello, L. (1989). A color atlas and textbook of the histopathology of mycotic disease. *Wolf Medical Publications*, Ltd. Pp. 78-83.
13. Chaturvedi, A. D. and Tiwari, K.L. (2013). Effect of Household detergents (Surfactants) Degraded through aquatic fungi. *Recent Research in Science and Technology*, 5(5): 12-16.
14. Reeder, N. L., Xu, J., Youngquist, R. S., Schwartz, J. R., Rust, R. C. and Saunders, C. W. (2011). The antifungal mechanism of action of zinc pyrithione. *British Association of Dermatologists*. Vol. 165, Issue Supplement s2. Pp: 9-12.
15. Adenike, A.O., Ogunshe, Oluwatoyin, A., Omotoso and Akindele, M. T. (2011). Soaps and Disinfectants / Germicides as Adjunct Antimycotic Cleansing-Agents in Cases of Vulvovaginal Candidiasis. *Advances in Biological Research* 5 (6): 282-290.
16. Obi, C. N. and Onyekaozuru, A. O. 2015. Antimicrobial activities of some Household disinfectants on selected human pathogens in Umuahia, Abia State, Nigeria. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 4, Issue 12. pp.: 171-183.
17. Atayese, A. O., Effedua, H. I., Oritogun, K. S., Kareem, K. T. and Ogunledun, A. (2010). Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Chlorinated and Non-chlorinated Antiseptics against *C. albicans*. *Academia Arena*: 2(9). pp: 35-40.
18. Abed, A. R. and Hussein, I. M. (2016). In vitro study of antibacterial and antifungal activity of some common antiseptics and disinfectants agents. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences* Vol. (7) No. (1)B; 148-159.

## Performance evaluation on vanadium transport through functionalized polymer membrane by TREN as a carrier

I. Touarssi<sup>1\*</sup>, Y. Chaouqi<sup>1</sup>, I. Mourtah<sup>1</sup>, T.Eljaddi<sup>1</sup>, N.Sefiani<sup>1</sup>, L. Lebrun<sup>2</sup>, M. Hlaibi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Génie des Matériaux pour Environnement et Valorisation (GeMEV), Equipe I3MP, Faculté des Sciences Aïn Chock, B.P. 5366, Maârif, Casablanca, Maroc.

<sup>2</sup> Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS), UMR 6270 du CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, F-76821 Mont-Saint-Aignan, France.  
MESRSFC / CNRST PPR 2 Project\*\*

Corresponding author e-mail: [touarssi.imane@gmail.com](mailto:touarssi.imane@gmail.com)

### Abstract

Over the years, the development of mechanically stable synthetic or natural polymeric membranes having advanced or novel functions in the various membrane separation processes has increased significantly. One of the important techniques explored is related to the affinity membranes, by the introduction of carriers directly or by covalent grafting for the extraction of rare metals such as vanadium from industries acid leaching solution, in order to solve the problem of the depletion of the main natural resources and the huge consumption of vanadium in different industries. The present study aimed to describe the phenomenon of facilitated extraction of vanadium ions ( $\text{VO}_2^+$ ); through a functionalized polymer membrane (FPM) and to evaluate its performance, this membrane based on polysulfone (PSU) and Tris 2-aminoethyl amine (TREN) as a carrier has been characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and Energy-dispersive X-ray spectroscopy. Herein we exploited membrane featuring stability in acidic conditions versus operation temperature and time. The performance of the elaborated membrane was quantified by determining the macroscopic parameters; the permeabilities  $P$  and the initial flows  $J_0$ . The diffusion of the substrate in  $\text{VO}_2^+$  ions through the organic phase as a function of the formation and dissociation reactions of the unstable entity ( $\text{VO}_2^+$ -TREN) was determined by calculating the microscopic parameters; apparent diffusion coefficient  $D^*$  and  $K_{ass}$  association constant. In order to explain the results obtained for the studied processes, the thermodynamic and activation parameters (energy  $E_a$ , enthalpy  $\Delta H$ , entropy  $\Delta S$ ) have been evaluated, the analysis of their values makes it possible to identify whether the studied process is controlled by kinetics or pathway energy.

**Keywords:** Vanadium, FPM, carrier, microscopic and macroscopic parameters, Activation parameters

### 1. INTRODUCTION

Recently, the toxicity of vanadium with high concentrations in the ecologic system presents a danger to both man and animals health and environment, their capture from industrial effluents are getting more attention from pollution and nutritional field.

Although lots of remediation techniques have been evolved, such as microbial transformation, adsorption, solvent extraction, etc. They are chemical and energy consuming and/or requires supplementary post-treatment to remove undesired by-products. Membrane technologies by using the facilitated transport phenomenon, present interesting qualities, including simplicity of manufacture and process, modular design, compactness and economic which make the membranes more convenience for most industrial purpose.

Two main technologies were involved in facilitated transport: supported liquid membranes (SLM) and inclusion polymer membranes (M. Shamsipur et al. (2003), A. Zaghbani et al. (2005), C. Fontas (2005). Recently, a new approach consists of the introduction of functional groups as  $-\text{CONH}_2$ ,  $\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , etc into membranes. Functionalized membrane based on suitable solid supports containing a specific carrier, is capable of transporting species through the membrane phase and have shown a substantial interest in research.

The objective of the present work was to synthesize and characterize a membrane with TREN chemically functionalized polysulfone and studying the facilitated transport of  $\text{VO}_2^+$  ions by sheet flat mode. Parameters as the substrate initial concentration, the temperature that affects the diffusion of the metal ions were also studied. Activation energy  $E_a$  and thermodynamic functions  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  of those investigated systems have been determined.

## 2. METHODOLOGY

### 1.1 Materials

The utilized polymeric support is “polysulfone UDEL 1700” (Mw= 35,000) provides by Solvay Advanced Polymer, Polyvinylpyrrolidone (PVP) (MW:40000) and N,N-Dimethylformamide (DMF) from Sigma-aldrich were used as additive and solvent respectively for membrane preparation. The vanadium solution is obtained from Sigma-Aldrich by hydrolysis of ammonium metavanadate (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>). The concentrated mineral acids are hydrochloric acid HCL (37%) and nitric acid HNO<sub>3</sub> (69%) all of the analytical grades and were purchased from Aldrich.

### 1.2 PSU/PVP/TREN membrane synthesis

Functionalized polymer membranes are developed using the Loeb-Sourirajan technique (B. Chakrabarty et al. (2008)), using 20 wt% polysulfone Udel® polymer in DMF under vigorous agitation for 24 hours at 25°C, an appropriate quantity of PVP (5%) was introduced as copolymer. Subsequently, a well-defined quantity of carriers was added to the polymer solution, after intense agitation and for several hours until the total dissolution of carriers. The resulting polymer-extractive agent solution was spread on a glass plate. The membrane flow and the glass plate were immersed in a water bath maintained at room temperature, the membrane was thoroughly washed and stored with distilled water.

### 1.3 Membrane characterization

In order to analyse the relation between the membrane morphology and its behaviour versus our substrate, their characterization was carried out by different non destructive techniques, scanning electron microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (FEI-FEG 450), The attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) by THERMO SCIENTIFIC, The measurements were made in a wavelength range of 650 to 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 1.4 Facilitated transport experiments

The transport experiments were carried out using two compartments transport cell. The membrane (dia. = 5.5 cm) was placed between two glass compartment having 150 mL volume in each one. The cells were sealed and clamped tightly. One of the compartments (feed phase) was filled with a solution containing NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> in 1 mol/L of HNO<sub>3</sub> solution, obtaining VO<sub>2</sub><sup>+</sup> as a dominated form. The second compartment (receiving phase) was filled with 1 mol/L HCL solution. The feed and receiver phases were continually stirred with a magnetic stirrer to reduce the concentration gradient at the membrane–solution interfaces. The transport process of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions was monitored as a function of time by taking a sample from receiving phases and analyzing it with UV-VIS spectroscopy at 250nm in different temperature 298, 303 and 308 K.

The kinetic and thermodynamic model adopted (T. Eljaddi et al. (2015)) is based on Fick's laws calculating parameters related to the facilitated extraction process, as follows:

$$J = P \Delta C / E \quad (1)$$

If the concentration of permeate Cr in the receiving phase at each instant is known. The concentration in the source phase is Cs = C<sub>0</sub> - Cr. and the difference in concentration between the two phases is as follows:

$$\Delta C = C_s - C_r = C_s = C_0 - 2 C_r \quad (2)$$

On the other hand, the expression of the diffusion rate of the substrate as a function of the flux through the surface of the membrane is written:

$$dC_r / dt = J \times S / V \quad (3)$$

S: the active surface of the membrane and V: volume of the receiving phase. The combination of equations (1), (2) and (3) and after integration makes it possible to get the following kinetic equation (4):

$$P \times (t - t_l) = (E \times V / S) [1/2 \text{Ln} (C_0 / C_0 - 2C_r)] \quad (4)$$

Macroscopic and microscopic parameters of the transport of VO<sub>2</sub><sup>+</sup> ions from feed to receiver compartments at a given time was calculated according to a kinetic and thermodynamic model using first and second Fick's law, as the following equations (5),(6),(7),(8):

$$P = a V_x E / 2S \quad (5)$$

$$J_0 = P C_0 / E \quad (6)$$

Where  $P$  is the permeability,  $a$ : straight segment obtained from kinetic function plotting  $-\ln(C_0 - 2Cr)$   $S$ : membrane active surface,  $V$ : receiving phase volume,  $E$ : membrane thickness and  $J_0$ : initial flux.

$$K_{ass} = (OO) / p \quad (7)$$

$$D^* = E / (OO) \times [T]_0 \quad (8)$$

$p$ : the slope and  $(OO)$ : the interception of the line segment obtained from the lineweaver-burk function  $1 / J_0 = f(1 / C_0)$ .

The Arrhenius empirical relation applied to the initial flux parameter ( $J_0$ ) makes it possible to study the influence of the temperature factor according to the following relation: Eq. (5)

$$J_0(T) = A_j \exp(-E_a / RT) \quad (5)$$

$A_j$ : term proportional to the favorable substrate interaction numbers with the carrier.  $E_a$ : the activation energy for the formation of the transition state relative to the kinetically determining step which is the diffusion of the complex (T-S).

The adoption of the theory of transition state complexes (Eyring's theory) makes it possible to calculate the values of the activation parameters, the enthalpy  $\Delta H^{\#}_{ass}$ , and the entropy  $\Delta S^{\#}$ , according to the following expressions: Eqs. (6),(7)

$$\Delta H^{\#}_{ass} = E_a - 2500 \text{ J.mol}^{-1} \text{ à } 298 \text{ K} \quad (6)$$

$$\Delta S^{\#} = R [(\ln(A_j) - 30,46)] \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \text{ à } 298 \text{ K} \quad (7)$$

### 3. RESULTS & DISCUSSION

#### 3.1 Morphological modifications

SEM micrographs were used to examine the membrane surface changes when casting solution constituents were varied. Figure 1 shows the surface and cross-section of a PSU-PVP and PSU-PVP-TREN membranes. The surface and the cross-section micrographs of the functionalized membrane show a porous homogenous structure with cavities in cone form with much better interconnected pores compared to the PSU-PVP membrane which presents a random voids due to the nonsolvent-induced phase separation.

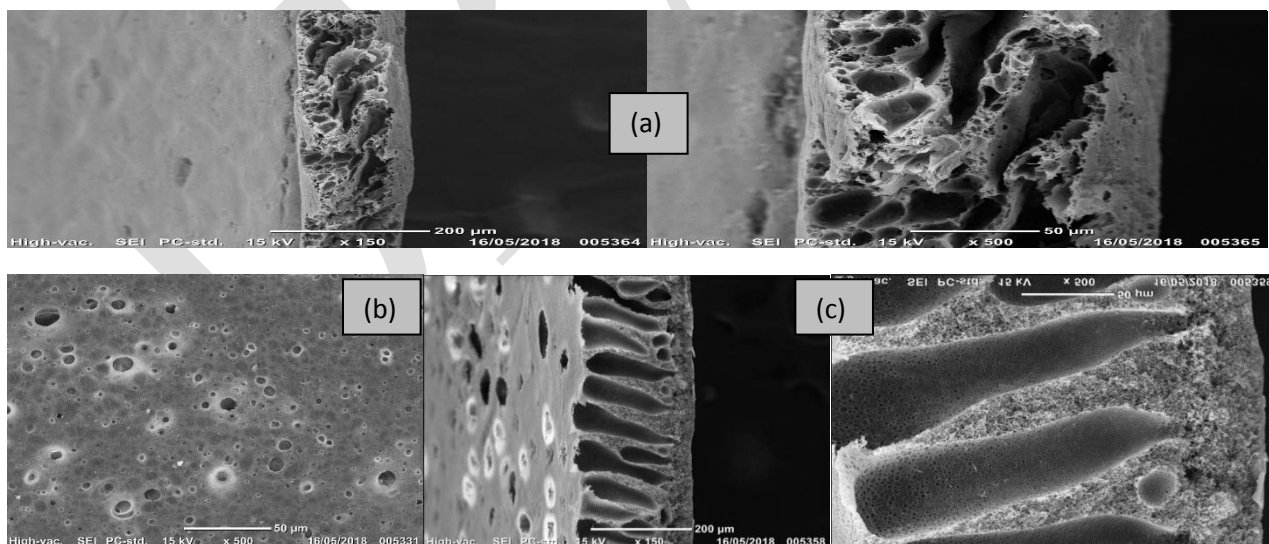


Fig.1: SEM micrographs: a) Cross-section of PSU/PVP membrane b) Surface of PSU/PVP/TREN membrane c) Cross-section of PSU/PVP/TREN membrane

Further information on membrane structure can be taken from the EDX analysis. Figure 2 shows the EDX spectroscopy results of the functionalized membrane, indicating that it consists of carbon (C) oxygen (O), sulfur (S) and nitrogen (N) elements. EDX results provided in table 1 confirm the grafting of TREN into the matrix polymeric.

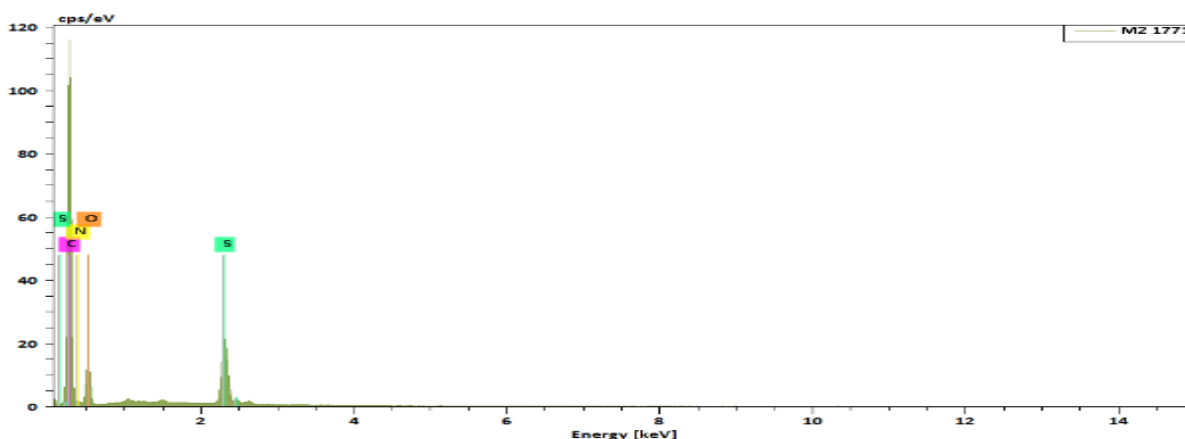


Fig.2: EDX Spectra of the PSU/PVP/TREN membrane

Table1: Chemical elements of used functionalized membrane

Element	Line s.	Mass [%]	Mass Norm. [%]	Atom [%]
Carbon	K-Serie	70.06	70.64	77.47
Nitrogen	K-Serie	5.75	5.79	5.45
Oxygen	K-Serie	17.79	17.94	14.77
Sulfur	K-Serie	5.58	5.63	2.31
		<b>99.17</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

### 3.1 Structural findings

ATR-FTIR was employed to elucidate the membrane structural improvements when TREN was used as a carrier Fig. 3, The broad peak within the range  $3490$  to  $3330$   $\text{cm}^{-1}$  is owing to  $-\text{OH}$  groups stretching vibration of residual water remaining in the membrane matrix. The N-H stretching vibration of amine salts shows in the range  $2800$ - $3000$   $\text{cm}^{-1}$ . The  $\text{C}=\text{O}$  vibration groups show a prominent peak at  $1660$   $\text{cm}^{-1}$  correspondent to amide cabonyl of PVP. The absorption bands at  $1245$ ,  $1146$  and  $1105$   $\text{cm}^{-1}$  are appointed to the symmetric and asymmetric stretching vibrations of  $-\text{S}=\text{O}$  present in the based polymer chains.

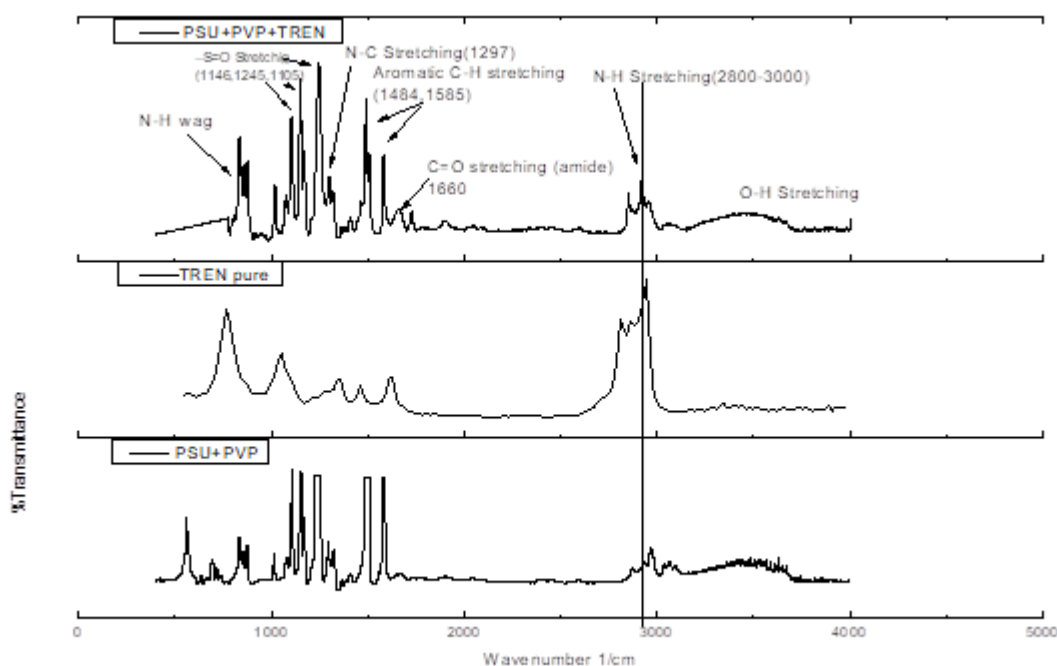


Fig.3: ATR-FTIR spectrum for positively charged of the functionalized membrane as compared with Pure TREN and PSU/PVP membrane

### 3.2 Application of the kinetic and thermodynamic model for determining of macroscopic and microscopic parameters to experimental extraction data

The experimental data collected in the form of  $-\ln(C_0 - 2C_r)$  versus time (t) were a linear segment and used to determine the different transport parameters. The experimental effective permeability and initial flux have been determined to normalize the experimental flux with the membrane thickness and the active membrane surface, as found in Eq. (5).

#### 3.2.1 Effect of carrier nature and $\text{VO}_2^+$ ions concentration

In much previous research (P. Sun et al. (2015), Pu Xiong et al. (2017)), primary and tertiary amine could extract  $\text{VO}_2^+$  ions after their immersion in the acid solution (namely amine salts), the amine salt  $\text{RNH}_3^+$  has good extracting ability on vanadium because of the inductive effect. With this the extraction of  $\text{VO}_2^+$  ions was carried out for different initial concentrations  $C_0$ ; ranging in 0.0125 to 0.1; the Fig. 4 shows obviously that the permeability P of the membrane varies inversely with the initial flux and it enhances with decreasing the  $\text{VO}_2^+$  ions concentration. Nevertheless, the initial flux  $J_0$  of  $\text{VO}_2^+$  ions through the membrane changing as the initial concentration  $C_0$ .

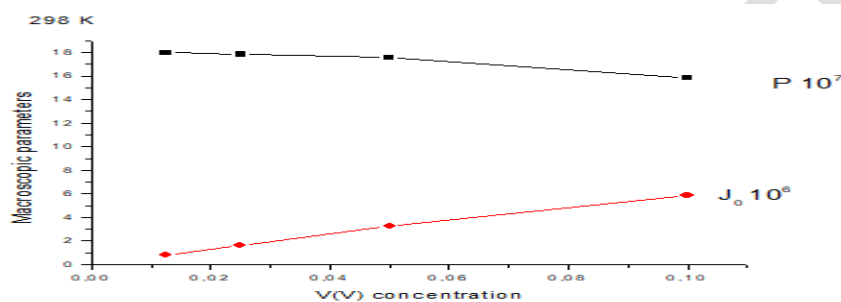


Fig. 4: The evolution of macroscopic parameters versus  $\text{VO}_2^+$  ions concentration in  $T=298\text{ K}$ ,  $[\text{H}_3\text{O}^+]=1\text{ mol/L}$

#### 3.2.2 Effect of temperature

Fig 5. displays the experimental performance of the functionalized membranes tested in this work in a temperature range in 298 to 308. A preliminary assessment of these results reveals that this functionalized membrane is more performance at high temperature. Actually, some research (C. A. Kozłowski et al. (2007)) reports that temperature factor significantly influences the permeability of various polymer membranes used in the process of facilitated transport. An augment in temperature leads to an increase in the membrane permeability, thus, higher fluxes. Therefore, these facilitated processes are controlled by the two terms, energy and structure. To clarify this important effect of temperature factor on the performance of the used membrane and to identify these two conditions, we determined from the slope and the intercept of lineweaver-burk straight the apparent diffusion coefficient  $D^*$  and the association constant  $K_{\text{ass}}$ . The results indicate that these two parameters evolve in the opposite direction, that means, when the formed entity diffuse faster, automatically it is less stable.

In order to explain the behavior of the prepared membrane, we have examined the energetic aspect of  $\text{VO}_2^+$  ions facilitated transport process, by using the Eqs. (5),(6),(7). According to the obtained values (Table 2) the activation energy is relatively low which indicates the transition states of association reactions of the  $\text{VO}_2^+$  ions with the TREN are ordered states ( $\Delta S^\ddagger$  negative), therefore the passage by this state is easy through this functionalized membrane, and the movement of the substrate into the membrane phase, is not a pure diffusion, but it is a movement by successive jumps of substrate on carrier fixed sites, like an association/ dissociation reactions.

The high dissociation enthalpy of the activated complex indicated the strong binding of  $\text{VO}_2^+$  ions with fixed sites, which highly obstruct the facilitated transport across the fixed-site membrane, and the negative value of  $\Delta H^\ddagger$  indicates that the facilitated transport of  $\text{VO}_2^+$  system is exothermic. The pre-exponential factor value reveals that the favorable diffusion of the carrier into the polymer matrix depends on the interaction sites orientation.



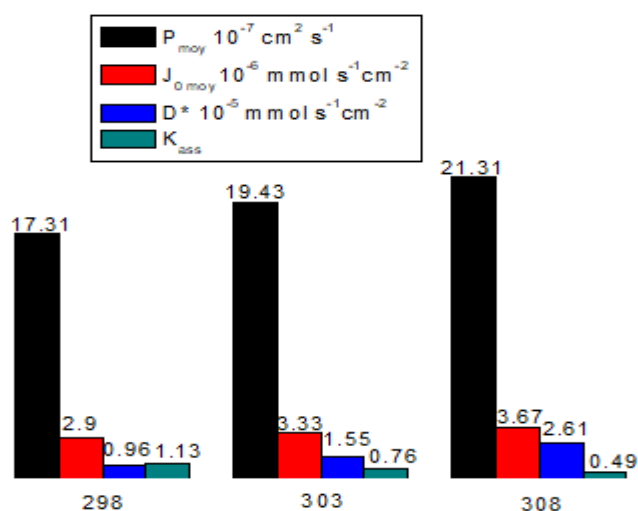


Fig 5: The temperature effect on macroscopic and microscopic parameters of facilitated transport of  $\text{VO}_2^+$  ions across PSU/PVP/TREN membrane

Table 2.: Values of activation and thermodynamic parameters of facilitated transport phenomenon of  $\text{VO}_2^+$  ions across PSU/PVP/TREN membrane.

Ea	17.89 KJ mol <sup>-1</sup>
Aj (pre-exponential factor)	0.4018
$\Delta S^\ddagger$	260.70 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
$\Delta H^\ddagger$	15.41 KJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta H_{diss}$	79,43 KJ mol <sup>-1</sup>
$\Delta H_{th}$	-64.01 KJ mol <sup>-1</sup>

#### 4. CONCLUSION

The characterization methods used have verified the PSU membrane functionalization by the TREN and the transport experiments have demonstrated that the presence of sulphonic acid groups with amine groups in PSU/PVP/TREN membrane resulted to significant enhancement in the membrane efficiency to transport  $\text{VO}_2^+$  ions across the membrane.

According to the collected data, a fixed-site jumping extraction mechanism takes a place characterized by a binding of the substrate successively to several fixed carrier ( $D^*$  around  $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )

A relatively weak influence of temperature on apparent diffusion coefficient can conclude that At low temperature, the reaction is under kinetic control and at high temperature, the reaction is under thermodynamic control.

#### References

- M. Shamsipur, S.Y. Kazemi, G. Azimi, S.S. Madaeni, V. Lippolis, A. Garau, F. Isaia, Selective transport of silver ion through a supported liquid membrane using some mixed aza-thioether crowns containing a 1,10-phenanthroline sub-units as specific ion carriers, *J. Membr. Sci.* 215 (2003) 87.
- A. Zaghbani, R. Tayeb, I. Bonnamour, C. Felix, F. Vocanson, R. Lamartine, M. Dhahbi, P. Seta, Affinity membranes for the extraction of  $\text{Cd}^{2+}$  ions by facilitated transport ensured by a new thiacalix[4]arene complexing agent incorporated in supported liquid membranes (SLM), *J. Membr. Sci.* 258 (2005) 5.
- C. Fontas, R. Tayeb, S. Tingry, M. Hidalgo, P. Seta, Transport of platinum(IV) through the supported liquid membrane (SLM) and polymeric plasticized membrane (PPM), *J. Membr. Sci.* 263 (2005) 96.
- B. Chakrabarty, A.K. Ghoshal, M.K. Purkait, Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties, *J. Membr. Sci.* 309 (2008) 209–221.

- T. Eljaddi, O. Kamal, El H. El Atmani, I. Touarssi, L. Lebrun and M. Hlaïbi, Effective Supported Liquid Membranes for Facilitated Extraction Phenomenon of Cadmium (ii) Ions from Acidic Environments: Parameters and Mechanism, The Canadian Journal Of Chemical Engineering volume 9999 (2015)
- P. Sun, K. Huang, H. Liu, Separation of V and Cr in alkaline aqueous solution using acidified primary amine N1923, Hydrometallurgy (2015).
- Pu Xiong, Yimin Zhang, Jing Huang, Shenxu Bao, Xiao Yang, Chun Shen, High-efficient and selective extraction of vanadium (V) with N235-P507 synergistic extraction system, chemical engineering research and design 1 2 0 ( 2 0 1 7 ) 284–290.
- C. A. Kozłowski, Facilitated transport of metal ions through composite and polymer inclusion membranes, Ind. Eng. Chem. Res. 2007, 46, 5420.

DRAFT

## Effect of 532nm CW Nd:YAG laser on antibiotics susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn and wound infections

Tamara H. Zedan<sup>1\*</sup>, Reem N. Ibrahim<sup>2</sup>, Shahlaa M. Salih<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular & Medical Biotechnology, College of Biotechnology, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq.

<sup>2</sup>Department of Molecular & Medical Biotechnology, College of Biotechnology, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq.

<sup>3</sup>Department of Molecular & Medical Biotechnology, College of Biotechnology, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq.

### Abstract

This study was designed to evaluate the effect of laser diode light at 532nm on susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates from burn and wound infection to antibiotics. The susceptibility of three isolates of *K. pneumoniae* (T40, T92 and T105) supplied from previous study was tested toward nine antibiotics before radiation. Results showed that all isolated were sensitive to Imipenem (IMP) and Ciprofloxacin (CIP) and resistance to other antibiotics. The susceptibility of all isolates after subjecting to laser diode light at 532nm wavelength 3mW, for 1, 2 and 3min was evaluated against nine antibiotics, results showed that a significant increase in susceptibility for all isolates toward imipenem and ciprofloxacin.

**Key word:** Nd: YAG Laser, Antibiotic Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, Burn and Wound Infections.

### INTRODUCTION

LASER (light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) is one of the scientific discoveries of the 20<sup>th</sup> century that has been demonstrated to have many exciting application because of its extraordinary properties, which are not found in normal light sources (Drummen, 2012). The unique of property of laser is that its light waves propagate very long distances with a very little divergence, and such waves have fixed phase relationship (coherent) that may make laser light so narrow in bandwidth, so powerful and so easy to focus on a given object. A further remarkable feature of laser is the concentration of its energy to extremely high intensities, and the intensity remains almost constant over long distances because of a low divergence (Brown and Arnold, 2010).

*Klebsiella pneumoniae* is widely distributed in the gastrointestinal, urinary and respiratory tracts of healthy people (Bhuiyan, 2016). It cause opportunistic infections mainly nosocomal infections, it is a common hospital-acquired pathogen causing severe respiratory infections such as pneumoniae (Sharma et al., 2016). Other infections caused by this organism include urinary tract infection, wound infection, abscesses, sepsis, inflammation and diarrhea (Zedan, 2017), most *K. pneumoniae* are hospital associated with a high fatality rate if incorrectly treated.

Treatment of *Klebsiella* infections is complicated (Chiu et al., 2013). *K. pneumoniae* have different virulence factors which give the bacteria the ability to invade the host, such as capsular polysaccharide, lipopolysaccharide, serum resistance, siderophore production, fimbriae and other factors such as the production of urea and enterotoxin (Aher et al., 2012). However, antibiotic resistance properties are the major factor in its pathogenicity that it resists for wide spectrum of antibiotics and specially  $\beta$ -lactam antibiotics (Shaikh et al., 2015 ; Al-Janaby and Alhasnawi, 2017). This is due to the prevalence of infections acquired in hospital which led to the orientation of the research on alternative therapies (Dubey et al., 2013).

*K. pneumoniae* isolates develop prominent capsular structures composed of complex acidic polysaccharides (Khalid et al., 2017). Important differences in virulence between the serotypes. Serotype K1 and to a lesser extent K2, are associated with highly invasive disease, it considered among the most pathogenic (Fang et al., 2012 ; Zedan et al., 2013). The capsular polysaccharide synthesis (cps) gene cluster consists of a serotype specific region with genes that are relatively conserved between serotypes on either side (Doud et al., 2009).

## MATERIALS AND METHODS

### BACTERIAL ISOLATES

The T40 and T105 isolates of *K. pneumoniae* were isolated from burn infection and the isolate T92 was isolated from wound infection. All isolates were supplied by Biotechnology Dept./Al-Nahrain Uni.

### ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TEST (DISC-DIFFUSION METHOD)

Antimicrobial sensitivity test of *K. pneumoniae* isolates was carried out against the antibiotics Amikacin (AK), Amoxicillin+Clavulanic acid (AMC), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxone (CRO), Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (CN), Imipenem (IMP), Sulfamethoxazole+Trimethoprim (CXT) and Tetracyclin (TE) using the standard disc diffusion method as follows: Five milliliters of sterile 85% sodium chloride were inoculated with fresh culture of each *Klebsiella* isolate and compared with 0.5 McFarland. A sterile cotton swab is dipped into the inoculums and swabbed evenly across the surface of Muller-Hinton agar plate. The inoculated plates were placed at room temperature for 10min. to allow absorption of excess moisture, then the antibiotic discs were placed firmly on the inoculated plates with a forceps to ensure contact with the agar then incubated at 37°C for 24hrs. After incubation, diameters of the inhibition zones were measured in mm. and compared with that of standards of the National committee for clinical laboratory standards (NCCLS) (Barry, 1976).

### IRRADIATION THE BACTERIA WITH DIODE PUMPED SOLID STATE (DPSS) LASERS

Light source used was Nd:YAG laser, output power 150mW that emits; light in a collimated beam (diameter of 3mm.) with a wavelength of 532nm. *Klebsiella* spp. was cultivated in brain heart infusion at 37°C for 18hr.; culture was centrifuged followed for 10min. at 4000rpm. The cell pellet was diluted in sterile phosphate buffer pH=7, and adjusted to concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. A diluted bacterial suspension was put in tubes and exposed to laser light at different periods (1,2 and 3)min. and power density of 2.125W/cm<sup>2</sup> for each sample (AL-Aamirry, 2003).

### STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed statistically using SPSS program version 23. Results were expressed using simple statistical parameters such as mean and standard error. Differences between means were assessed by ANOVA, followed by Duncan and Tukey's tests.

## RESULTS AND DISCUSSION

### ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *K. pneumoniae* ISOLATES

Susceptibility of the 3 isolates of *K. pneumoniae* was examined towards nine different antibiotics using disc diffusion method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) guideline. The results showed that all isolates were sensitive to IMP and CIP and the highest sensitivity was recorded by T105 isolate to IMP (15.0±2.3)mm, moreover all isolates were resistant to antibiotics used in this study Table (1).

This result was in agreement with (Amin et al. 2009) in Pakistan who noticed that the percentage of resistance to cefotaxime and ceftriaxone were 82.5% and 85%, respectively. However, (Nasehi et al., 2010) reported that *K. pneumoniae* isolates were 27% resistant to ceftriaxone and this may be related to possessing of β-lactamase enzymes (cephalosporinase) which are able to the inactivate cephalosprins through cleavage β-lactam ring of the drug.

While resistance to the penicillin group included ampicillin, amoxicillin+clvulanic acid and piperacillin which were 97.5% for ampicillin and amoxicillin+clavulanic acid and 95% for piperacillin. Resistance of *K. pneumoniae* to the cephalosporin group and penicillin group may be related to possessing of β-lactamase enzymes (cephalosporinase and penicillinase) which are able to the inactivate pencillins and cephalosprins through cleavage β-lactam ring of the drug (Stock and Wiedmenn, 2001; Pagani et al., 2006). Results showed also that the resistance of *K. pneumoniae* isolates to the aminoglycosids group included amikacin and gentamicin were 17.5% and 30%, respectively. Similarly, Nasehi et al., (2010) found that resistance to amikacin was 17.5%. In this regard, Feizabadi et al., (2007) found that *Klebsiella* isolates producing extended spectrum β-lactamase enzymes were resistant to aminoglycosids.

**Table1.** Antibiotics susceptibility test of *Klebsiella pneumoniae* isolates before radiation

Antibiotic symbol	Susceptibility of isolates (Mean±SE)Diameter (mm.)		
	T40	T92	T105
ceftriaxone (CR)	R	R	R
amikacin (AK)	R	R	R
imipenem (IMP)	11.6±1.2	10.6±1.7	15.6±2.3
ciprofloxacin (CIP)	10.0±1.1	9.0±2.0	10.0±1.1
tetracyclin (TE)	R	R	R
sulfamethoxazole (SXT)	R	R	R
cefotaxime (CTX)	R	R	R
gentamycin (CN)	R	R	R
Amoxiclin and clavulanic acid (AMC)	R	R	R

Resistance of *Klebsiella* isolates to ciprofloxacin which belongs to the quinolones group was 20%. Fluit et al. (2001) reported that the resistance to quinolones is related to change in antibiotic-enzyme (GyrA) binding site.

While resistance to Sulfonamide group included (Trimethoprim+Sulphamethoxazole) was 77.5%. This combination blocks two consecutive steps in bacterial biosynthesis of essential nucleic acids and proteins and is usually bactericidal (Fluit et al., 2001).

Feizabadi et al. (2008) observed that *K. pneumoniae* isolated from respiratory tract was sensitive against imipenem. In another study *K. pneumoniae* isolated from different clinical specimens was susceptible to imipenem (Feizabadi et al., 2008). *K. pneumoniae* possess Carbapenemase enzymes that responsible for the Carbapenem resistant (Deshpande et al., 2010). The result of the susceptibility of *K. pneumoniae* to the imipenem agreed with results of Lim et al. (2009) and Nasehi et al. (2010) who revealed that only one isolate was resistant to the imipenem. According to this result it can be considered that imipenem as best treatment against *K. pneumoniae*.

Results revealed that susceptibility of T40 to IMP was significantly higher after of radiation compared with before radiation (12.6, 24, and 17 vs. 11.6)mm. respectively. Susceptibility of T92 was (10.6, 17.6 and 10.6)mm. respectively compared with before radiation (10.6) mm. Susceptibility of T105 was (16, 24 and 14)mm. respectively in comparison with results before radiation 15.6mm. The highest susceptibility of all isolates after radiation was recorded after 2min. Table(2).

**Table2.** Susceptibility of *Klebsiellapneumoniae*isolates against Imipenem before and after radiation with laser diode

Isolate	Before radiation	Treatment (Mean ±SE) Diameter (mm.)		
		1 min.	2 min.	3 min.
T40	11.6±1.2 b	12.6±1.7 b	24.0±2.3 a	17.0±1.5 b
T92	10.6±1.7 b	10.6±1.7 b	17.6±1.4 a	10.6±1.7 b
T105	15.6±2.3 b	16.0±2.0 b	24.0±1.1 a	14.0±1.1 b

Different letters mean significant differences between means of before and after radiations ( $p < 0.05$ ).

As shown in Table (3) results exhibited a significant increase in susceptibility of all isolates against CIP after radiation in comparison with before radiation. Susceptibility of T40 (19.6, 20.3 and 27.3 vs. 8)mm. The inhibition zone of T92 was (19.3, 22.6 and 26.6 vs. 9) mm. Susceptibility of T105 was (25.6, 24.3 and 26 vs. 10)mm. Also results showed that the highest sensitivity after 3min. of radiation.

**Table3.** Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates against Ciprofloxacin before and after radiation with laser diode

Isolate	Before radiation	Treatment (Mean ±SE) Diameter (mm.)		
		1 min.	2 min.	3 min.
T40	8.0±1.1 c	19.6±2 b	20.3±2.1 b	27.3±1.7 a
T92	9.0±2 b	19.3±1.7 b	22.6±2.4 ab	26.6±1.4 a
T105	10.0±1.1 b	25.6.0±1.2 a	24.3±1.2 a	26.0±2.3 a

Different letters mean significant differences between means of before and after radiations (p<0.05).

Changes in sensitivity of bacterial isolates to the antimicrobial agents after treatment with diode laser is may be due to the combination effect of laser and antimicrobial agent making the bacterial cell more sensitive to the antimicrobial agents. The sensitivity of bacteria to antibiotic may be due to the changing in bacterial pumping system (efflux pump) that mainly responsible on bacterial resistance to antibiotics such as (B-lactams, aminoglycoside) (Al-Jailawi et al., 2014). Failure of bacteria to produce specific enzymes that chemically modify specific antibiotic also may be increased the bacterial sensitivity to the antibiotics. (Karu et al., 1993). Bacterial resistance to antibiotics has been reviewed by (McDonnel and Russell, 1999) they suggest that a bacterial envelope could potentially be a mechanism for this resistance. They believe that bacterial envelope to which they are referring in their review is the capsule (Held et al., 1995; Singh et al., 2012) Gram-negative bacteria cell walls contain the lipopolysaccharide layer. This lipopolysaccharide layer is more likely to be damaged by laser radiation.

**Conclusions:** The effect of at 532nm wavelength 3mW diode laser increases the susceptibility of *Klebsiellapneumoniae*T40, T92 and T105 isolates to imipenem and Ciprofloxacin. The exposure time 2min gave the highest susceptibility for IMP for all isolates and exposure time 3min gave the highest susceptibility for CIP for all isolates.

## REFERENCES

- 1- Aher T, Roy A, Kumar P 2012. Molecular detection of virulence genes associated with pathogenicity of *Klebsiella* spp. isolated from the respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats. Journal of Veterinary Medicine, 67(4): 249-252.
- 2- Al-Aamirry L 2003. Effect of He-Ne laser 632.8nm and diode Laser 890nm on *Streptococcus mutans* Isolated From Patients of Carivos Teeth. M.Sc. thesis. Baghdad University, Iraq.
- 3- Al-Jailawi M, Zedan T, Jassim K 2014. Multiplex-PCR Assay for Identification of *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Pharm. Sci. Rev. and Res. /India,26(1): 112-117.
- 4- Al-janaby A, Alhasnawi H 2017. Phenotypic and Molecular Characterization of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Different Clinical Sources in Al-Najaf Province-Iraq. Pakistan Journal of Bio. Sci., 20(5): 217-232.
- 5- Amin A, Ghumro P, Hussain S, Hameed A 2009. Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tertiary care hospital in Pakistan. Malaysia Journal of microbiol., 5(2): 81-86.
- 6- Barry A 1976. The antimicrobial susceptibility test: principles and practice. Lea and Febiger, Philadelphia, U.S.A.
- 7- Brown M, Arnold C 2010. Fundamentals of Laser-Material Interaction and Application to Multiscale Surface Modification. In: Sugioka K, Meunier M, Piqué A (eds), Laser precision microfabrication. Springer Series in Materials Science, vol. 135. Springer, Berlin, Heidelberg.

- 8- Bhuiyan A 2016. Microbiological Evaluation of Gram Negative Bacteria from Different Street Foods Responsible for Enteric Diseases. Master Thesis, Department of Pharmacy, East West University: Dhaka.
- 9- Chiu S, Wu T, Chuang Y, Lin J, Fung C, Lu P, Wang J, Wang L, Siu K, Yeh K 2013. National surveillance study on carbapenem Non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in taiwan: the emergence and rapid dissemination of kpc-2carbapenemase. Plos One, 8(7): 1-7.
- 10- Deshpande P, Rodrigues C, shetty A, kapadi F, Hedge A, soman R 2010. New Delhi Metallo-B-lactamases (NDM-1) in *Enterobacteriaceae*: Treatment option with carbapenems compromised. Journal of the Association of phys. of India., 58.
- 11- Doud M, Zeppego R, Molina E, Miller N, Balachandar D, Schneper L, Poppiti R, Mathee K 2009. A k2A-positive *Klebsiella pneumoniae* causes liver and brain abscess in a Saint Kitt's man. International Journal of Medicine Sci., 6(6): 301-304.
- 12- Drummen G 2012. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques Illuminating Biological and Biomedical Research. Molecules, (17): 14067-14090.
- 13- Dubey d, Raza F, Sawhney A, Pandey A 2013. *Klebsiella pneumoniae* renal abscess syndrome: a rare case with metastatic involvement of lungs, eye, and brain. Case Reports in Infect. Dis.: 1-3.
- 14- Fang C, Lin Y, Lin J, Chen T, Yeh K, Chang F, Chuang H, Wu H, Tseng C, Siu L 2012. *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. Emerging Infect. Dis.,18(8): 1322-1325.
- 15- Feizabadi M, Etemadi G, Rahmati M 2007. Antibiotic resistance patterns and genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from the respiratory tract. Tanaffos.,6: 20-25.
- 16- Feizabadi M, Farahani A, Rahmati M, Asadi S 2008. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients. R. Ci. Méd. Boil., Salvador., 7 (3): 273-279.
- 17- Fluit A, Visser M, Schmitz F 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiol. Rev.: 836-871.
- 18- Held T, Adamczik C, Trautmann M, Cross A 1995. Effects of MICs and Sub-MICs of Antibiotics on production of Capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*, Antimicrob. agent and chemother., 39(5): 1093-1096.
- 19- Karu T, Piatibrat L, Kalendo G, Serebriakov N 1993. Changes in the amount of ATP in HeLa cells under the action of He-Ne laser radiation. BiullEksp Bio. Medicine,115(6): 617-618.
- 20- Khalid H, Yousif S, Jubrael J 2017. Bacteriological and Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Kurdistan region, Iraq. Sci. Journal of University of Zakho, 1(1): 158-163.
- 21- Lim K, Yeo C, Yasin R, Balan G, thong K 2009. Characterization of multidrug resistant and extended spectrum B-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysia hospital. Journal of Medicine microbiol., 58: 1463-1469.
- 22- McDonnell G, Russell A 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance, Amer. Soci. for Microbiol.,12(1): 147-179.
- 23- Nasehi L, shahcheraghi F, Nikbin V, Nematzadeh S 2010. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates Tahrán, Iran. Iranian Journal of Bisc Medicine sci., 13(3): 111-118.
- 24- Pagani L, Migliavacca R, Luzzar F, Giacobone E, Perille M, Micheletti P, Amicosante G 2006. Comparative activity of Piperacillia/Tazabactam agents clinical isolate of extended-spectrum B-lactamases producing *Enterobacteriaceae*. Journal of Clinical Microbiol., 22: 61-68.
- 25- Shaikh S, Fatima F, Shakil S, Mohd S, Rizvi D, Kamal M 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi Journal of Bio. Sci., 22(1): 90-101.
- 26- Sharma N, Gupta A, Walia G, Bakhshi R 2016. A retrospective study of the changing trends of antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine samples over last 3years (2012-2014). Journal of Natural Sci., Biology and Medicine,7: 39-42.
- 27- Singh V, Thakur K, Chauhan P 2012. Effect of poly herbal formulation against *Klebsiella pneumoniae* causing pneumoniae in children's, Asian Journal of Pharm.Clinical Res., 5(1): 69-75.
- 28- Stock I, Wiedemann B 2001. Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains. Journal of Medicine Microbiol., 50: 396-406.

- 29- Zedan T 2017. Molecular Discrimination of *Klebsiella oxytoca* using Polymerase Chain Reaction Targeted Polygalacturonase (pehX) Gene. International Journal of Curr. Microbiol. App. Sci, 6(6): 2092-2098.
- 30- Zedan T, Al-Jailawi M, Jassim K 2013. Determination of K1 and K2 capsular serotypes for *Klebsiella pneumoniae* using *magA* and *k2A* genes as specific molecular diagnosis tools, International Journal of Biol. and Pharma. Res., 4(12): 1283-1288.

DRAFT



## Study antibacterial activity of ethanolic extract of wild mint leaves against different pathogenic bacteria isolated from burn wound infections

Bushra hindi Saleh, Reem Naem Ibrahim, Mohaned Hasan Hussein

Department of molecular and medical biotechnology/College of biotechnology

### Abstract

Burn wounds is one of the most important infections in hospitals that being colonized and infected with Gram positive and gram negative bacteria. *Mentha arvensis* is one of the plants that possess antimicrobial properties including different parts like flower, bark, stem, leaves. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Mentha arvensis* leaves was investigated against different pathogenic bacteria isolated from burn wound infections by well diffusion methods. Gram negative bacteria *pseudomonas aeruginos*, *klebsiella pneumoniae* and gram positive *staph aureus* were isolated from burn infections. Different concentration of *mentha arvensis* leaves ethanolic extract (50,150,200) mg/ml were used. Results revealed that *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract at high concentrations (150,200) mg/ml have strong antibacterial activity against pathogenic bacteria (*Staph aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) isolated from burn infections in which the diameter of zone of inhibition were respectively increased with increased the concentration of ethanolic extract of *Mentha arvensis* leaves while *klebsiella pneumoniae* was resistant to ethanolic extract of *mentha arvensis* at all concentration.

### Introduction

Wild Mint is one of the important medicinal plant that belongs to the Lamiaceae family. Its a perennial herbaceous plant that reach to 10–60 cm heightend. The plant leaves are placed in pairs, simple ,hairy, long about 1–2 cm width with a serrated coarsely margin . The flowers of it are pale pink or white on the stem at the bases of the leaves (Thawkar *et al.*,2016).

Typical composition of Wild Mint are menthone, menthol , isomenthone , , methyl acetate, cineole , limonene, methofuran (Mustafa *etal.*,2018). 25% of the active substances in medicines that produced pharmacologically are obtained from plants. Also, active substances of most artificially produced medicines are structurally similar to the chemicals which were firstly isolated from plants (Mimica *et al.*, 2003).

*Mentha* species have a significant role that used for various purposes including medical, nourishing aims and as spice. The whole plant is aromatic, anaesthetic, antispasmodic, antiseptic, also has agents that fight against inflammation, remove gas from the digestive system, induce sweating, assist or promote the flow of menstrual fluid, induction of milk secretion, relieve fever and thirst, give strength and tone to the stomach (Mahboubi ,2017). A tea made from the leaves of *Mentha arvensis* has traditionally been used in the treatment of fevers, headaches, digestive disorders. The extract of leaves has been applied to areas of swelling and pain, also used for treatment of rheumatism and arthritis (Biswas *etal.*,2014). The essential oil of leaves is act as antiseptic, Analgesic, Antimicrobial, Antioxidant, Antibacterial, Sedative, Anti-inflammatory, Cytotoxic, Anticancer, Anti-allergic (Freires *et al.*,2015).

Burn injuries are considered as one of the major health problem throughout the world. Also its considers as one of the major types of injury that effects about 1% of peoples in the world and its responsible for 1% of total major disease in hospital. Burn injuries (>95%) occurs in developing countries that lead to significant morbidity and mortality (Barret and Herndon, 2003).

Skin is considers as first barrier against foreign bodies. Serious thermal injury lead to a total loss in the skin surface over large body areas. burn wound infection occurs when microbial entry, then spread in the tissue causes tissue invasion, and systemic infection that correlates with the size of the burn injury. The body aids to maintain homeostasis by initiating a process of contraction and coagulation of blood vessels immediately after a burn injury (Norbury *et al.*, 2016).

Burn wound considers as a favorable area for opportunistic colonization of microorganisms with exogenous and endogenous origin. Burn wound sepsis is occurs due to imbalance in the normal equilibrium between bacteria and host immune defense that lead to numerical increase in bacteria (Keen *et al* , 2010).

## Materials and methods

### Isolation of bacteria

(50) samples were collected from patients suffering from burns from (2) hospital in Baghdad. For isolation of bacteria from cases of burn infection, a sterile swabs were used for taken samples, then culture on nutrient agar, MacConkey & Blood agar, then incubated at 37°C for 24 hrs.

For diagnosis of *Klebsiella pneumoniae* in samples, lactose fermenting colonies were transferred from MacConkey agar and subcultured on EMB agar plates while non-lactose fermented colonies were transferred and streaked on King A, King B medium for isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. Gram positive *Staph spp* were isolated from blood agar, then subcultured on Mannitol salt agar and Staph 110 and incubated at 37°C for 24 hrs.

### Diagnosis of bacteria

Isolates of bacterial were diagnosed by many steps include direct microscopic observation, Gram staining, certain Biochemical tests, Catalase, coagulase tests & API20E system.

### API 20E system for Identification of gram negative bacteria

Gram negative bacteria were identified by this system that contain 20 performance standard biochemical tests. Tap water 5ml were put in the incubation tray to provide a humid atmosphere during incubation. Many pure isolated colonies were transferred from MacConkey agar and dilute in a sterilized saline until reach to turbidity of ( $1 \times 10^8$ ) McFarland tube no 5, then inoculate it in API 20E microtubes system by a sterile Pasteur pipette according to the manufacturer's instruction in which filled to end of both the tubes and couple section of CIT, VP and GEL microtubes while add oil to H<sub>2</sub>S, ADH, LDC, URE, and ODC micro tubes, other tests are filled to the end of the tubes, then put in incubator at 37°C for 24 hrs. Recorded all the reactions that don't need addition of reagents, while One drop of Kovacs's reagent, ferric chloride and Voges-Proskauer reagent were added to the corresponding microtubes. Identification of the isolates by using the analytical profile index supplied by the manufacturer.

### *Staph aureus* identification

From mannitol salt agar, selected isolated colonies were used for identification of *Staph aureus* that were subjected to further tests:

#### Catalase test

A few isolated colonies is transferred from mannitol salt agar to a slide then few drops of 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is added. Bacteria give positive results for enzyme if gas bubbles appeared.

#### Coagulase tube test

pure culture of *S. aureus* were inoculated in nutrient broth and incubated at 37°C for 24 hours, two tube that contain citrated rabbit plasma 0.4 ml were used, then culture 0.1 ml was put in first tube while 0.1ml of normal saline were added to second tube. Tubes were incubated at 37°C for 24 hours, then read the results.

#### Antibiotic sensitivity Test

This test was done according to NCCLS to ensure an accurate results. Selected colonies from test bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staph aureus* and *Klebsiella pneumoniae*) were cultured in a nutrient broth and incubated at 37°C for 24 hrs, broth cultures were centrifuged at 80000 rpm for 10 min, then bacterial precipitate was diluted to match a 10<sup>5</sup> McFarland turbidity. Mueller-Hinton media was used in this test. The pH of the media was adjusted to be 7.2, then with a sterile swab streaked each bacteria on Muller Hinton agar plate to form a bacterial lawn, streaking was repeated in different directions, then allow to dry for 5 minutes, a discs containing specific antibiotics were gently pressed on the agar surface by a sterile forceps, the plates was incubated 24hrs at 37°C.

#### Preparation of ethanolic extract of *Mentha arvensis* leaves

The plant was obtained dry from market. 50 gm of the plant were soaked in 250 ml of ethanol (95 %) and used for hot extraction for 3 h using a Soxhlet extraction apparatus. The extract was then concentrated under reduced

pressure in a rotary evaporator at 45 C. *Mentha arvensis* ethanolic extract was used to prepare different concentration of it (50,150,200) mg/ml, filtrated through (0.45), then by 0.22 µm Milipore filters.

#### **Antibacterial Susceptibility test for ethanolic extract of *Mentha arvensis* leaves**

Antibacterial activity of ethanolic extract of *mentha arvensis* leaves was tested by a well diffusion method using a sterile Muller Hinton agar plates . with Pasteur pipette 4 well was done to put the *mentha arvensis* ethanolic extract , the last one was used to put the negative control (normal saline).Bacterial suspension 0.2ml at concentration 10<sup>8</sup> Macfarland turbidity was spread by a sterile cotton swab over the agar surface, then allowed plates to dry for 5 minutes. 0.1 ml of different concentrations of *mentha arvensis* leaves ethanolic extracts (50,100,200) mg/ml were loaded in wells, while of normal saline 0.1 ml were put in the last well. Plates were incubated for 24hrs at 37°C for appearance of zones of inhibition around the wells.Antibacterial activity was evaluated by measuring the diameter of inhibition zones estimated in millimeters.

#### **Results and discussion**

A total of (50) samples were collected from patients with burn infections from (2) hospitals in Baghdad, during the period from 1/7/2017 to 1/9/2017.

Results showed that among the total of (50) samples that were collected, only (19) isolate (38%) were gave typical morphological characteristics and biochemical test that related to *Pseudomonas aeruginosa* while the (10) isolates (20%) were gave typical morphological characteristics and biochemical test that related to *staph aureus* and (5) isolates (10%) related to *klebsiella pneumoniae* while the rest (16) isolates related to different genera.

Isolation and laboratory identification of of *Klebsiella pneumoniae* is depends upon streaked the bacterium on MacConkey and EMB agar and incubated at 37°C for 24 hrs.On MacConkey agar, larg pink mucoidness colonies are produced, due to fermentation of lactose. Growth on EMB agar produces dark colonies with a greenish-black metallic sheen.For isolation of *Pseudomonas aeruginosa* , samples streaked on maCconcky agar, non ermented colonies appeared also isolates produce pyocyanine pigment on king A medium and pyoverdine pigment on king B medium .Also on blood agar its appears beta hemolytic on it .Results in this study has been agreed with (Warren *etal.*,2000).*staph aureus* colonies appeared beta haemolytic on blood agar and produce opaque yellow colonies on Mannitol-Salt agar due to fermentation of mannitol (Hanselman *etal.* ,2009) .

#### **Microscopic examination**

After stained with gram stain. *staph aureus* appears as gram positive grape like clusters. *pseudomonas aeruginosa* and *klebsiella pneumoniae* were appeared as gram-negative rods, Slender or shaped in pairs, nonspore forming.

#### **Identification of gram negative bacteria by API 20E system**

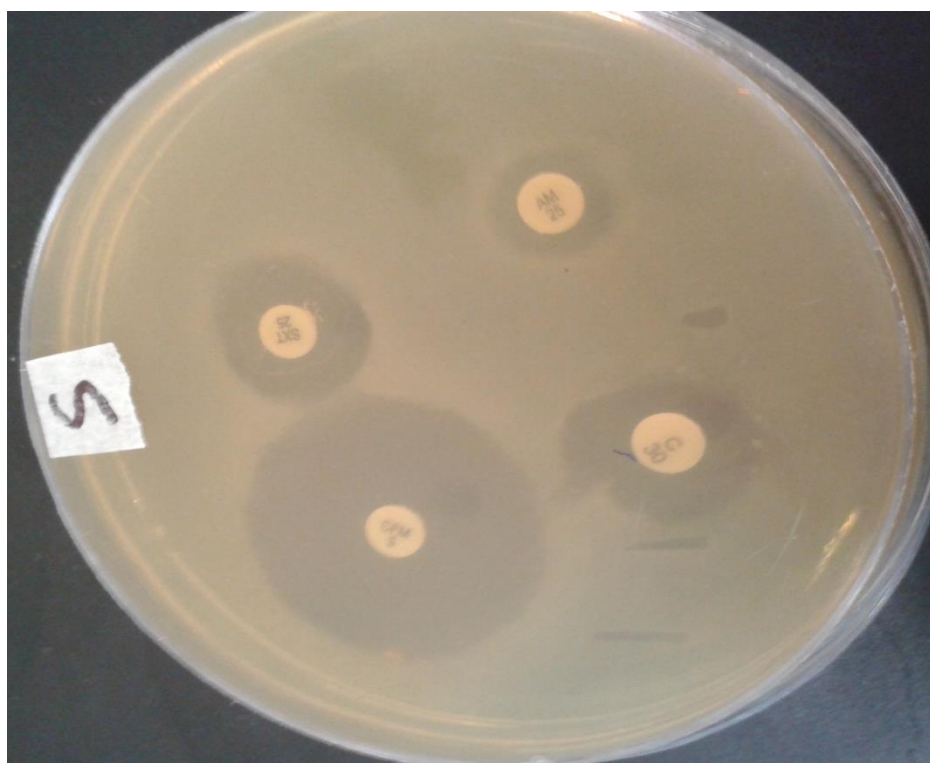
*pseudomonas aeruginosa* colonies were identified by API 20E system. it give positive results in Arginine Dihydrolase ,Citrate utilization , Arabinose fermentation .It give variable results in Gelatin liqifaction. Strains were gave negative results in B-lactamase test , Lysine Decarboxylase , ornithine Decarboxylase , H<sub>2</sub>S production , urease production, Indole production ,Tryptophane Deaminase ,Voges proskauer , Manitol , inositol , Sorbitol , Rhaminose ,sucrose, Melibiose, Amygdaline , Glucose Fermentation. The results mentioned above were in agreement with those mentioned by Warren *et al.* , (2000) .while *klebsiella pneumoniae* give positive results in Citrate utilization, Lysine Decarboxylase , ornithine Decarboxylase, urease production and sugar fermentation.

#### **Identification of *staph aureus***

*Staph aureus* were gave positive results for catalase and coagulase tests.

#### **Antibiotic susceptibility test**

Results of Antibiotic susceptibility test for *staph aureus* isolates reveals that 100% of them were sensitive to chloramphenicol, CFM ciprofloxacin , nitrofurantion, and Erythromycine . Results also reveals that 100% of isolates were resistant to ampicillin, bacitracin, amoxicillin and as shown as shown in figure (1.1)



**Figure (1.1):** Antibiotic susceptibility test for *staph aureus* isolate.

Results of Antibiotic susceptibility test for pathogenic bacteria isolated from burn infections reveals that *klebsiella pneumoniae* isolates were sensitive 100% to chloromphenicol, ciprofloxacin and nitrofurantin, also have intermediate sensitivity to erythromycin, amoxicillin but it was resistant to ampicillin, bacitracin and CFM.

Results of Antibiotic susceptibility test for *pseudomonas aeruginosa* isolates reveals that 100% of them were sensitive to ciprofloxacin, Erythromycin, amoxicillin, chloramphenicol, ampicillin, nitrofurantoin. Results also reveals that 100% of isolates were resistant to bacitracin as shown in table (1.1).

**Table(1.1):** Antimicrobial susceptibility test for *Klebsiella pneumoniae*, *pseudomonas aeruginosa*, *Staph aureus* isolates.

NO of bacteria	CIP 5 mg/ml	C 30 mg/ml	E 15 mg/ml	AM 10 mg/ml	F 100 mg/ml	AX 25 mg/ml	B 10 mg/ml	CFM 5 mg/ml
K1	S	S	I	R	S	I	R	R
K2	S	S	I	R	I	I	R	R
K3	S	I	I	R	I	I	R	R
PS1	S	S	S	S	S	S	R	S
PS2	S	I	I	S	I	I	R	I
PS3	I	S	S	I	I	S	R	S
SA1	S	S	I	R	I	R	R	S
SA2	S	I	I	R	S	R	R	S
SA3	I	S	S	R	I	R	R	S

NO. number; PS. *Pseudomonas aeruginosa*; SA. *Staph aureus*; K. *klebsiella pneumoniae*, S. sensitive, R. resistant, I, intermediate.

Gene responsible for antibiotic resistance may pass it to other species of bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, through a process called horizontal gene transfer. Also plasmids code for multiple drug-resistance is present in gram negative bacteria that often ready to transfer those plasmids to other species (Wibbenmeyer

*etal.*,2010 ). *P. aeruginosa* may develops resistance either by mutation in chromosomally-encoded genes or by the horizontal gene transfer of antibiotic resistance determinants (Ravichandra *etal.*,2012) .

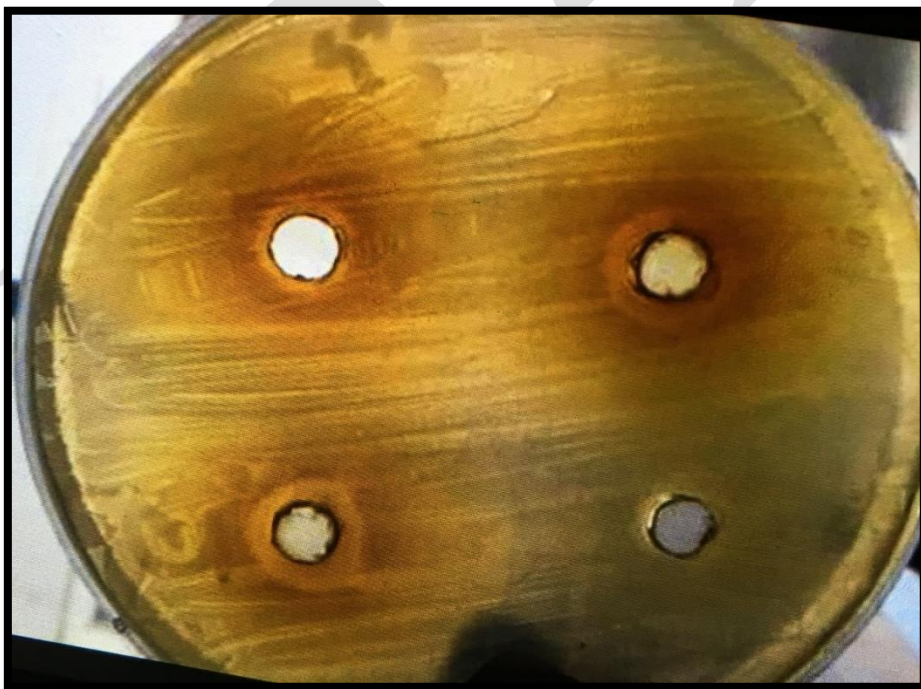
Outbreaks of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* have been estimated in burn units . A study in single-center from 2008 to 2012 reported that multidrug resistance bacteria causing burn infections as defined by the Centers for Disease Control and Prevention is *Pseudomonas spp.*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, and *S. aureus*, at rates 90.8%, 33.8% ,21.1%, and 82% respectively (Van *et al.*,2014).

Burn center length of stay is also a major risk factor for infection with MDR bacteria ,that out of 125 patients, 10% of bacterial species isolated during the first 7 days were MDR as compared with 44% after 28 days of hospitalization (Rochell and Paul,2016).

Furthermore, in other study of >5000 burn patients, the rates of MDR Gram-negative bacteria increased sharply during hospitalization. From the first week of admission to week 4 or later, rate of multi drug resistance *Enterobacteriaceae* per 1000 patient-days is increased from 0.26 to 0.46 for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, and 0.52 to 2.61 for fluoroquinolone-resistant *Enterobacteriaceae*.The rate of MDR *Pseudomonas spp.* is increased from 0.04 per 1000 patient-days in the first week to 1.85 per 1000 patient-days in the 4th week and later of admission ( Tissot *etal.* ,2006).

#### **Detection of antibacterial activity of *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract against different pathogenic bacteria isolated from burn infection**

Detection antibacterial activity of *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract against different pathogenic bacteria isolated from patients with burn infection were done by use well diffusion methods and different concentration of leaves ethanolic extract (50,150,200) mg/ml were used. Results reveals that *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract at high concentrations (150,200) mg/ml have strong antibacterial activity against pathogenic bacteria (*Staph aureus* ,*Pseudomonas aeruginosa*) isolated from burn infections in which the diameter of zone of inhibition were respectively increased with increased the concentration of extract of *Mentha arvensis* leaves as shown in figure (1.2).



**Figure (1.2):** Antibacterial activity of *Mentha Arvensis* leaves ethanolic extract against *Staph aureus* isolates

Results also reveals that *klebsiella pneumoniae* isolates were resistant to antibacterial activity of *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract at all concentration as shown in table (1.2).

**Table(1.2):** Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* leaves ethanolic extract on the growth of *pseudomonas aeruginosa*, *Staph aureus* and *klebsiella pneumoniae* isolates.

Bacteria <i>Spp</i>	Concentration of <i>Mentha arvensis</i> extract (mg/ml)			
	Zone of inhibition (mm)			
	50 Mg/ml	150 Mg/ml	200 Mg/ml	PBS Mg/ml
SA1	12	19	20	0
SA2	11	20	21	0
SA3	12	20	21	0
PS1	14	20	22	0
PS2	12	20	21	0
PS3	11	21	23	0
K1	5	4	5	0
K2	5	2	3	0
K3	4	3	4	0

SA: *Staph aureus* ; PS: *Pseudomonas aeruginosa* ;K: *klebsiella pneumoniae*

A lot of studies was conducted on antimicrobial activities of plant extracts and callus extracts. The investigation was carried out on inter-nodal and leaves extracts of *M. arvensis* in order to determine the anti-bacterial efficacy of chloroform, ethanol, ethyl acetate and water extracts against *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Bacillus subtilis*. The antibacterial activity of the extract could possibly be due to presence of phenolic and terpenoid compounds leakage that induced membrane damage (Malik *etal.*,2012).

The leaves of *M. arvensis*, is a common edible aromatic herb has been known to possess various pharmacological properties including antimicrobial properties. In a study, potent antibacterial properties of the ethanolic extract of *M. arvensis* leaves against *A. baumannii* bacterial strains. The antibacterial effect of the extract could be due to induction of reactive oxygen species (ROS) generation, protein leakage and membrane damage (Johnson *etal.*,2011).

The antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Mentha species* was assessed using both well diffusion and microdilution method. Mint extract was investigated for its antibacterial activity against seven selected pathogenic bacteria: *Bacillus fastidiosus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia odorifera*. *Mentha* extract at different concentrations (1:1, 1:5, 1:10, and 1:20) was active against all tested bacteria except for *S.aureus*, and the highest inhibitory effect was observed against *S. mutans* using the well diffusion method (Deepak *etal.*,2017).

The antibacterial activity of the *Ocimum sanctum*, *O. basilicum*, *Mentha arvensis* were assessed using the disc diffusion method at different concentration. The effect of different concentrations of the crude leaf and stem extracts. Both aqueous as well as ethanolic extract of leaves and stem were successful in inhibiting the bacterial growth. All the test plants showed significant inhibitory activity in ethanol extracts when compared to aqueous extracts. Possibly because some active substances were present in water extracts but in low concentrations also active substances were soluble in organic solvents and therefore not present in water extract (Suresh *et al.*, 2012).

In another study it was found that the plant ethanolic extracts worked in dose dependent manner against pathogenic bacteria and. showed maximum activity at highest concentration (150mg/ml). This is in accordance with the results reported by surva *et al.* (2011) who found the inhibitory effects of *Mentha* leaf ethanolic extract against bacterial strains increased with an increase in concentration, however, degree of toxicity of different concentration of the plant extract may differ from one microorganism to another. It may be because the leaves are rich in bioactive molecules which are known to show medicinal activities as exhibiting physiological and antimicrobial activities (Petretto *et al.* , 2014 ).

The effects of leaves and stem derived calli extracts on *Proteus spp.* showed that the plants can be used in the treatment of urinary tract infection caused by *Proteus sp.* Through the bacterial efficacy studies, its confirmed

that the *in vitro* raised calli tissue was more effective compared to *in vivo* tissue. (Johnson *et al.*,2011). In another study the crude extract of *Mentha arvensis* in different solvent 50% and 10% ethanol, ethyl acetate, chloroform and was tested against human pathogens *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* isolated from patients having dental disease. Water and ethanolic extract showed a broad spectrum of very significant antibacterial activity of producing a clear zone of inhibition against tested bacteria (Sharma *et al.*,2013).

The extracts of *Mentha arvensis* contain significant amounts of phytochemicals with antioxidative properties which could serve antimicrobial property of the *Mentha arvensis*. The secondary metabolites commonly present in the leaves are Alkaloids, Tannins, Flavonols, Steroids, Xantones and glycosides, The GCMS analysis of revealed, the presence of Eucalyptol, Isomethone, Linalool, methyl esters that regarded as a potential source for plant-based pharmaceutical products (Horvath *et al.* ,2017).

## References

Barret J.P. ;Herndon, D.N. (2003) .Effects of burn wound excision on bacterial colonization and invasion. *Plast Surg.* 111:744–750.

Biswas N,N. ;Saha ,S.; Ali, M.K. (2014). Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis*. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 4: 792-797.

Deepak,D.;Gaurav,K. and Rakesh,K.P.(2017 ).Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* against clinical isolates of human cariogenic pathogens –An *in vitro*.*IJPSR.*3(5):1355-1360.

Hanselman, B. A.; Kruth, S. A. and Weese, R. (2009). Coagulase positive *Staphylococcus* colonization of human. *Epidemiol. Infect.* 7:20-27.

Warren, L.; Ernest, J.; Warren, L. and Ernest, J. (2000). *Medical Microbiology & Immunology.* 6th (ed.). Medical Publishing Division. McGraw - Hill. USA.

Horvath,P.K.(2017).*In vitro* antibacterial activity of Menthol Essential oils against staphylococcus aureus .Departement of microbiology and Immunology.University of Vet Medicine and pharmacy..Stovakia.

Johenson,M.;Wesely,E.G.;Kavitha,M.S.andUma,V.(2011).Antibacter- ial activity of leaves and inter-nodal callus extract of *Mentha arvensis*.*Asian.J.Trop.Med.*1:196-200.

Keen ,E.F. ; Robinson .B.J.; Hospenhal, D.(2010). Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns* 2010; 36:819–25.

Mahboubi ,M, (2017). *Mentha spp* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. *Complement .Ther. Clin .Pract.* 26: 1-4.

Malik ,F.; Hussain ,S.;Sadiq ,A.; Parveen, G and Wajid ,A. (2012) .Phyto-chemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* . *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6: 613-619.

Mimica,D. N.; Božin ,B.; Soković ,M.; Mihajlović ,B and Matavulj ,M .(2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Plant. Med.* 69: 413-419.

Mustafa ,S. (2018).Pharmacological Properties of *Mentha* Species.*J .Tradit. Med .Clin .Natur,* Vol 7(1): 259.

Norbury ,W.; Herndon ,D.N.; Tanksley, J.; Jeschke, M.G.; Finnerty, C.(2016). Infection in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 17:250–5.

- Petretto, G.; Francello, F.; Zara, S. and Pintore, G. (2014). Antimicrobial activity against beneficial m.o and chemical composition of essential oil of *Mentha Spp* grown in sardine. *J. Food. Sci.* 79(3):369-377.
- Rachell, D. and Pauld, P. (2016). Multiple antibiotic resistance index, fitness and virulence potential respiratory *Pseudomonas aeruginosa* from Jamaica. *J. Med. Microbiol.* 65:261-271.
- Ravichandra, R. P.; Rashmi, B.; Neena, K.; Suresh, S. and Vijayanath, V. (2012). Antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from clinical sources. *J. Pharma. Biomed. Sci.* 14(5): 2230-2235.
- Sharma, U.; Rajneesh, K.; Agnithotri, S. and Rajendra, S. (2013). Antibacterial activity of some medicinal plants of family Lamiaceae from Baraj region. *Glob. J. Med. Plant. Res.* 1(1):72-76.
- Sures, S.; Rathishkumar, S. v. (2012). Studies on phytochemical composition and antibacterial potential of methanolic leaf extract of *Mentha arvensis*. *IJRD.* 4(8):0974-9446.
- Surva, S. (2011). Biological investigation of ethyl acetate extract of *Mentha Arvensis*. Phd thesis. Department of pharmacology. East west University.
- Thawkar, B. S.; Jawarkar, A. G.; Kalamkar, P. V.; Pawar, K. P. and Kale, M. K. (2016). Phytochemical and pharmacological review of *Mentha arvensis*. *Int. J. Green. Pharm.* 10: 76.
- Tissot, F.; Blanc, D. S.; Basset, P. (2016). New genotyping method discovers sustained nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care burn unit. *J. Hosp. Infect.* 94:2-7.
- Van Duin, D.; Jones, S. W.; Dibiase, L. (2014). Reduction in central line-associated bloodstream infections in patients with burns. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 35:1066-8.
- Van, E. J. (2003). Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial. *Infections. J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2): 347-352.
- Wibbenmeyer, L.; Williams, I.; Ward, M. (2010). Risk factors for acquiring vancomycin-resistant *Enterococcus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on a burn surgery step-down unit. *J. Burn. Care. Res.* 31:269-79.



## Lignin modifikasyon yöntemlerinin araştırılması ve fenolik içeriği azaltılmış lignin esaslı reçine sentezi

M. Murat Aytekin<sup>1</sup>, Bunyamin Karagöz<sup>2</sup>, Cansu Kozbekci Sabah<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Gentaş Kimya Sanayi ve Ticaret A.Ş., Turkey, 34956, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, 34469, İstanbul, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: cksabah@gentaskimya.com

### Özet

Fenol-formaldehit reçineleri, mükemmel yapışma özellikleri, su, ısı direnci ve kimyasal stabilite özellikleri nedeniyle birçok endüstriyel alanda kullanılır ancak fenolik bileşikler oldukça toksik kimyasallardır ve özellikle sentez sırasında, serbest halde bulunan fenol, üretici ve çevre sağlığını büyük ölçüde etkiler. Bu bilinçle gelişen regülasyonlar, hem uygulama hem de stok tutma zorluklarını beraberinde getirmektedir. Bununla birlikte petrol, limitli bir kaynaktır ve dünyadaki ortalama tüketim verilerine göre petrolün 40 yıl içinde tükeneceği öngörülmektedir. Bu durumun sonucu olan petrokimyasal ürünlerin yüksek maliyeti ve fiyat dalgalanmaları, endüstriyel üreticileri ve araştırmacıları, doğada bolca bulunan, daha düşük maliyetli, yenilenebilir ve petrokimyasal hammaddelerin yerini alabilecek hammadde arayışına itmiştir. Lignin, bitkilerde bulunur ve selülozla birlikte nano ölçekte karbonhidrat ağ yapısında bir hücre duvarı oluşturur. Yapısal olarak aromatik esaslı, eter ve karbon-karbon bağları ile çapraz bağlı heterojen amorf bir polimerdir. Ağırlıklı ikincil yakıt olarak da kullanılan lignin, yapısında bulunan üç fenil propan birimleri ve kendine özgü aromatik ünitelerden dolayı, kısmen kimya sanayi, temel olarak fosil karbon kaynakları yerine kullanılma potansiyeline sahiptir ancak, kompleks ve yoğun olan polifenil propan birimleri düşük reaktivitedir. Bu nedenle ligninin kullanılması için reaktivitesinin artırılması gereklidir [2,3]. Ligninlerin reaktivitesini artırmak için umut veren modifikasyon yöntemleri ise metilleme, fenolleme ve demetilleme olarak sıralanabilir ve reaktivitenin artırılması, fenol formaldehit reçine üretimi için fenolün yerine kullanılması ya da fenol ile birlikte kullanılarak reçinede fenol kullanımını azaltılması noktasında oldukça önemlidir. Bu çalışmada, lignin reaktivitesini artırmak için ilk aşamada farklı yöntemlerle modifikasyonu yapılmıştır. İkinci aşamada, fenolik reçine sentezinde, fenol kaynağı olarak farklı oranlarda kullanılması ve reçine performansına etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, EDAX elementel analiz ve FTIR analizleri yapılmış ve lignin demetilasyonunun başarıyla gerçekleştiği bulgulanmıştır. Bununla birlikte, fenol kaynağı olarak modifiye ligninin ağırlıkça % 5 ila % 50 aralığında değişen oranlarda ilavesinin, % 100 fenol bazlı ürüne kıyasla benzer performans gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Fenol-formaldehit reçineleri, modifiye lignin ve türevleri, demetilasyon, lignin bazlı kontraplak tutkal reçinesi

### Investigation of lignin modification methods and phenolic content reduced lignin based resin synthesis

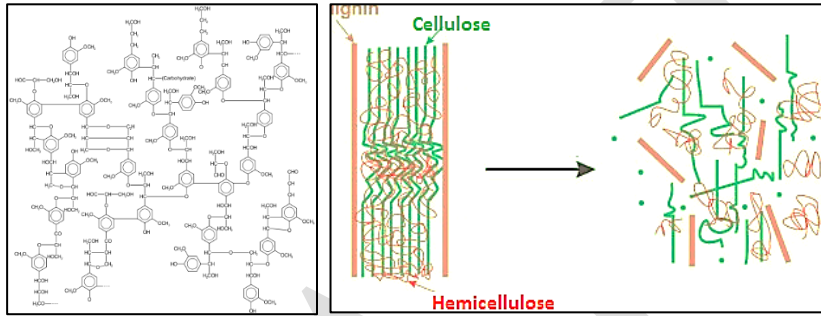
#### Abstract

Phenol-formaldehyde resins (PF resins) are synthesized from phenol and formaldehyde derivatives. Such resins are used in many industrial fields due to their excellent bonding properties, water, heat resistance and chemical stability. However, the rapid increase in the cost of petrochemicals especially phenol limits the production of resins from day to day. On the other hand, phenol is highly toxic chemicals. It is very dangerous toxic effects during synthesis. They also brings the difficulties in stocking. These reasons led manufacturers and researchers to find materials that are abundant in nature, cheap, self-renewable and can replace petrochemical raw materials. In this study, the lignin derivative materials were demethylated by different methods in the first stage to increase lignin reactivity. In the second step, the use of modified lignin derivatives in phenolic resin synthesis as phenol source in different ratios and its effect on resin performance were investigated. As a result, lignin demethylation was carried out successfully according to EDAX elemental analysis results. Besides, it was found that the addition of 5% to 50% by weight of the modified lignin as the source of phenol shows the similar performance compared to % 100 phenol based product.

**Keywords:** Phenol-formaldehyde resins, modified lignin and derivatives, demethylation, lignin modified plywood glue resin

## GİRİŞ

Fenol-formaldehit reçineleri (PF reçineleri) fenol ve formaldehit türevlerinden sentezlenir. Bu tür reçineler, mükemmel yapışma özellikleri, su, ısı direnci ve kimyasal stabilite özellikleri nedeniyle birçok endüstriyel alanda kullanılır. Bununla birlikte, petrokimyasalların maliyetindeki hızlı artış, özellikle fenol, günden güne reçinelerin üretimini sınırlamaktadır. Ayrıca petrolün limitli bir kaynak olması, dünyadaki ortalama tüketim verilerine göre 40 yıl içinde tükenerek olması, petrokimyasal ürünlerinin yüksek maliyeti ve dalgalı fiyatı, üreticileri ve araştırmacıları doğada bol miktarda bulunan, ucuz, kendi kendini yenileyebilen ve petrokimyasal hammaddelerin yerine kullanabilecek malzemeler bulmaya itmiştir. Lignin yapısal olarak aromatik esaslı, eter ve karbon-karbon bağları ile yüksek oranda çapraz bağlı heterojen amorf bir polimerdir. Bitkideki esas görevi su taşınımı ve bitkinin yapısını sağlamaktır. Ağırlıklı ikincil yakıt olarak kullanılan lignin, bünyesinde bulunan üç fenil propan birimleri nedeniyle kendine özgü aromatik yapısından dolayı, kısmen kimya sanayi, temel olarak fosil karbon kaynakları yerine kullanılma potansiyeline sahiptir. Şekil 1'de gösterilen lignin, bitkilerde bulunur ve selüloz ile birlikte bitki biyokütlesinin % 90'ını oluştururken bitkideki yarı selüloz, nano ölçekte karbonhidrat ağ yapısında bir hücre duvarı oluşturur (Brianna ve çalışma ark., 2015).



Şekil 1. Lignin türevli yapıların şematik gösterimi

Fizquez ve ark (1997) kompleks ve yoğun polifenil propan birimleri çok düşük reaktivitede olduğunu bildirmiştir. Matsushita ve Yasuda (2004) ligninin oksidasyonu için reaktif koşulların korunması gerekli olduğunu açıklamıştır. Alkali ligninlerin reaktivitesini artırmak için umut veren modifikasyon yöntemleri ise sülfolama, hidrosilleme ve demetilleme olarak sıralanabilir. Alkali ligninlerin reaktivitesinin artırılması fenol formaldehit reçine üretimi için fenolün yerine kullanılması ya da fenol ile birlikte kullanılarak reçinede fenol kullanımını azaltılması noktasında oldukça önemlidir. Bu yaklaşımda, ligninin fenol ve formaldehit ile kimyasal reaksiyona giren yapıya kovalent bağla katılması kastedilmektedir.

Temel olarak ağaç ürünleri grubuna bakıldığında, kontraplaklar da ağaçtan elde edilmektedir. Yapısındaki benzerlikler nedeniyle de fenolik tutkallar kontraplak ve türevleri için vazgeçilemeyecek ürünlerdir. Tutkal formülasyonuna ligninin de dahil edilmesi bu uyumu arttıracaktır. Çalışma kapsamında, kontraplak sektöründe kullanılan fenolik reçinelerde fenol kaynağı yerine kullanılmak üzere ligninin modifikasyonu ile hidrosil içeriğini artırmak ve reçine formülasyonuna dahil etmek üzere çalışılmıştır.

## MATERYAL VE METOD

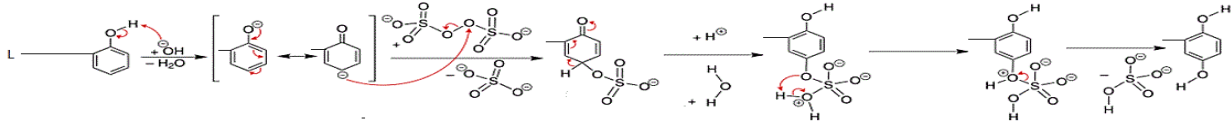
Kullanılan kimyasallar; lignin (Rusya), demir(II) sülfat tuzu ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Fenton reaktifi, Sigma-Aldrich), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ , Sigma-Aldrich), potasyum persülfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , Elbs reaktifi, Sigma-Aldrich), hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ , Sigma-Aldrich), derişik sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Sigma-Aldrich), sodyum sülfid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , demetilasyon reaktifi, Sigma-Aldrich), fenol (% 100, Novapex, Fransa), formaldehit (% 37, Gentaş Kimya), dolgu maddesi, amonyum tuzu (tutkal katalizör).

Reçinelerin yapı karakterizasyonu için Bruker arka FT-IR spektroskopi cihazı, serbest fenol tayini için Agilent marka GC-MS cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon takibi DIN 4 cup, viskozite analizi Brookfield RV II DV; elementel analizler Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) ve TEM'e bağlı Enerji Saçınımlı X-Ray Mikroanaliz Spektrometresi ile yapılmıştır. Reçine prepolimerindeki serbest fenol ve formaldehit, su toleransı, jel zamanı tayinleri için Gentaş Kimya bünyesinde bulunan iç metotlar kullanılmıştır.

## Lignin Modifikasyonu

### Elbs Reaksiyonu

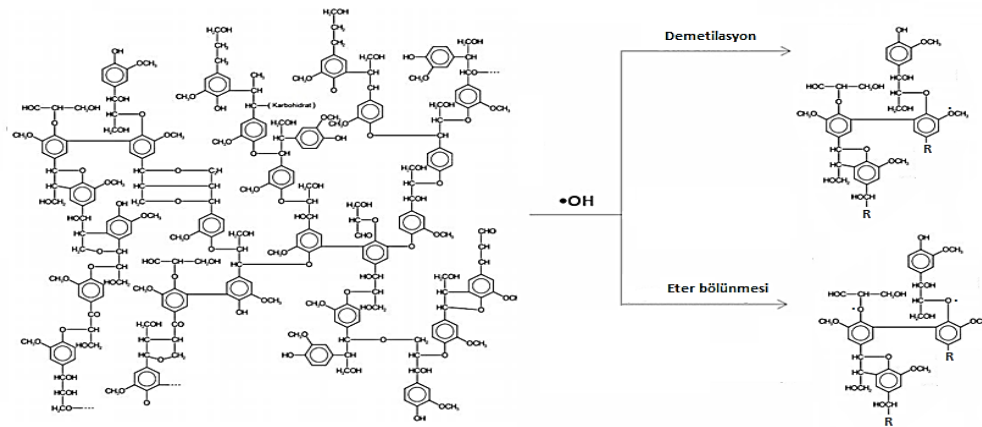
Elbs reaksiyonu ile bazik ve soğuk reaksiyon şartlarında potasyum persülfat varlığında yapılmıştır. Reaksiyonun şematik gösterimi Şekil 2’ de verilmiştir. Bu reaksiyon için saf su içerisinde çözülmüş NaOH, 100gram lignini çözmek için kullanılmıştır. Bazikliğin yüksek olduğu (pH 13-14) bu çözeltide köpük miktarının fazla olduğu gözlemlenmiştir. Çözelti sıcaklığı kademeli olarak, 25 °C, 11 °C, 4-5 °C’ ye ayarlanmıştır. Aynı bir beherde derişik potasyum persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) çözeltisi, damlatma hunisi ile sisteme verilmiştir. Ekleme, 1 saat 30 dakika boyunca devam etmiştir. pH değeri ise 13-14 aralığından 10-11 aralığına düşmüştür. Sistemin köpük miktarı potasyum persulfat eklemesi sonrası azalmıştır. Ekleme sonrası reaksiyon, oda sıcaklığında gece boyunca karışmaya bırakılmıştır.



Şekil 2. Lignin üzerinde yapılan Elbs reaksiyonu şematik gösterimi

### Fenton Reaksiyonu

Fenton reaksiyonu ile benzer bir şekilde demir(II)sülfat ve hidrojen peroksit varlığında oksidasyon yapılmıştır. Olası reaksiyonun şematik gösterimi Şekil 3’ de verilmiştir. Buna göre, Fenton reaksiyonu ile iki farklı yöntem üzerinden lignin modifikasyonu yapılabilmektedir. Bunlar; serbest -OCH<sub>3</sub> grubu üzerinden demetilasyon ve -CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>3</sub>- üzerinden eter bölünmesidir.



Şekil 3. Lignin üzerinde yapılan Fenton reaksiyonu şematik gösterimi

0.2N’lik NaOH, lignin üzerine eklenip ligninin tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Tamamen çözülmüş olan lignin çözeltisi siyah renkli olup pH’ı 7 civarındadır. Bu çözelti üzerine demir(II)sülfat (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) tuzu (her 1 gram lignin için 0.1 mmol olacak şekilde) eklenmiştir. 30 dakikalık karıştırma sonrası çözelti içerisinde nihai çözeltideki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin hacimce oranı (v/v) % 1.5 olacak şekilde sisteme ilave edilmiştir.






### Demetilasyon

Demetilasyon reaksiyonu ise sodyum hidroksit varlığında sodyum bisülfat ile yapılmıştır (Ferhan ve ark,2013). Bu reaksiyon için 115.1g lignin 600 mL hacmindeki beherde tartılmıştır. Üzerine 115.1g destile su ve 11.5 g demetilasyon reaktifi olan Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> eklenmiştir. Ligninin çözünürlüğünü arttırmak için 11.5g NaOH sisteme konulmuştur. Sisteme sıcaklık uygulamadan önce ligninin tamamının çözülmüş halde olmasına dikkat edilmiştir. Bu noktada ligninin çözünürlüğünü kolaylaştırmak için NaOH pelet halinde sisteme konulmak yerine 10mL su içerisinde çözülerek sisteme eklenmiştir. Bu sayede ısıtma esnasında oluşan kalın ve yoğun köpüğün önüne geçilerek reaksiyon verimi artırılmıştır.

## Nihahi Modifiye Lignin Eldesi

Deneme çalışmalarında, başlıca Elbs reaksiyonu, Fenton reaksiyonu, ve demetilasyon üzerinde durularak bunların farklıda kullanılmasıyla lignin üzerindeki hidroksil kaynağı arttırılmaya çalışılmıştır. Tablo 1.' de örneği verilen reaksiyonlar ve serbest fenol oranına göre başarılı bulunan N5.nolu örnek, Şekil. 4' deki sıra ile modifiye edilmiştir.

**Tablo 1.** Lignin modifikasyon denemeleri

Örnek Durum	1*	2**	2→1	3***	2→3→1
Reaksiyon sonrası					
pH	2-3	2-3	2-3	7-8	6-7
Serbest fenol (%)	1,85	1,54	2,87	3,57	4,78

\*Elbs Reaksiyonu, \*\*Fenton reaksiyonu,\*\*\*Demetilasyon reaksiyonu



Şekil 4. N5 no.lu örnek için modifikasyon adımları

Tüm reaksiyonlarda, miktar hesaplamaları ağırlıkça % üzerinden yapılmış ve odası sıcaklığında (25 °C) başlanan reaksiyonlar, reaksiyon sıcaklığının kontrolü için buz banyosunda 10-15 °C arasında tutulmuştur. M-ligninin hidroksil tayini titrasyon ile yapılmıştır.

### M-Lignin Katkılı Fenolik Reçine Sentezi

Seçilen M-lignin üzerinden, standart reçinedeki fenol içeriğinin kademeli olarak %50-%95 aralığında kalacak şekilde azaltılmasıyla yapılmıştır. Bu doğrultuda, temin edilen fenol, M-lignin ve formaldehit belirlenen oranlarda tartılarak, üzerine pH' ı hedeflenen değere ulaşana kadar sodyum hidroksit eklenmiştir. Ardından reaksiyon sıcaklığı kontrollü olarak arttırılarak ve 100 °C' yi aşmayacak şekilde 2-3 saat reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon takibi, DIN 4 cup ile akma zamanı ölçülerek ve pH metre ile sürekli olarak takip edilmiştir. İstenilen akma değerine ulaşıldığında, reaksiyon soğutularak nötrale edilmiştir. Son aşamada yardımcı kimyasal (talk, dolgu) eklenerek kontraplak eldesi denemelerine geçilmiştir.

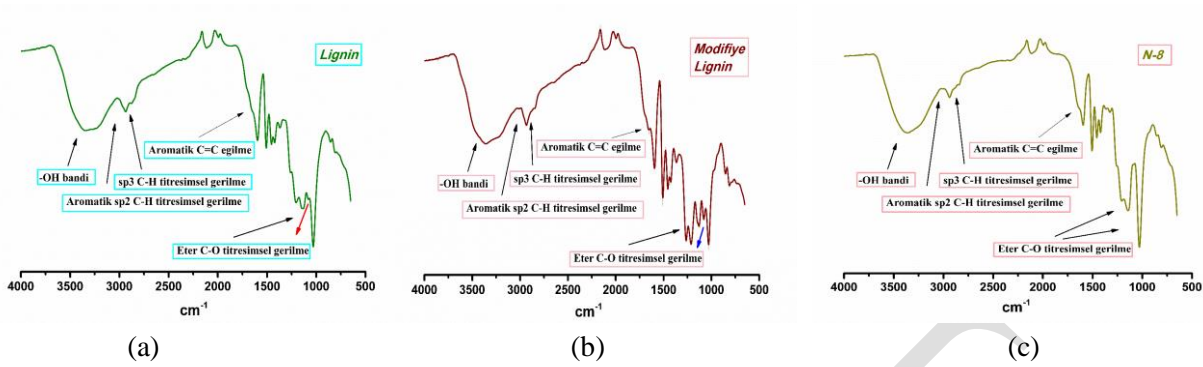
### Kontraplak Uygulamaları

Denemeler, çam ve kavak tipi ağaçta 7 katmanlı olacak şekilde; 20 dakika 18 bar basınç ile oda sıcaklığında ve 20 dakika 22 bar basınç ile 130 °C' de preslenmiştir. Karşılaştırmalı performans değerlendirme EN 314-1:2004 standardına göre; ön işlem (5.1.3): 4 saat suda kaynatma, 16 saat 60 °C de kurutma tekrar kaynatma ve 1 saat suda soğutma şeklinde yapılarak katmanlar arası bağlanma/ayrılma davranışına bakılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### M-Lignin Karakterizasyonları

Lignin, ticari lignin, M-lignin'e ait FT-IR spektrumları; Bruker marka FTIR cihazı kullanılarak 4000–500 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında kaydedilmiştir.



Şekil 5. lignin (a), ticari modifiye lignin (b), and M-lignin (c) FTIR spektrumu

Şekil 5' ye göre, Lignin maddesinin karakteristik pikleri; -OH bandı yayvan bir şekilde 3300 cm<sup>-1</sup> bölgesinde, sp<sup>3</sup> hibritleşmesine sahip karbon atomu ile ona bağlı hidrojenlerin gerilme titreşimlerinden oluşan pikler 2900 cm<sup>-1</sup> de, aromatik sp<sup>2</sup> hibritleşmesine sahip karbon atomu ve ona bağlı olan hidrojenin yaptığı gerilme titreşimi 3050 cm<sup>-1</sup> bölgesinde çıkmaktadır ancak sp<sup>3</sup> C-H piki ile yayvan -OH bandı etkisinden 2900 cm<sup>-1</sup> deki pike omuz şeklinde gözlemlenmektedir. Aromatik C=C çift bağına ait eğilme 1640 cm<sup>-1</sup> bölgesinde ve eterik C-O gerilme titreşimleri 1200- 1000 cm<sup>-1</sup> aralığında belirmiştir.

M-lignindeki fenolik -OH karakterizasyonu basamağında demetilasyon, fenton ve elbs reaksiyonları ile fenolik -OH'ları arttırılan lignin malzemelerinin toplam fenolik -OH miktarları asit-baz titrasyonu (volumetrik analiz, ıslak kimya) üzerinden belirlenmiştir.

Nötralizasyon reaksiyonuna dayanan bu titrasyon sonucu çözeltide kalan NaOH konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu hesaplamalar, Tablo 2 ve Tablo 3. de sunulmuştur.

Tablo 2. Seçilen örneğin oluşturduğu fenolat tuzunu için kullanılan NaOH konsantrasyonu

Örnek	Örnek hazırlama (2,5 mL distile su)	NaOH Çözelti başlangıç kons. C <sub>Initial</sub> (M)	1 mL çözelti için titrant tüketim V <sub>cons.</sub> (mL)	Final çözelti NaOH kons. C <sub>final</sub> (M)	Reaksiyona giren NaOH kon. C <sub>rxn</sub> (M)
N5	0,0759g	1,0068	23,4000	0,9360	0,0708

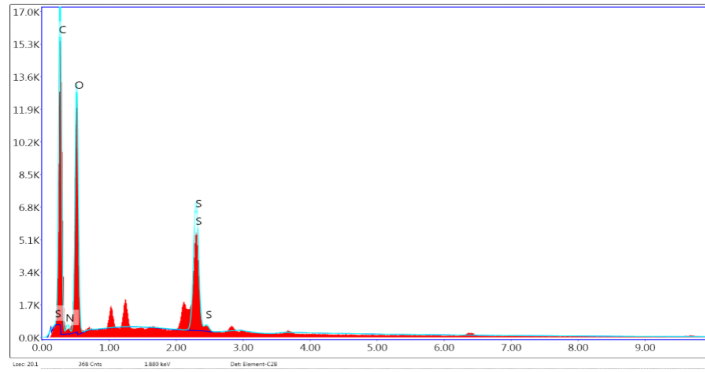
Başlangıç değerinden nihai değer çıkarılması sonucu ise fenol ile tepkimeye girip sodyum fenolat tuzunu oluşturan NaOH konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu değer üzerinden reaksiyona giren NaOH çözeltisinin mol miktarı hesaplanmıştır ve bu mol miktarı lignin yapılarındaki fenolik -OH yapıları ile eşdeğerlik göstermektedir.

Tablo 3. Seçilen örneğin içerdiği -OH grubu tayini

Örnek	Reaksiyona giren NaOH kon. C <sub>rxn</sub> (M)	Reaksiyona giren fenol gruplarının molü n <sub>ph,rxn</sub> (mmol)	Reaksiyona giren fenol gruplarının molü n <sub>ph-OH-unit</sub> (mmol/g)
N5	0,0708	0,1770	2,3300

Buna göre, M-lignin için uygulanan ilk reaksiyon basamağı fenton reaksiyonunun fenolik -OH eldesindeki etkinliğinin ne kadar yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Fenton reaksiyonu ile eterik bağlar kırılarak aromatik halkaya bağlı -OH miktarı arttırılmıştır.

Lignin, ticari modifiye lignin ve m- lignin, 'in SEM EDAX kullanımı ile elementel analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, 4 elementin (C, N, S ve O) yapıdaki yüzde dağılımı ortaya konmuştur. Ayrıca haritalama ile SEM görüntüleri üzerinde her bir elementin bolluğu gösterilmiştir.



Şekil 6. M-Lignin elementel bolluk analizi

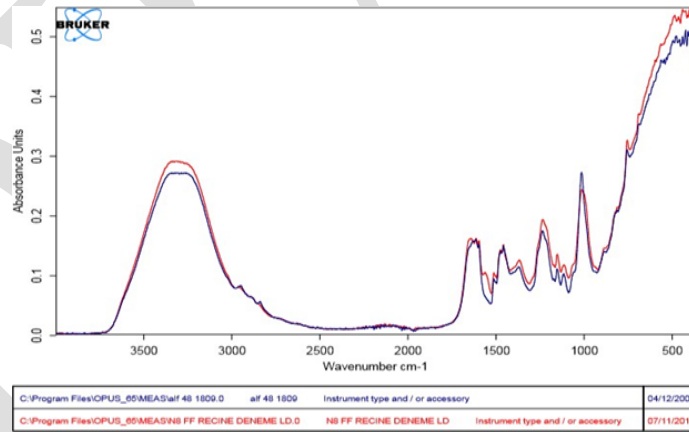
Şekil 6 ve Tablo 4' e göre, karbon, azot, oksijen ve kükürt elementlerinin kütlece bolluk analizi sırasıyla; %45,4 (Karbon,C), %3,7 (Azot,N), %45,1 (Oksijen,O) ve %5,8 (Kükürt, S) şeklindedir. Bu değerler Numune-5 ve Lignin maddesi ile karşılaştırıldığında farklılıklar göstermektedir. Özellikle Elbs ve Fenton yöntemiyle oksijen miktarındaki artışın sağlandığı bu sonuçlarla kanıtlanmıştır.

Tablo 4. Elementel analiz (C,N,O ve S) çıktıları

Element	Ağırlık %	Atomik %	Hata %
C K	45,4	53,7	8,1
N K	3,7	3,8	15,1
O K	45,1	40	10,1
S K	5,8	2,6	2,4

### Reçine Karakterizasyonları

Karakterizasyon çalışmalarında aynı koşullar altında sentezlenen standart reçine ve m-lignin eklenmiş reçinenin Bruker marka FT-IR cihazında spektrumları karşılaştırmalı olarak alınmış ve Şekil 7' de sunulmuştur.



Şekil 7. Standart Fenol-Formaldehit Reçinesi ile M-lignin (%10) Fenol-Formaldehit Reçine Denemesinin Karşılaştırılması

Buna göre, standart reçine (mavi) ve M-lignin reçinenin (kırmızı) -OH bandı yayvan bir şekilde 3300 cm<sup>-1</sup> bölgesinde, 1330-1100 cm<sup>-1</sup> de eterik C-O gerilme karakteristik piklerinin benzer olduğu görülmektedir. Reçine karakterizasyonlarına ait diğer sonuçlar özet halinde Tablo 5' de sunulmuştur.

**Tablo 5.** Farklı modifikasyon tipleri ile elde edilen M-ligninden reçine denemeleri

	<b>N3+FF</b>	<b>N4 +FF</b>	<b>N5 +FF</b>	<b>STD.FF</b>
Katı Madde 120°C, 2 Saat	46,40	48,10	46,0	46,80
Yoğunluk 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	1,141	1,146	1,145	1,124
Akma Zamanı 20°C Din 4 (Sn)	13,20	14,10	13,38	13,60
Jel Zamanı 130°C (Dak.)	13-13,30	11 -11,50	13 -13,20	12 -12,5
pH, 20°C	8,05	8,10	8,10	8,50
Su Toleransı 20°C	1 / 1,1	1/0,6	1/1,3	1/1,2

## SONUÇ

Endüstriyel sınai üretim, temel olarak güvenli hammadde kaynaklarının kullanımını içeren sürdürülebilir büyümeye bağlıdır. Lignin, sabit yinelenen birimleri olan düzenli ve kesin bir yapıya sahip olmayan, sistematik, yapılandırılmamış, 3-D polimerik bir kompleks sistemi olarak tanımlanmaktadır. Lignin makromolekülü, yapısal benzersizliği ve sınırlı endüstriyel kullanımı nedeniyle birçok yazar tarafından not edilmiştir (Vangeel ve ark, 2018). Bununla birlikte lignin, dünyadaki en bol bulunan yenilenebilir doğal ürünlerden biridir ve teknik ligninler, her yıl hamur işleminin bir yan ürünü olarak muazzam miktarlarda üretilmektedir (Özmen ve Çetin, 2003).

M-lignin eldesi çalışmalarına bakıldığında, M-lignin için uygulanan ilk reaksiyon basamağı olan. Fenton reaksiyonu ile eterik bağlar kırılarak aromatik halkaya bağlı –OH miktarı artırılmıştır. Bu etkinliğinin ne kadar yüksek olduğu titrimetrik analiz ve elementel analiz sonuçlarından anlaşılmaktadır.

Yapılan çalışmalar ve veriler incelendiğinde temel optimizasyonlar ile birlikte reçine/tutkal formülasyonundaki fenolün, M-lignin ile kısmen değiştirilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, laminant tutkalı formülasyonunda M-lignin miktarının artmasına bağlı olarak tutkalın tutunma/yapışma performansı ve su dayanımının azaldığı bulgulanmakta ancak bu durumun ileri çalışmalar ile giderilebileceği öngörülmektedir. Dolayısıyla fenol kullanımının yarattığı toksik etkinin de azalması ile bu ürünler kontrplak sektörü için vazgeçilmez olacak potansiyelindedir.

## TEŞEKKÜR

Bu Proje, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Teknoloji ve Yenilik Destek Programları (TEYDEB), Proje No: 3160503 tarafından desteklenmiştir, teşekkür ederim. Lignin demetilasyonu ve karakterizasyon çalışmalarında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nün sağladığı destek için teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Brianna M. Upton and Andrea M. Kasko, 2015. Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective, Chem Rev: Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science, special Issue.
- Ferhan M, Yan N and Sain M, 2013. A New Method for Demethylation of Lignin from Woody Biomass using Biophysical Methods, J Chem Eng Process Technol, 4:5.
- Fizquez G. V, Gonzfilez J., Freire S. & Antorrena G., 1997. Effect of Chemical Modification of Lignin on the Gluebond Performance of Lignin-Phenolic Resins, Bioresource Technology, 60 (1997), 191-198.
- Matsushita Y., Yasuda S., 2004. Preparation and Evaluation of Lignosulfonates as a Dispersant for Gypsum Paste from Acid Hydrolysis Lignin, Biosource Technology, 96 (2005), 465–470.
- Özmen N, Çetin N.S, 2003. Studies on Lignin-Based Adhesives for Particleboard Panels, Turk J Agric For, 27, 183-189
- Vangeel T, Schutyser W, Renders T, Sels B.F, 2018. Perspective on Lignin Oxidation: Advances, Challenges, and Future Directions, Topics in Current Chemistry, 376:30.

## Ayvalık Tuzlası'nın bakteriyel çeşitliliğinin araştırılması

Suat Sezen<sup>1</sup>, Nilgün Poyraz<sup>2</sup>, Mehmet Burçin Mutlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Teknik üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup>Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: suatsezen@eskisehir.edu.tr

### Özet

Ayvalık Tuzlası Balıkesir'in Ayvalık ilçesine 10 km uzaklıkta İzmir-Çanakkale yolu üzerinde bulunan deniz tuzlasıdır. Tuzla thalassohalin ortam özelliğindedir ve deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşmaktadır. Ayvalık Tuzla'sının şimdiye kadar mikrobiyolojisi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar son derece azdır ve tuzlanın mikrobiyal çeşitliliğini tam olarak yansıtmamaktadır. Literatürde ülkemizdeki tuzlalar üzerine yapılan mikrobiyolojik çalışmaların eksikliği nedeniyle bu çalışmada tuzlanın bakteriyel çeşitliliğinin araştırılması ve hangi türlerin baskın bulunduğu saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmada tuzlanın 5 farklı havuzundan Eylül 2016 tarihinde örnekleme yapılmış ve bakteriyel çeşitliliği belirlemek için moleküler teknikler uygulanmıştır. Çalışmada, havuzlardan alınan su örnekleri, izolasyon için yüksek tuz içeren 3 farklı besi ortamına yayma plak yöntemi ile inoküle edilmiştir. İnkübasyon ve saflaştırma sonrası bu besiyerlerinden 83 izolat elde edilmiştir ve farklı koloni morfolojisine sahip olduğu düşünülen 16 örnek seçilerek tanımlama amacıyla manuel olarak ve kit protokolü ile DNA Ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen saf DNA'lara 16S rRNA genine spesifik PCR kurularak, dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde NCBI veri tabanı kullanılmış ve %99 ve üzeri benzerlik gösteren türler belirlenmiştir. Sonuçlara göre 1 numaralı havuzda *Saccharospirillum sp. Pontibacillus marinus* ve Uncultured bacterium; 2 numaralı havuzda *Saccharospirillum sp. Henriciella sp. Serratia marcescens subsp.* Uncultured bacterium; 3 numaralı havuzda *Saccharospirillum sp. Caulobacter sp. Aliifodinibius sp.* Uncultured bacterium; 4 numaralı havuzda *Aliifodinibius sp. Halophilic bacterium* ve 5 numaralı havuzda *Aliifodinibius sp.* tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda moleküler yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlardan Ayvalık tuzla'sının Halofilik mikroorganizma çeşitliliği yönünden oldukça yüksek bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Bu tuzlada olduğu gibi ekstrem çevrelerdeki mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması endüstriyel ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda kullanımın artmasını sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Ayvalık Tuzlası; Halofilik Bakteri; PCR

### Investigation of bacterial diversity in Ayvalık Saltern

#### Abstract

Ayvalık saltern is sea saltern which located on the Izmir-Canakkale road at a distance of 10 km from the Ayvalık district of Balıkesir. Saltern has thalassohalin feature and formed as a result of evaporation of sea water. Studies carried out on microbiology of Ayvalık Saltern until now are limited and do not exactly reflect the microbial diversity of saltern. Due to the lack of microbiological studies on salterns in our country in the literature, it is aimed to investigate the bacterial diversity of Ayvalık Saltern and to determine which species are dominant in this study. For this purpose, sampling was carried out from 5 different pools of saltern in September 2016 and molecular methods were used for determination of bacterial diversity. In the study, water samples taken from the salt pans were inoculated with 3 different media containing high salt concentration for isolation by spread plate method. After incubation and purification 83 isolates were obtained from these media and 16 samples were chosen that being thought have different colony morphology and DNA Extraction was performed manually and by kit protocol for identification purposes. Sequence analysis was performed by constructing 16S rRNA gene specific PCR in the pure DNA obtained. NCBI database was used in the evaluation of sequence analysis results and 99% and over similar species were determined. According to the results, In number one salt pan, *Saccharospirillum sp. Pontibacillus marinus* ve Uncultured bacterium ; in number two salt pan *Saccharospirillum sp. Henriciella sp. Serratia marcescens subsp.* Uncultured bacterium; in number three salt pan *Saccharospirillum sp. Caulobacter sp. Aliifodinibius sp.* Uncultured bacterium; in number four salt pan *Aliifodinibius sp. Halophilic bacterium* and in munber five salt pan *Aliifodinibius sp* has been identified.

**Keywords:** Ayvalık Saltern; Halophilic Bacteria; PCR



## GİRİŞ

Halofilik mikroorganizmalar; prokaryotik ve eukaryotik temsilcileri olan, gelişebilmek için yüksek tuz konsantrasyonuna gereksinim duyan ve bu tarzdaki tuzcul çevrelerde gelişebilmek için farklı adaptasyonlar geliştirmiş olan geniş bir gruptur (Kushner, 1985). Halofilik mikroorganizmalar, ortamdaki yüksek osmotik basınca karşı iki türlü adaptasyon geliştirmişlerdir. Bunlardan birincisi,  $K^+$ ,  $Na^+$  veya  $Cl^-$  gibi inorganik iyonların yüksek konsantrasyonda hücre içinde birikmesi şeklinde osmozun dengelenmesidir. Bunun sonucunda yüksek konsantrasyondaki iyonların varlığında çalışabilen hücre içi enzim adaptasyonlarını gerektirmektedir. İkinci adaptasyon ise; farklı mikroorganizmalarda görülen “compatible solute” ya da organik osmatiklerin birikmesidir. Bu adaptasyon hücrel proteinlerin kendilerini çevreleyen yüksek tuz konsantrasyonuna karşı bir adaptasyon değil, hücrenin değişen koşullara hızlı bir adaptasyonudur. (Da Costa ve ark. 1998, Galinski 1995). Halofilik mikroorganizmaların 16S rRNA karşılaştırmaları dikkate alınarak elde edilen filogenetik ağaçta Archaea, Bacteria ve Eukarya domainlerinde temsil edildiği belirlenmiştir (Oren, 2008). Çoğu halofilik ve halotolerant mikroorganizma Bacteria domaini içerisinde yer almaktadır. Halofilik bakterilerin; aerobik ve anaerobik kemoototroflar, fotoototrofik ve fotoheterotrofik türler olduğu kadar kemolitotrofik türleri bulunmaktadır (Oren, 2002). Diğer Domainler kadar olmasa da da Eukarya domaininde de birkaç halofilik gruplar bulunmaktadır (Gerday ve Glansdorff, 2007). Halofilik ortamlar “Thalassohalin” ve “Athlassohalin” olarak iki temel kategoriye ayrılmaktadır. Thalassohalin ortamlar deniz suyunun buharlaşması sonucu oluşmaktadır. Tuz kompozisyonları deniz suyunun tuz kompozisyonuna benzemektedir.  $Na^+$  baskın katyon,  $Cl^-$  ana anyon ve bunu takiben  $SO_4^{2-}$  hafif alkali pH ise nötrdür (Mutlu, 2006). Athlassohalin ortamlar ise; deniz suyundan farklı bir iyonik tuzlu su kompozisyonuna sahiptir. Böyle bir ortamda iki değerlikli katyonların ( $1.9 Mg^{+2}$ ,  $0.4 M Ca^{+2}$ ) konsantrasyonu tek değerlikli ( $1.6 M Na^+$ ,  $0.14 M K^+$ ) katyonların konsantrasyonundan fazladır. Ayrıca pH nispeten daha düşüktür (Aycan, 2012).

Ülkemizdeki tuzcul ortamlara örnek olarak ise Tuz Gölü, Meke Gölü ve Acıgöl gibi göller verilebilir. Ayrıca bunlar dışında bir de solar tuzlalar mevcuttur. Solar tuzlalar, sıg ve yapay havuzlardan oluşan, deniz suyundan tuz üretmek amacıyla oluşturulmuş yapılardır. Çamaltı tuzlası ve Ayvalık tuzlası Ülkemizde bulunan önemli solar tuzlalara örnek olarak verilebilir (Mutlu ve Çınar 2017). Çalışma lokasyonumuz olan Ayvalık Tuzlasından yılda ortalama 20.000 ton tuz üretilmektedir. Üretilen tuz başta gıda sanayi olmak üzere deri sektörü ve kar mücadelesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Kılıç ve ark, 2014). Tuzlada 17 adet evaporasyon ve 5 adet kristalizasyon havuzu bulunmaktadır. Deniz tuzlalarında üretim Mart ve Ağustos ayları arasında yapılmaktadır. (Yalçın, 1997). Ayvalık tuzlası solar tuzlalar arasında literatürde daha az çalışma bulunan tuzladır bu nedenle çalışmamızda tuzlanın mikrobiyal çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

### Örnekleme Alanı

Çalışmada kullanılan su örnekleri Eylül 2016’da toplamda 5 farklı havuzdan alınmıştır. Örneklerin pH’ı pH metre (Mettler Toledo) ile tuzluluk oranları ise el refraktometresi (Eclipse) ile belirlenmiştir.

### İzolasyon

Mikroorganizmaların izolasyonu için 3 ayrı besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri bileşenleri şu şekildedir; R2A [g/L: maya özütü 0.5, pepton 0.5, kazamino asit 0.5, glukoz 0.5, nişasta 0.5g, Na-pirüvat 0.3,  $K_2HPO_4$  0.3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05; besiyerinin içeriğine ek olarak 500 ml %30 tuzlu su ilave edilmiştir], M1 [g/L: nişasta 10 g, maya özütü 4 g, pepton 2 g, %30’luk tuzlu su 1L], Gliserol-yeast extract agar, [g/L: gliserol 5 ml, maya özütü 2 g,  $K_2HPO_4$  0.1 g, pepton 25 g, agar 15 g] (Öner, 2011). Her bir su örneğinden ayrı ayrı 50’şer ve 100’er µl Gliserol-yeast extract agar. M1 ve R2A agar besiyerine yayma ekim yapılarak 30 °C etüvde 1-2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen kolonilerden çizgi ekim yapılarak saf koloniler elde edilmiştir. Saf kültürler %15’lik gliserol stokları içerisinde -85 °C’de muhafaza edilmiştir.

### Mikroorganizmaların Tanımlanması

Mikroorganizmaların gram reaksiyonlarının belirlenmesi için boyamaları yapılmıştır. PCR temelli tanımlama amacıyla ilk olarak örneklerin DNA ekstraksiyonları Zymo ZR Fungal/Bacterial DNA kiti ve manuel kit protokolü ile yapılmıştır. Manuel DNA ekstraksiyonu Cifuentes ve ark. (2000) ve Nogales ve ark. (1999) a göre küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir: 500 µl distile su içerisinde mikrobiyal hücreler resüspanse edilir ve 14.000 rpm’de 10 dakika mikrosantrifüj cihazı ile santrifüj işlemi yapılır. Daha sonra pelet içine cam bocuk eklenmiş santrifüj tüplerine alınır ve 500 µl CTAB ve 500 µl ekstraksiyon buffer eklenir. 1 dakika vorteks işleminden sonra tüplere fenol-kloroform-isoamilalkol eklenir 1 dakika vorteks işlemi ardından tüpler 1 dakika buzda bekletilir. Bu işlem üç kez tekrarlanır. Süspansiyon tekrarlanır ve karışım 14.000 rpm’de

4 °C'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant yeni tüplere aktarılır üzerine 500 µl fenol:kloroform isoamilalkol eklenir. 1 dakika vorteks 1 dakika buz işlemi üç kez tekrarlanır. Daha sonra 10 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Bu adımdan sonra üst faz yeni tüplere aktarılır ve fenol uzaklaştırılır. Üst faz temiz tüplere aktarılır. DNA çöktürülür. 80 µl sodyum asetat 480 µl isopropanol eklenir ve -20 °C 30 dakika bekletilir. Bekleme işlemi bittikten sonra santrifüj yapılır ve pelet 100 µl %70'lik soğuk etanol ile yıkanır ve havada kurutma işlemi yapılır. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tüplere distile su eklenir ve saf DNA elde edilmiştir. Arkea ve Bacteria domainlerinin tespiti için spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. PCR reaksiyonu için primer; bacteria 27F, arkea 21F ve geri primer olarak 1492R, kalıp DNA ve 1X OneTaq Quick-Load Master Mix ile PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR tüplerine son hacim 25 µl olacak şekilde 24 µl PCR karışımı ve 1 µl template ilave edilerek reaksiyonlar kurulmuştur. Bacteria ve Arkea üyelerinin 16 S rRNA amplifikasyonu için Bacter 50 programı kullanılmıştır. PCR işlemi sonrasında %1'lik agaroz jele yükleme yapılmış ve uygun büyüklükte ürün elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir. 16S rRNA geni PZR ile amplifiye edilen izolatların dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler için 907R ve 1492R primerleri kullanılmıştır. Dizilenen örnekler Gen bankası (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanındaki referans dizilerle karşılaştırılmıştır.

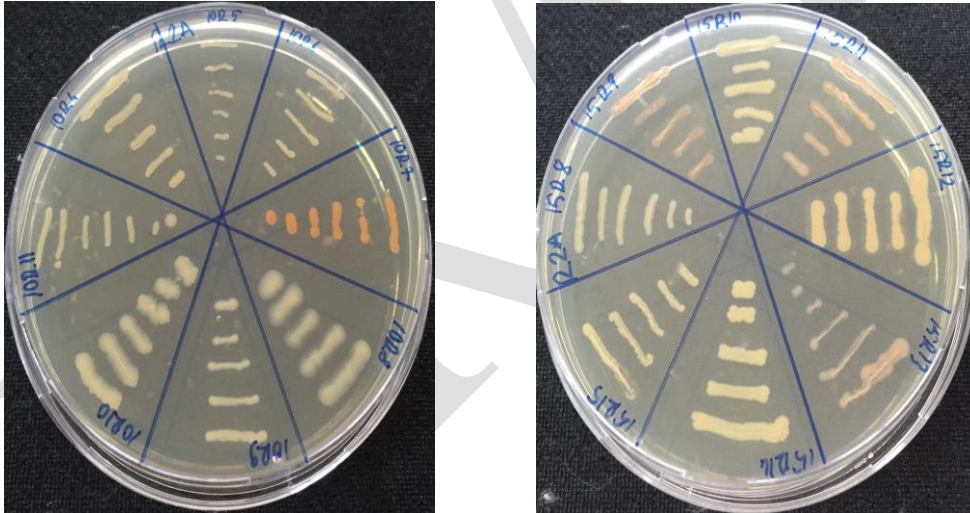
## BULGULAR

### Örnekleme alanı

Tuzladan alınan su örneklerinin toplam tuzluluğu; 1 numaralı havuz için %10 (pH: 7.51), 2 numaralı havuz için %15 (pH: 7.45), 3 numaralı havuz için %17 (pH: 7.58), 4 numaralı havuz için %17 (pH: 7.58), 5 numaralı havuz için %16 (pH: 7.50) olarak belirlenmiştir.

### İzolasyon

Kültür çalışması sonucunda 83 adet izolat elde edilmiş bu izolatlar arasında renk ve koloni morfoloji açısından farklı olduğu düşünülen 16 örnek seçilmiştir. Farklı renk ve biçimli kolonilere sahip bazı izolatların besiyerindeki görüntüleri şekil 1 de verilmiştir.

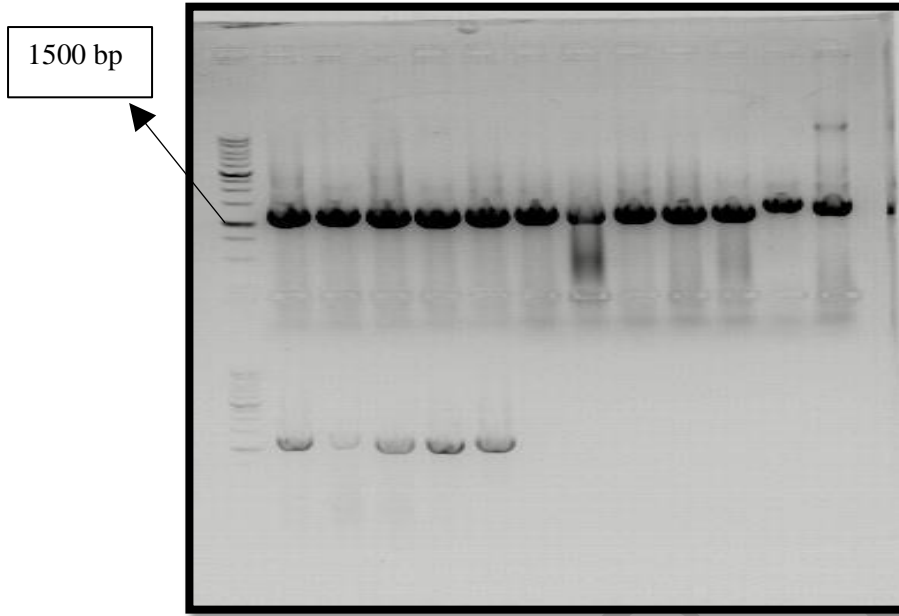


Şekil 1. Çizgi ekim yöntemiyle ekilen saf izolatların R2A agar besiyerindeki görüntüsü

### Mikroorganizmaların Tanımlanması

İzolatların gram boyamalarına göre gram pozitif ve negatif mikroorganizma gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Boyamalar sonucunda uzun ve kısa basiller, kok şeklinde hücreler gözlemlenmiştir. PCR temelli tanımlama için yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda 10000 bp'lık ürün elde edilmiştir. İzolatların 16S rRNA genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu Ayvalık Tuzla'sından izole edilen kolonilerin Bacteria spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR sonucunda yaklaşık 1500 bazlık ürün veren jel görüntüsü gösterilmiştir. Aynı izolatların Archaea spesifik primerler ile gerçekleştirilen 16S PCR'ında ürün elde edilememiştir. Elde edilen pozitif sonuçların jel elektroforez görüntüsü aşağıda şekil 2'de verilmiştir.

Saf kültürlerden yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen DNA'lardan 16S rRNA geni PCR ile amplifiye edilerek bu ürünlerin direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. BM laboratuvarına 907R primeri ile yaptırılan dizi analizi sonucunda elde edilen veriler BLAST programı kullanılarak NCBI veri tabanındaki verilerle karşılaştırılmıştır. Dizi analizi sonuçları ile en yüksek benzerlik oranına sahip organizmalar yüzde değerleri şeklinde Tablo 1'de verilmiştir.



Şekil 2. 16S rRNA PCR ürünleri Jel görüntüsü

Tablo 1: İzolatlar ve dizi analizi sonuçları

İzolat Numarası	Primer	Benzerlik gösterdiği tür	Benzerlik Oranı
1	907R	Uncultured bacterium clone BJGMM-U36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	872/877(99%)
2	907R	Uncultured bacterium clone BJGMM-U36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	874/878(99%)
3	907R	Uncultured bacterium clone BJGMM-U36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	874/878(99%)
4	907R	Uncultured bacterium clone B162 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	862/873(99%)
5	907R	<i>Aliifodinibius</i> sp. 2W32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	844/848(99%)
6	907R	<i>Aliifodinibius</i> sp. 2W32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	846/851(99%)
7	907R	<i>Saccharospirillum</i> sp. MH-I15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	856/872(98%)
8	907R	<i>Caulobacter</i> sp. JL854 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	799/812(98%)
9	907R	<i>Saccharospirillum</i> sp. HCh1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	830/857(97%)
10	907R	<i>Saccharospirillum</i> sp. HCh1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	851/856(99%)
11	1492R	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> strain RK26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	580/591(98%)
13	1492R	<i>Halophilic bacterium</i> 7SPE2022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	813/877(93%)
14	1492R	<i>Aliifodinibius</i> sp. strain ZC29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	461/471(98%)
15	1492R	<i>Aliifodinibius</i> sp. ECH52 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	979/996(98%)
16	1492R	<i>Henriciella</i> sp. strain M69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	989/1025(96%)
17	1492R	<i>Pontibacillus marinus</i> strain YIM 98009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1037/1087(95%)

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Archaea, Bacteria ve Eukarya domainlerinde temsilcileri olan halofilik mikroorganizmaların normal yaşam koşulları dışında ekstrem koşullarda yaşamak için geliştirdikleri bazı özellikler nedeniyle birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Aşırı tuzlu ortamlara dayanıklı enzimleri, tuzluluğa karşı koyabilmek için geliştirdikleri stratejiler, zor şartlarda enerji üretimine olanak sağlayan özel proteinlerinin varlığı halofilik mikroorganizmaların birçok biyoteknolojik çalışmaya konu olmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar arasında polimer üretimi, fermente gıdaların hazırlanması, toksik maddelerin degrade edilmesi ve enzim üretimim gibi çalışmalar bulunmaktadır.

Ülkemiz tuzlular ve tuz gölleri bakımından oldukça bol çeşitliliği olan bir ülkedir. Ülkemizde Tuz gölü, Ayvalık tuzlası, Çamaltı tuzlası, Meke gölü ve daha pek çok küçük tuzla gibi pek çok ortam bulunmaktadır. Bu bölgeleri araştırmaya yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir ve buralardan farklı cinslere ait türler izole edilmiştir ya da kültür bağımsız yöntemlerle varlıkları ortaya konmuş durumdadır. Bunlardan bazılarını belirtecek olursak Tuz Gölü'nde *Haloquadratum walsbyi*, *Halosimplex carlsbadanse*, *Haloterrigena thermotolerans*, *Halanaerobacter lacunarum*, *Acinetobacter baumannii* ve *Cytophaga sp.* varlığı Mutlu (2006) tarafından bildirilmiştir. Çamaltı Tuzlasına yönelik çalışmalardan Yavuztürk (2005)'ün gerçekleştirdiği çalışmada *Halomonas salina* elde edilmiştir. Meke gölünde ise *Halomonas ventosae*, *Salinivibrio costicola subsp.*, *Salinibacter sp.* varlığı Aycan (2012) tarafından elde edilmiştir.

Farklı tuzlular ve tuz gölleri ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına rağmen Ayvalık Tuzla'sının şimdiye kadar mikrobiyolojisi ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. 2002 yılında Rahel ELEVİ tarafından gerçekleştirilen "Ayvalık Tuzlası'ndan izole edilen halofilik bakterilerin karakterizasyonu" adlı tez çalışmasında izole edilen aşırı derecede halofilik bakterilerin tümünün Gram negatif, oksidaz pozitif olduğu ve katalaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen suşların ise Holoarcula ve Halorubrum cinsine ait olabilecekleri raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise moleküler yöntemler kullanılarak *Aliifodinibius sp.*, *Saccharospirillum sp.*, *Caulobacter sp.*, *Serratia marcescens subsp.*, *Halophilic bacterium*, *Pontibacillus marinus*, *Henriciella sp.* türleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan Ayvalık tuzla'sının Halofilik bakteri çeşitliliği yönünden zengin olduğu belirlenmiştir ve bu gölde olduğu gibi ekstrem çevrelerdeki mikrobiyal çeşitliliğin araştırılması endüstriyel ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda kullanımın artmasını sağlayacaktır. Çalışmamızın ileriki aşamalarında yeni örnekler alınarak mevsimsel ve farklı derinliklerdeki çeşitlilik araştırılması planlanmaktadır. Aynı zamanda daha detaylı yöntemler kullanılarak Rec A geni ile PCR optimize edilecektir. Bir diğer yapılması planlanan deney basamağı ise izole edilen türlerin enzim ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesidir.

## KAYNAKLAR

- Aycan, M. (2012). Meke Gölü ve Konya Acıgöl'ün Prokaryotik Çeşitliliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R. A. ve Rodriguez- Valera, F. (2000), Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1715-1719.
- Da Costa, M. S., Santos, H. ve Galinski, E. (1998), An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. *Adv. Bioch. Engin. Biotech.* 61: 117-153.,
- Elevi, R. (2000). Ayvalık Tuzlası'ndan İzole Edilen Halofilik Bakterilerin Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye).
- Galinski, E. (1995), Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 272-328.
- Gerday, C. ve Glansdorff, N. (2007), *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*, ASM, Washington, USA.
- Kılıç, M., Ay, G., Koçbaş, F., Mungan, F., Kula, İ., & Karabaş, M. Ayvalık Tuzlasında Yayılış Gösteren *Suaeda prostrata subsp. prostrata* Pall. Alttürünün Ağır Metal Birikimi.
- Kushner, D. (1985), *The Halobacteriaceae*. P. 171-214. En C. Woese and Wolfe, S(ed.), *The Bacteria.*, 8, Academic Pres, London.
- Mutlu, M. B. (2006) Tuz Gölü Bakterilerinin Karakterizasyonu ve Mevsimsel Dağılımı, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir

- Mutlu, M. B., ve Çınar, S. Sivas'ın Solar Tuzlarındaki Mikrobiyal Toplulukların Kültür-Bağımlı Karakterizasyonu. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji, 7(1), 1-11.
- Nogales, B., Moore, E. R., Abrham, W. R. ve Timmis, K.N. (1999), Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenylpolluted moorland soil. Environ. Microbiol. 1: 199-212.
- Oren, A. (2002), Halophilic microorganism and their environments, Kluwer Academic Publishers, Boston, London, Dordrecht.
- Oren, A. (2008), "Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity," Saline Systems., 4:2.
- Öner, Ö. (2011). Denizel Kaynaklardan Aktinomiset Grubu Mikroorganizmaların İzolasyonu Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İzmir
- Yalçın, E., & Ertem, M. E. (1997). Deniz tuzlarının Türkiye tuz potansiyelindeki yeri. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir.
- Yavuztürk, B. (2005), Ekstremofillerin Ülkemiz Çamaltı Tuzlasından İzole Edilmesi ve Tanılanması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

DRAFT

## Deneyisel diyabet oluşturulan sıçanlarda üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyve ve çekirdek ekstraktlarının serum parametreler üzerine etkilerinin araştırılması

Semra Adıyaman, İsmail Çelik, Abdullah Turan\*, Abdalbaki Demir

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Van, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: abdullahturan72@gmail.com

### Özet

Bu çalışmada, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda (*Wistar albino*), Van yöresinde yetişen üzüm çeşidinin (*Vitis vinifera* L.) meyve ve çekirdek ekstraktlarının farklı dozlarının diyabet komplikasyonları üzerine iyileştirici etkileri araştırıldı. Deneysel muamele öncesi, üç gün boyunca tek dozda (2000 mg/kg vücut ağırlığı) üzüm çekirdeği ve meyve ekstresi akut toksisite testi için uygulandı ve ölüm tespit edilmedi. 49 adet sıçan her grupta 7 adet olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Sıçanlar rastgele guruplandırıldı; normal kontrol (NK), diyabet kontrol (DK), diyabetik + akarboz (doz 20 mg/kg) (DA), diyabetik + üzüm meyvesi ekstresi 100 mg/kg (DM1), diyabetik + üzüm meyvesi ekstresi 200 mg/kg (DM2), diyabetik + üzüm çekirdeği ekstresi 100 mg/kg (DÇ1) ve diyabetik + üzüm çekirdeği ekstresi 200 mg/kg (DÇ2) olarak guruplandırıldı. Ekstraktlar gavaj yoluyla verildi. Deneysel diyabet streptozotosin (STZ) [55 mg/kg, intra peritoneal (i.p)] ile oluşturuldu. 21 günlük deneme sürecinde 7 günde bir sıçanların kan şeker düzeyleri ve canlı ağırlıkları kaydedildi. Muameleler sonunda; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) serum enzim seviyeleri, lipit profili [trigliserit (TG), total kolesterol (TC), HDL-kolesterol (HDL-c)], kreatin (CRE), üre ile total kanda glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) değerleri tespit edildi. Elde edilen sonuçlara göre; bütün grupların canlı ağırlıklarında anlamlı ( $p \geq 0.05$ ) bir değişiklik saptanmadı. DK grubunun NK grubuna ve ekstrakt takviyesi yapılan diyabetik grupların (DM1, DM2, DÇ1 ve DÇ2) DK ve NK gruplarına göre AST, ALT ve LDH düzeylerindeki önemli ( $p \leq 0.05$ ) artış tespit edildi. Biyokimyasal parametreler ile ilgili olarak; DK grubunun NK grubuna göre glukoz ve HbA1c seviyelerinde artış tespit edilirken, TC ve HDL-c değerlerinde ise diyabetik ve diyabetik ekstrakt verilen gruplarda NK'ya göre anlamlı ( $p \leq 0.05$ ) düşüş kaydedildi. Sonuç olarak; çalışmada kullanılan üzüm çeşidinin meyve ve çekirdek ekstraktlarının serum enzimleri üzerinde olumlu etki sahip olduğu ancak ekstraktların diyabetik komplikasyonlara karşı iyileştirici etkileri için kesin bir sonuca varılamayacağı ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Diyabet, Serum biyobelirteçler, Üzüm, Üzüm çekirdeği, Sıçan

### Investigation of the effects of grape (*Vitis vinifera* L.) fruit and seeds extracts on serum parameters in experimental diabetic rats

#### Abstract

In this study, the effects of different doses of fruit and seed extracts of grape variety (*Vitis vinifera* L.) grown in Van region on diabetic complications in experimental diabetic rats were investigated. Before the experimental treatment, grape seed and fruit extracts were administered for acute toxicity test in a single dose (2000mg / kg body weight) for three days and no death was detected. 49 rats were divided into 7 groups with 7 in each group. Experimental rats were randomly grouped as normal control (NK), diabetes control (DK), diabetic + acarbose (dose 20 mg/kg) (DA), diabetic + grape fruit extract 100 mg/kg (DM1), diabetic + grape fruit extract 200 mg/kg (DM2), diabetic + grape seed extract 100 mg/kg (DÇ1) and diabetic + grape see extract 200 mg/kg (DÇ2). Extracts were administered by gavage. Experimental diabetes was induced by streptozotocin (STZ) 55 mg/kg, intra-peritoneal (i.p). Blood sugar levels and live weights of rats were recorded every 7 days in the 21-days trial period. At the end of the treatments; aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) lactate dehydrogenase (LDH) serum enzyme levels, lipid profile [triglyceride (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-c)], creatine (CRE), urea and total blood glycosylated hemoglobin (HbA1c) values were determined. According to the obtained results; there was no significant ( $p \leq 0.05$ ) change in live weight of all groups during experiment. Significant increase in AST, ALT and LDH levels ( $p \leq 0.05$ ) were found in DK group compared to NK group and extract diabetic groups (DM1, DM1, DÇ1 and DÇ2) compared to DK and NK groups. Regarding biochemical parameters; while the increase in glucose and HbA1c levels were found in the DK group compared to the NK group, TC and HDL-c values were significantly decreased in diabetic and diabetic extract groups compared to NK ( $p \leq 0.05$ ). As a result; it was shown that the fruit and seed extracts of grape used in the study had positive effects on serum enzymes, but there is no definitive result for its healing effects against diabetic complications.

**Keywords:** Diabetes, Serum biomarkers, Grape, Grape seed, Rat

## GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), pankreasın insülin üretememesi ya da vücudun pankreasın ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması sonucu meydana gelen kronik bir hastalıktır. İnsülin üretilmemesi veya etkili olarak kullanılmaması kan glukoz seviyesinde artışa neden olmaktadır. Uzun süreli yüksek glukoz seviyesi vücutta hasarlar ve çeşitli doku ile organların görevlerini yerine getirememesiyle ilişkilendirilmektedir (IDF, 2016). Bitkiler ve türevleri binlerce yıldır DM tedavisinde kullanılmaktadır. Sentetik olanlara karşın bitkisel ilaçlar dünya çapında uzun süredir DM tedavisinde kullanılmaktadır ve sıklıkla daha az toksik ve daha az yan etkili olduğu düşünülmektedir (Mishra ve ark., 2009; Prasad ve ark., 2009). Ülkemizde de diyabet tedavisinde kullanılan sentetik ilaçlara alternatif olabilecek bitkilere dair bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Yetistirilme alanı ve üretim miktarı bakımından ülkemizde ve dünyada ilk sıralarda yer alan üzüm, değişik şekillerde işlenerek (pekmez, üzüm suyu, kuru üzüm, şarap, sirke, bulama, köfter vb.) her mevsimde tüketebileceğimiz bir besindir. Üzümün, içerdiği resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) maddesi ile kansere karşı savaş açtığı 1985’li yıllarda Japonya’da başlayan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu madde bitkiler tarafından üretilen fitoaleksinin gurubu bileşiklerden bir tanesidir. Resveratrol sadece renkli (kırmızı, siyah) üzümlerin kabuk kısmında bulunmaktadır. Renkli üzümlerde bulunan resveratrol maddesinin antioksidan aktivitesi göstererek kılcal damarların tıkanmasını engellediği, apolipoprotein ve lipid sentezinin modülasyonu ile kılcal damarlarda trombosit birikmesini engellediği *in vitro*, *ex vitro* ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Meyer ve ark., 1998; Meyer ve ark., 1997). Son zamanlarda üzüm meyvesi ve çekirdeğine yönelik yapılan araştırmalar pek çok hastalığın tedavisinde üzümün önemli rol oynadığını göstermektedir. Yüksek tansiyon, göz bozuklukları, diyabet, kalp ve cilt hastalıklarını iyileştirme noktasında çok önemli rol oynamaktadır. Karaciğer harabiyeti ve karaciğer hücre membranlarının bozulmasıyla hücre sitoplazmasında bulunan AST ve ALT gibi enzimlerin kan plazmasına geçerek kan serumundaki düzeylerinin yükseldiğini belirtilmiştir (Murt ve ark., 1980; Turan ve Çelik, 2016). Bitki fenol ve polifenoller, potansiyel antioksidan aktivitelerinden dolayı oksidatif stresle ilişkili olduğuna inanılan nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser gibi patolojik durumların önlenmesinde önemli rol oynar (Loss, 2007). Fenoller ve kırmızı şarapda, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) *in vitro* olarak insanda oksidasyonu engellediği kanıtlanmıştır. (Frankel ve ark., 1995; Turan ve Çelik, 2016). Üzüm çekirdekleri monomerik fenolik bileşenlerle zengin kaynaklardır. Monomerik fenolik bileşenlerden, (+)-katezin (polifenolik antioksidan bitki metaboliti), (-)-epikatezin ve (-)-epikatezin-3-O-gallate ve dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidinlerin antimutajenik ve antiviral ajanlardır (Saito ve ark., 1998). Ayrıca üzüm çekirdeği polifenollerinin vitamin C ve E’den çok daha güçlü serbest oksijen radikal temizleyicisi olduğu gösterilmiştir (Maffei ve ark., 1996; Bagchi ve ark., 1998). Üzüm çekirdeğindeki polifenoller; prosiyanidin veya proantosiyanidin kombine isim olarak adlandırmış olup, son zamanlarda yapılan çalışmalarda üzüm çekirdeğinde bulunan prosiyanidinlerin yangı, artritis ve allerji oluşumunu engelleme gibi birçok etkisinin yanında, kalp hastalıkları ve deri yaşlanmasından korunmada da etkili olduğunu göstermişlerdir (Bagchi ve ark., 1997,1998 ). Sıçan karaciğerinde radyasyonun yol açtığı oksidatif stres üzerinde üzüm çekirdeği ekstresinin etkisi incelenmiş. Üzüm çekirdeği ekstresinin hücre membranında protein ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı azalttığı, ayrıca üzüm çekirdeği ekstresi verilen deney gruplarının RTx grubundaki malondialdehid seviyesinde orta derecede bir azalma olduğu gözlemlenmiştir (Çetin ve ark., 2008). Bu çalışmada halk arasında diyabet tedavisinde kullanılan *Vitis vinifera* L. meyve ve çekirdeğinden elde edilen ekstraktların deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda çeşitli biyobelirteçler üzerine iyileştirici etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

### Deneylede Kullanılan Materyaller

Araştırmamızın canlı materyali olan sıçanlar (*Wistar albino*) Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edildi. Çalışmalar sırasında kullanılan sarf kimyasallar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Başkanlığı’nın desteği çerçevesinde medikallar aracılığı ile satın alındı. Araştırmada kullanılan üzüm çeşidi (*Vitis vinifera* L.) manavdan temin edildi.

### Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Liyofilize ekstraktı Dalar ve Konczak (2013) metodunun modifiye şekline göre hazırlandı. Van merkez Alaköy üreticisinden alınan küşme üzüm çeşidi (*Vitis vinifera* L.) meyvesi el ile çekirdeklerinden ayrıldı. Çıkarılan çekirdekler çalışma zamanına kadar -20 °C’de muhafaza edildi. Daha sonra bitki meyve ve çekirdeği numunesinden 50 gr tartılarak, bir cam behere konuldu ve 1000 ml saf su ile blenderde parçalandı, beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp 24 saat çalkalayıcıda homojenize edildi, daha sonra süzgeçten geçirilen homojenize karışım 10 ml’lik falkon tüplerine pipetlenip 5 dakika 3500 rpm’de santrifüj cihazında santrifüj

edildi. Elde edilen supernatant mikro pipet yardımı ile 0.45 µm'lik hidrofilik filtreden (Millipore) geçirildi. Bu işlem yeniden iki defa daha tekrarlandı ve elde edilen tüm supernatantlar aynı kaba konuldu. Filtreden geçirilen sıvıdan 400 ml alınıp evaporatöre bırakılarak +37 °C'de yaklaşık 1 saat 40 dakika buharlaştırmak suretiyle çözücünden arındırıldı. İşlem sonunda yoğunlaştırılan ekstrakt falkon tüplerine konularak -80 °C'de 48 saat bekletildi. Sonra dondurulan numuneler liyofilizatörde 0.030 mBar basınç ve -54 °C'de 3 gün boyunca kurutuldu. Elde edilen liyofilize salin fraksiyonu, analiz işlemlerine başlanana dek, -20 °C'de muhafaza edildi. Böylece ekstraksiyon işlemi tamamlanmış oldu.

### **Deney Hayvanları**

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 25.09.2014 tarihli ve 2014/11 sayılı izni ile yapıldı. Toksikite testi ve deney muameleler için çalışmamızda kullanılan 53 adet *Wistar albino* ırkı 3-4 aylık ve ağırlıkları 150-240 g arasında değişen dişi sıçanlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edildi. Sıçanlar tartılarak canlı ağırlıkları not edildi. Ayrıca çalışmaya başlamadan önce sıçanların kan glukoz değerlerine de bakıldı. Sıçanlar (25±1 °C) oda sıcaklığında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodunda ve *ad libitum* olarak beslendi.

### **Toksikite Testi**

Toksikite testi için her grupta 4 sıçan bulunacak şekilde 2 gruba *Vitis vinifera* L. meyve çekirdeği ekstraktı OECD'ye göre limit doz olan 2000 mg/kg üzüm meyva ve çekirdeği ekstresi oral olarak verildi. 3 günlük uygulama süresi boyunca sıçanlarda ölüm, makroskopik ve fizyolojik olarak olumsuz bir durum gözlenmedi.

### **Streptozotosin (STZ) ile Deneysel Diyabet Oluşturulması**

Çalışmada kullanılacak 49 sıçandan kontrol grubu dışındaki tüm gruplara; STZ, pH'ı 4.5 olan 0.1 M buffer sitrat içinde çözünmesiyle oluşan çözeltisi canlı ağırlıklarına göre tek doz 55 mg/kg olmak üzere intra peritoneal olarak uygulandı ve diyabet modeli oluşturuldu. 72 saat sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kan örneklerine kan glukoz ölçüm cihazı ile bakılarak, sıçanların açlık kan şekerleri ölçüldü ve glukoz seviyeleri 200 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilerek çalışmaya dahil edildi (Eidi ve ark., 2009).

### **Deney Gruplarının Oluşturulması**

Çalışmada kullanılan 53 adet sıçandan 4 adet toksikite testinde geriye kalan 49 adet sıçan, her grupta rastgele seçilmiş 7 sıçan olmak üzere toplam 7 gruba ayrıldı. Gruplar çalışmanın amacına uygun olacak şekilde aşağıdaki şekilde dizayn edildi. Gruplar; I. Grup Normal Kontrol (NK), II. Grup Diyabet (Diabetes mellitus) Kontrol (DK), III. Grup diyabetik + akarboz (doz 20 mg/kg) (DA), IV. Grup diyabetik + üzüm meyvesi ekstresi 100 mg/kg (DM1), V. Grup diyabetik + üzüm meyvesi ekstresi 200 mg/kg (DM2), VI. Grup diyabetik + üzüm çekirdeği ekstresi 100 mg/kg (DÇ1) ve VII. Grup diyabetik + üzüm çekirdeği ekstresi 200 mg/kg (DÇ2) olacak şekilde guruplandırıldı. Sıçanlar uygun nemde (ortalama % 60 düzeyinde), 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde *ad libitum* olarak beslendi. Ayrıca kafesler her gün temizlendi. Diyabet oluşturulduktan sonra gruplara ekstrakt verilmeye başlandı. Bitki ekstraktı verilmeye başlandığı günden itibaren 0.gün 7.gün, 14. gün ve 21. gün kan glukoz değerleri, sıçanların kuyruk veninden alınan kan ile glukometrede ölçülerek kaydedildi. Ölçümlerin yapıldığı günlerde, ayrıca 0.saat açlık kan şekeri ve ekstraktların verilmesine takiben 2. saat ve 4. saatlerde de kan şekeri ölçümleri yapıldı. Deney süresi 21 gün boyunca devam etti. Ayrıca deneme boyunca sıçanların günlük su ve yem tüketimi ile haftalık canlı ağırlıkları belirli bir plan dâhilinde kaydedildi.

### **Kan ve Doku Örneklerinin Alınması**

Deney 21 günlük muamele sonunda sıçanlar % 10'luk ketaminle anesteziye alındıktan sonra, gerekli olan kan enjektörler yardımıyla hayvanların kalbinden alındı. Kanlar EDTA'lı ve biyokimya cam tüplere konuldu. EDTA'lı kan HbA1c seviyesine bakmak için kullanıldı. Biyokimya tüplerindeki kan ise serumda bakılması gereken parametreler için kullanıldı. Kanlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun Odabaş Tıp Merkezi Laboratuvarında; aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) serum enzim seviyeleri, lipid profili [trigliserit (TG), total kolesterol (TC), HDL-kolesterol (HDL-c)], kreatin (CRE), üre ile total kanda glikozillenmiş (glikozlenmiş) hemoglobin (HbA1c) değerleri tespit edildi. Doku olarak ince bağırsak alındı. İnce bağırsak Turan ve Çelik, (2016) metoduna göre homojenizasyonu yapıldı. İnce bağırsakta α-Glikozidaz seviyesi bio vision standart kit metodu ile aktivitesine bakıldı. Elde edilen sonuçlar NK grubu ve DK grubuna göre ortalama ve standart sapma (X±SD), hazır program kullanarak



standart metotlara göre; grup ortalamaları arasındaki fark ise One Way ANOVA-Tukey testi kullanılarak ortaya konuldu. Önem derecesi bütün testler için ( $p \leq 0.05$ ) olarak kabul edildi (İkizler ve ark., 1996).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlardan 21 gün boyunca farklı iki dozda üzüm meyva ve çekirde ekstratları verildi. Uygulamanın sonuna da sıçanların kalbide kan alındı. Alınan kanlar biyokimya ve ETDA'lı tüplere konuldu. Bu kanlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun Odabaşı Tıp Merkezi Biyokimya laboratuvarlarında bakıldı.  $\alpha$ -Glikozidaz aktivitesi ise üniversitenin Moleküler biyoloji ve genetik laboratuvarında bakıldı.

Çizelge 1.1. Denemenin farklı günlerinde sıçanların canlı ağırlıkları

GÜNLER	GRUPLAR						
	NK X $\pm$ SD	DK X $\pm$ SD	DA X $\pm$ SD	DM1 X $\pm$ SD	DM2 X $\pm$ SD	DÇ1 X $\pm$ SD	DÇ2 X $\pm$ SD
0. Gün	197,7 $\pm$ 29,6	197,9 $\pm$ 16	215,3 $\pm$ 12,4	203 $\pm$ 8,4	210,5 $\pm$ 10,1	195,9 $\pm$ 9	204,5 $\pm$ 11,6
6. Gün	203,1 $\pm$ 29,5	194,9 $\pm$ 16,1	217,7 $\pm$ 12,7	207,6 $\pm$ 8,6	209,7 $\pm$ 11,9	198,3 $\pm$ 8	206,3 $\pm$ 11,2
10. Gün	209,5 $\pm$ 29	191,1 $\pm$ 16,2	222,1 $\pm$ 12,5	210,9 $\pm$ 8,7	210,7 $\pm$ 9	197,4 $\pm$ 7,5	207,2 $\pm$ 12,1
15. Gün	214,7 $\pm$ 29,4	186,9 $\pm$ 15,3	222,7 $\pm$ 13,4	211,5 $\pm$ 9,6	211,7 $\pm$ 10,9	196,3 $\pm$ 9,4	208,8 $\pm$ 11
21. Gün	221 $\pm$ 29,4	182,4 $\pm$ 16,2	226,4 $\pm$ 11,5	213 $\pm$ 10,2	211,2 $\pm$ 10,9	201,2 $\pm$ 7,4	206,1 $\pm$ 11,3

\*: Grup içinde 0. Gün'e göre aradaki fark önemlidir ( $p < 0.05$ ).

STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlar üzerine yapılan çalışmalarda canlı ağırlıklarında istatistik açıdan önemli olmasa bile kaydeğer düzeyde azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Canlı ağırlık kayıplarının yapılan çeşitli çalışmalarda, insülin düzeyinde görülen azalmaya bağlı olarak yapısal proteinlerde katabolik tepkimelerin artışı nedeniyle olduğu belirtilmiştir (Cheng ve ark., 2012; Özkol ve ark., 2013). Demir ve Yılmaz (2014) glukoz metabolizması üzerinde yaptıkları çalışmada hipoglisemik ajanların diyabetik sıçanlarda kilo artışı veya kaybını engellemede etkili olduklarını tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada ise sıçanların ilk günkü (0.gün) canlı ağırlıkları ile sonraki haftalarda ölçülen canlı ağırlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları kaydedildi.

Çizelge 1.2. Ekstraktların muamelesinden sonra farklı saatlerdeki kan glukoz değerleri

ÖLÇÜM SAATLERİ	GRUPLAR						
	NK X $\pm$ SD	DK X $\pm$ SD	DA X $\pm$ SD	DM1 X $\pm$ SD	DM2 X $\pm$ SD	DÇ1 X $\pm$ SD	DÇ2 X $\pm$ SD
0.Saat	75,5 $\pm$ 2,2	499,8 $\pm$ 27	245,3 $\pm$ 23,1	380,3 $\pm$ 19,9	326,1 $\pm$ 3,26	248 $\pm$ 26	195,7 $\pm$ 7,5
2.Saat	79,3 $\pm$ 2,9*	534,8 $\pm$ 33,4	267,1 $\pm$ 32,9	382,2 $\pm$ 22	331,8 $\pm$ 32,7*	237,2 $\pm$ 14,6*	192,8 $\pm$ 6,1
4.Saat	83,8 $\pm$ 3,1	579 $\pm$ 19	272,3 $\pm$ 32,6	385,6 $\pm$ 26,8	334,8 $\pm$ 32,3*	222,5 $\pm$ 30,6*	189 $\pm$ 4,1

\*:0. saate göre 2. saat ve 4. saatlerde ölçülen kan glukoz değerlerindeki fark önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Yapılan çalışmalarda, antidiyabetik amaçla kullanılan antihiperglisemik özelliğe sahip bazı bitkilerin kan glukoz düzeylerini önemli ölçüde azalttığı veya dengelediği tespit edilmiştir. (El Shafey ve ark., 2013; Meliani ve ark., 2011). STZ ile deneysel diyabet oluşturdukları sıçanlar üzerine limon çekirdeğinin antioksidan özelliğini araştırdıkları çalışmalarında, 1. ve 3. saatlerde kan glukoz değerlerinin 0.saate göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir (Demir ve Çelik, 2017). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlar üzerine yapılan çalışmalarda kan glukoz düzeyinin kontrol gruplarına göre 2.5-3.5 kat artış gösterdiği, bitki ekstraktlarının uygulandığı gruplarda ise anlamlı bir azalma görüldüğü tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2015; Suparto ve ark., 2008). Yaptığımız çalışmada 2. ve 3.saatlerde kan glukoz değerlerinin 0.saate göre istatistiksel bakımdan anlamlı oldukları kaydedildi.

Çizelge 1.3. Denemenin farklı günlerinde sıçanların kan glukoz değerleri

GÜNLER	GRUPLAR						
	NK X $\pm$ SD	DK X $\pm$ SD	DA X $\pm$ SD	DM1 X $\pm$ SD	DM2 X $\pm$ SD	DÇ1 X $\pm$ SD	DÇ2 X $\pm$ SD
0. Gün	72,7 $\pm$ 9,6	474,4 $\pm$ 154,6	247,3 $\pm$ 113,4	390,1 $\pm$ 90	289,3 $\pm$ 80	253,7 $\pm$ 108,3	205,4 $\pm$ 45,5
7. Gün	75,4 $\pm$ 11	483,6 $\pm$ 92,9	274,9 $\pm$ 80,6	378,3 $\pm$ 67,2	328,9 $\pm$ 74	253,7 $\pm$ 112,6	187,9 $\pm$ 17,2
14. Gün	75,7 $\pm$ 12,4	504,7 $\pm$ 112,9	219 $\pm$ 43,7	353,4 $\pm$ 96,7	368,1 $\pm$ 102,8*	230,9 $\pm$ 75,2*	192,3 $\pm$ 13,8
21. Gün	78 $\pm$ 8,6	536,4 $\pm$ 65	239,9 $\pm$ 36,5	399,4 $\pm$ 122,5	317,9 $\pm$ 35,1	225,1 $\pm$ 91,5*	182 $\pm$ 11,9

\*: Grup içinde 0. Gün'e göre aradaki fark önemlidir ( $p < 0.05$ ).

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlar üzerine yapılan başka çalışmalarda kan glukoz düzeyinin kontrol gruplarına göre 2.5-3.5 kat artış gösterirken, bitki ekstraktlarının uygulandığı gruplarda anlamlı bir azalma görüldüğü tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2015; Suparto ve ark., 2008). Yapılan birçok çalışmada araştırmacılar, antidiyabetik amaçla kullanılan antihiperglisemik özelliğe sahip bazı bitkilerin kan glukoz düzeylerini önemli ölçüde azalttığı veya dengelediğini tespit etmişlerdir (El Shafey ve ark., 2013; Meliani ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada 2. ve 3. saatlerde kan glukoz değerlerinin 0. saate göre istatistiksel bakımdan anlamlı oldukları kaydedildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada kullandığımız üzümün meyve ve çekirdek ekstraktlarının antihiperglisemik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Çizelge 1.4. Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda bazı serum enzimleri, HbA1c değeri ve ince bağırsak  $\alpha$ -Glikozidaz değerleri

PARAMETRELER	GRUPLAR						
	NK	DK	DA	DM1	DM2	DÇ1	DÇ2
	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD	X $\pm$ SD
AST (U/L)	158,7 $\pm$ 28,8	303,8 $\pm$ 79,8 <sup>a</sup>	214,6 $\pm$ 53,1 <sup>ab</sup>	1031,8 $\pm$ 135,6 <sup>ab</sup>	871,7 $\pm$ 117,2 <sup>ab</sup>	625,9 $\pm$ 149,7 <sup>ab</sup>	698,3 $\pm$ 91,4 <sup>ab</sup>
ALT (U/L)	49,7 $\pm$ 9,7	164,5 $\pm$ 44,4 <sup>a</sup>	78,5 $\pm$ 18,5 <sup>ab</sup>	772,9 $\pm$ 210,9 <sup>ab</sup>	568,1 $\pm$ 184,7 <sup>ab</sup>	544,8 $\pm$ 152,5 <sup>ab</sup>	516,2 $\pm$ 181 <sup>ab</sup>
LDH (U/L)	1670,10 $\pm$ 21,25	1429,90 $\pm$ 24,17	1492,10 $\pm$ 23,6	1068,30 $\pm$ 18,54 <sup>ab</sup>	1226,01 $\pm$ 19,22 <sup>a</sup>	1150,60 $\pm$ 19,5 <sup>ab</sup>	1181,02 $\pm$ 12,72 <sup>ab</sup>
$\alpha$ -Glikozidaz	6,78 $\pm$ 0,16	6,94 $\pm$ 0,32	7 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,86 $\pm$ 0,14	6,81 $\pm$ 0,15	6,74 $\pm$ 0,16	6,9 $\pm$ 0,12
TG (mg/ dL)	82,1 $\pm$ 9,1	70,4 $\pm$ 24,3	56,2 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>	75,4 $\pm$ 22,7	58,4 $\pm$ 21,7 <sup>a</sup>	45,6 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	59,7 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>
TC ( mg/dL )	63,3 $\pm$ 7,6	50,9 $\pm$ 11,1 <sup>a</sup>	51,1 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	55,3 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	44,5 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	51,7 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>	47,9 $\pm$ 7,7 <sup>a</sup>
LDL-c (mg/ dL)	51,3 $\pm$ 5,5	41,6 $\pm$ 8,3 <sup>a</sup>	43,3 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>	41,7 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	35,3 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	42,3 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	37,5 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>
HbA1c (%)	4,2 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	6,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
CRE (mg/ dL)	0,40 $\pm$ 2	0,38 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,06
URE (mg/ dL)	33,20 $\pm$ 27	53,70 $\pm$ 99 <sup>a</sup>	42,70 $\pm$ 68 <sup>ab</sup>	55,6 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	67,4 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	49,9 $\pm$ 98 <sup>a</sup>	53,4 $\pm$ 84 <sup>a</sup>

a: Kontrol grubu ile Diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

b: Diyabet Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0.05).

Önemli hücrel enzimlerden olan ALT, AST ve LDH enzimleri, yapılan çalışmalarda hücre içi değerleri hücre dışına göre çok yüksek olduğu durumlarda veya plazmada söz konusu enzimlerde meydana gelen az miktarda bir artış da bile hücrel hasarın bir biyobelirteci olabilir. ALT karaciğer, kas, böbrek ve iskelet kaslarında bulunur, AST ise karaciğer, kalp kası ve iskelet kasında bulunmaktadır (Ersöz, 2002; Şentürk ve ark., 2006). STZ ile deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanların karaciğerlerinde AST ve ALT enzim aktivitelerinde önemli derecede artış meydana geldiği bildirilmiştir (Zafar ve ark., 2009). Özkol ve ark., (2013); Dogan ve ark., (2015), yaptıkları çalışmalarda diyabetik sıçanlarda AST, ALT ve LDH değerlerinde normal kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan önemli bir fark gözlemlediklerini (p<0.05), diyabetik gruplarda da verdikleri bitki ekstraktının diyabetik kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir fark kaydettiklerini bildirmişlerdir (p<0.05). Benzer başka bir çalışmada karaciğerde meydana gelen hasarda LDH düzeyinde karakteristik değişimler tespit edildiği ifade edilmiştir (Shimizu ve Ichihara, 2015). Mohammed ve ark. diyabet üzerine yaptıkları çalışmada diyabetik kontrol grubunun ALT ve LDH değerlerinde normal kontrol grubuna göre artış gözlemlenirken, bitki ekstraktının verildiği diyabetik grubunun ALT ve LDH değerlerinde diyabetik kontrol grubuna göre bir düşüş saptadıklarını bildirmişlerdir (Mohammed ve ark., 2016). Alfa-glikozidaz enzimi ince bağırsak hücrelerinin epitelinde fırçamsı kenar hücrelerinde mevcut olan karbonhidratlardan oligosakkarit ve disakkaritleri monosakkaridlere parçalayıp sindirim sisteminin son safhasında önemli rol oynayan bir enzimdir (Clissold ve Edwards, 1988; Toeller, 1994). Nişasta ve sakroz diyet karbonhidratların temel bileşenidir. Bundan dolayı  $\alpha$ -glukosidaz inhibitörleri ince bağırsak boyunca karbonhidrat absorpsiyon süresini artırarak yemek sonrası hiperglisemiye önlediği ve plazma glukoz değerlerini azalttığı bildirilmiştir (Gao ve ark., 2008). Bizim yaptığımız çalışmada ALT, AST, LDH, URE ve glukoz değerlerinde istatistiksel açıdan elde ettiğimiz anlamlı değerlerin, üzüm ve çekirdeğinde bulunan antioksidan bileşiklerden kaynaklanmış olabileceğini düşünüyoruz. Özkol ve ark., (2013); Dogan ve ark., (2015), yaptıkları çalışmalarda kreatinin ve üre değerlerinde diyabetik gruplarda normal kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı artış olduğu gözlenirken, antihiperglisemik olduğunu iddia ettikleri bitki ekstraktının uygulandığı diyabetik grupların kreatinin ve üre düzeylerinde ise diyabetik kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana geldiğini gözlemlediklerini belirtmişler (Özkol ve ark., 2013; Dogan ve ark., 2015). STZ ile deneysel diyabet oluşturulan diğer bir çalışmada kreatinin anlamlı bir artış görülmesi, hiperglisemiye dayalı olarak meydana gelen değişiklikler ile işlevlerinde hasar gördüğünün göstergesi olarak kabul edilmiştir. Fakat üredeki yükselmenin kısmen hacim artışına dayalı olarak su kaybından kaynaklandığını

ifade etmişlerdir (Dönmez, 2008). Doğan ve ark., (2015)'nın STZ deneysel diyabet oluşturdukları sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada sıçanlarda artan TC, TG ve LDL-C değerlerinin tedavi için uyguladıkları bitki ekstraktının diyabetik gruplarda bu parametrelerin tekrar normale doğru bir düşüş sergilediğini belirtmişlerdir. Yine STZ ile deneysel diyabet oluşturulan başka bir çalışmada TG, TC ve VLDL değerlerinde normal kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli artma, HDL-c düzeylerinde önemli azalma tespit edilmiştir. Bitki ekstraktının ve referans maddenin uygulandığı başka bir çalışmada araştırmacılar diyabetik gruplarda diyabetik kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel bakımdan TG ve TC düzeylerinde azalma kaydedilirken HDL-c düzeylerinde ise artma meydana geldiğini belirtmişlerdir (Kumar ve ark., 2015). Bizim yaptığımız çalışmada ise diyabetik sıçanlara verdiğimiz üzüm ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının diyabete bağlı olarak oluşan hasarları önlemeye yönelik olumlu etkileri olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Fakat CRE değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde edilmedi.

## SONUÇ

**Yaptığımız çalışmadan çıkarılabilecek sonuç ve öneriler:** Çalışma boyunca haftada bir ölçülen kan glukoz düzeylerinde ekstrakt muamelesinden önce (0. saat) ve ekstrakt uygulandıktan sonra 2. ve 4. saatlerdeki kan glukoz değerlerinde DM2 ve DÇ1 gruplarında önemli düzeyde düşüş meydana gelmiş olması, sözkonusu ekstraktların geçici şeker düşürücü etkilerinin olabileceği sonucunu düşündürmüştür. Karaciğer harabiyet belirteçleri olan enzimlerden AST, ALT ve LDH düzeylerindeki sonuçlardan yola çıkarak, uyguladığımız ekstraktların diyabetten kaynaklı meydana gelen hasarlar ve ekstraktların etkilerinin sonucu olarak hepatositlerin zar geçirgenliği ve taşıma sitemindeki değişikliklerinden dolayı olabileceği kanısına varıldı. Keza, ekstrakt muamele gurubu sıçanlarının kanlarında gözlemlenen lipid profili (TG, TC ve LDLc) parametrelerin normal gruba doğru çekilmesi kullanılan üzüm çeşidinin meyve ve çekirdek ekstraktlarının antilipidemik özelliğe sahip olabileceği oysaki STZ ile sıçanlarda oluşan diyabetik harabiyetten kaynaklı böbrek dokusunda oluşan nefropatiyi değerlendirilmesini sağlayabilecek parametrelerin sonuçları için aynı söylemleri söylemenin zor olduğu sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2015-FBE-YL062 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına, Dr. Öğr. Ü. Bedia BATI, Dr. Öğr. Ü. Elif Ebru ALKAN ve Arş. Gör. Neşe Eray'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, Stohs SJ 1998. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen Pharmacology*, 30: 771-776.
- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamin C and E and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 95: 179-189.
- Çetin A, Kaynar L, Koçyiğit İ, Hacıoğlu SK, Saraymen R, Öztürk A, Orhan O, Sağdıç O 2008. The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *Turk Journal Gastroenterol*, 19 (2): 92-98.
- Cheng D, Liang B, Li Y 2013. Antihyperglycemic effect of Ginkgo biloba extractin streptozotocin-induced diabetes in rats. *BioMed Research International*, 1-7.
- Clissold SP, Edwards C 1988. Acarbose. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*, 35 (3): 214-243.
- Dalar A, Konczak I 2013. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products*, 44: 383-390.
- Demir E, Yılmaz Ö 2014. The effects of pine oil on some biochemical parameters in the liver and kidney streptozotocin induced tip-1 diabetes. *Karaelmas Scienceand Engineering Journal*, 4(1): 43-51.

- Demir A 2017. Deneysel Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Limon Çekirdeği (*Citrus Limonum*) Ekstraktının İyileştirici Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.
- Dogan A, Celik I, Kaya MS 2015. Antidiabetic properties of lyophilized extract of acorn (*Quercus brantii* Lindl.) on experimentally STZ-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 176: 243-251.
- Dönmez S 2008. Deneysel diyabetik nefropatide irbesartan ve antioksidan tedavilerin karşılaştırılması. Tıpta uzmanlık tezi. Trakya Üniversitesi. Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı.
- Eidi A, Eidi M, Darzi R 2009. Antidiabetic effect of *Olea europaea* L. in normal and diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 23: 347-50.
- El Shafey AAM, El-Ezabi MM, Selim MME, Ouda HHM, İbrahim DS 2013. Effect of *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves extract on certain physiological parameters of diabetic rats. *Journal of King Saud University Science*, 25: 135–141.
- Ersöz B 2002. Enzimler, Bölüm 5. İnsan Biyokimyası (Onat T, Emerk K, Sözmen EY), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Teissedre PL 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43: 890–894.
- Gao H, Huan YN, Gao B, Xu PY, Inagaki C, Kawabata J 2008. α-Glucosidase inhibitory effect by the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food Chemistry*, 106: 1195–1201.
- International Diabetes Federation (IDF), 2015. <http://www.idf.org/about-diabetes>. Erişim tarihi: 21.02.2016.
- İkizler M, Dernek S, Erkasap N, Kaygısız Z, Sevin B, Kural T 1996. The hemodynamic efficacy of resveratrol on reperfusion injury in isolated rat hearts. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahi Dergisi*, 11: 91-95.
- Kumar R, Arora V, Ram V, Bhandari A, Vyas P 2015. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of Allopolyherbal formulations in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3(1): 45-50.
- Losso JN, Shahidi F, Bagchi D (2007) *Anti-angiogenic functional and medicinal foods*. CRC Press Boca Raton, London, New York, 736.
- Maffei Facino R, Carini M, Adlini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, Morazzoni P 1996. Procyanidines from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. *Planta Medicine*, 62: 495–502.
- Meliani N, Amine Dib ME, Allali H, Tabti B 2011. Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 468-47.
- Meyer AS, Jepsen SM, Sorensen NS 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2439-2446.
- Meyer AS, Yi OS, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN, 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1638-1643.
- Mishra A, Jaily AK, Srivastava AK 2009. Antihyperglycemic activity of six edible plants in validated animal models of diabetes mellitus. *Indian Journal of Science and Technology*, 2 (4): 80–6.
- Mohammed A, Koorbanally NA, Islam MS 2016. Anti-diabetic effect of *Xylopiya aethiopyca* (Dunal) A. Rich.(Annonaceae) fruit acetone fraction in a type 2 diabetes model of rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 180: 131-139.
- Murt CN, Verney E, Sidransky H 1980. Acute effect of ethanol on membranes of the endoplasmic reticulum and protein synthesis in rat liver. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 4: 93.
- Özkol H, Tuluçe Y, Dilsiz N, Koyuncu I 2013. Therapeutic Potential of Some Plant Extracts Used in Turkish Traditional Medicine on Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats. *The Journal of Membrane Biology*, 246: 47–55.
- Prasad SK, Kulshreshtha A, Qureshi TN 2009. Antidiabetic activity of some herbal plants in streptozotocin induced diabetic albino rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (5): 551–557.
- Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N 1998. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1460–1464.

- Şentürk M 2006. Glutasyon redüktaz enziminin insan eritrositlerinden Saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Shimizu Y, Ichihara K 2015. Sources of variation analysis and derivation of reference intervals for ALP, LDH, and amylase isozymes using sera from the Asian multicenter study on reference values. *Clinica Chimica Acta*, 446: 64-72.
- Suparto IH, Arfianti N, Septiawati T, Triwahyuni W, Iskandari D 2008. Ethanol extract of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) fruit with in-vitro antidiabetic activities. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*, 285-288.
- Toeller M 1994. Alpha-Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. *European Journal of Clinical Investigation*, 24: 31-35.
- Turan A, Celik I 2016 Antioxidant and hepatoprotective properties of dried fig against oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 91: 554–559.
- Zafar M, Naqvi SN, Ahmed M, Kaimkhani ZA 2009. Altered Liver Morphology and Enzymes in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *International Journal of Morphology*, 27: 719-725.

DRAFT

## Experimental optimization of emulsion liquid membrane for selective cadmium separation and concentration from acidic zinc plant leach

Isa Dongel<sup>1\*</sup>, Volkan Eyupoglu<sup>1</sup>, Recep Ali Kumbasar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cankiri Karatekin University, Science Faculty, Chemistry Department, Cankiri, Turkey.

<sup>2</sup>University, Science Faculty, Chemistry Department, Cankiri, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: isadongel@gmail.com

### Abstract

Worldwide use of cadmium and releasing of cadmium wastes has increased for a few decades. Due to its increasing application field, especially in solar panel and battery production and the other technological requirements. In that context, our study is to optimize the emulsion liquid membrane (ELM) and donor and acceptor phase conditions to selectively separate and concentrate the cadmium ion from zinc plant leach solution using Alamine 336 as an ion carrier. In the excellent separation and concentration conditions, extraction efficiency was found in the range of 89-98 % within 10 min contact time by using different feed solutions containing various metal ions. Also, separation factors of cadmium over the other metal impurities were identified in order as  $\beta_{Cd/Ni} > \beta_{Cd/Co} > \beta_{Cd/Zn}$  for studied experimental conditions.

**Keywords:** Separation and concentration of cadmium, wastewater treatment; leach solution, oil-in-water, emulsion liquid membrane.

### INTRODUCTION

Cadmium is known more toxic and poisoning heavy metal, which can be taken with inhalation and ingestion ways to human metabolism (Kafritsas, Alexiades et al. 1989, Mahamadi and Chapeyama 2013). Although it is known so toxic, their compounds are used in industries such as pigments, electroplating, battery production, chemical synthesis, ceramics, photographic products, etc. for different purposes (Fang, Tang et al. 2004, Kumbasar 2009). Cadmium is produced primarily as a byproduct of mining, refining, and smelting of sulfide-based zinc ore concentrate. Spent Ni-Cd batteries and the other cadmium-containing industrial products are used as a secondary source of the cadmium. Hydrometallurgical methods are employed to recover cadmium from leach solutions obtained from secondary sources of the cadmium. Primarily, Ni-Cd batteries are used as secondary sources of cadmium that Ni-Cd batteries leach solutions contain an enormous amount of Cd and Ni as significant metals (Cote and Bauer 1980, Bulgariu and Bulgariu 2013, Choi, Nguyen et al. 2014).

Liquid membranes (LMs) are accepted as a promising process towards LLE processes in many aspects (Jafari, Yaftian et al. 2009). Four different types of LMs are known up today; bulk (BLM) (Muthuraman and Ibrahim 2013), supported (SLM) (Rodriguez de San Miguel, Vital et al. 2014), polymer inclusion membranes (PIMs) (Guo, Zhang et al. 2012) and emulsion (ELM) (Chanukya and Rastogi 2013) liquid membranes. SLMs and ELMs have some practical advantages in the aspect of industrial applications, whereas, BLMs are not. ELM technique among MBP has become an alternative separation technique against the traditional LLE technique. The lower investment requiring for installing and operating the process, and low consumption of toxic and volatile organic solvent make it environmental friendly process among the others (Gameiro, Bento et al. 2007, Hachemaoui, Belhamel et al. 2010, Chaouchi and Hamdaoui 2014). Mainly, the ELM method has a remarkable ability to selectively separate metal ions from aqueous solutions using water-oil-water (WOW) type emulsion stabilized by using suitable surfactants. Many scientists have studied to find a novel, practical and efficient methods make ELMs useful and sustainable (Choudhury, Sengupta et al. 2010, Brahmia, Bouasla et al. 2014). The mechanisms of metal transport through ELM would be regulated by the diffusion phenomenon of mass transfer with chemical reaction kinetics. In this context, Hsu and Li (Hsu and Li 1985) and Ho and Li (Ho and Li 1981) have performed pioneer studies to explain the transport mechanism of ELM techniques. The ELM method would have the ability to selectively or entirely remove and concentrate on the substances into another aqueous phase (stripping phase or internal phase) that depends on the extractive agents.

In present work, the executive parameters that are useful for the extraction and the stripping of cadmium from zinc plant leach solution have been studied to enhance cadmium transport by ELM using tertiary amine (Alamine 336) as a carrier. The optimized process is easily adapted to zinc plant leach solutions to determine the selectivity of the ELM process. At the end of these studies, we verified that the process has excellent applicability to the industrial effluents.

## MATERIALS AND METHODS

The main constituents of the ELM are surfactant, extractant and organic diluent. In this study, the non-ionic surfactant used for stabilizing ELM is sorbitan monooleate which was purchased from (Fluka, Germany) and commercially known as Span 80. The mobile carrier Alamine 336 was obtained from (CYTEC Co. USA) as free of charge. The kerosene, which is available in the marketplace (density 830 kg/m<sup>3</sup> and viscosity 1.6 mPa.s at 20°C), was used as a diluent and was obtained from (TUPRAS Oil Co. TURKEY). Sodium carbonate, potassium iodide, sulphuric acid, ammonia solution, and ammonium carbonate were of analytical grade and purchased from (Merck, Darmstadt, Germany) that all of them was directly used as received from the producer or suppliers.

Feed solution preparation was carried out depending on our previous studies (Kumbasar 2008, Kumbasar 2013). The zinc plant purification cake was obtained from CINKUR Co., Turkey. Its average metal compositions were determined on mass basis as 20 % Zn, 10 % Cu, 1.0% Pb, 3.0% Cd, 0.1% Fe, 1% Al, 3.1 % Ni and 2.2 % Co. The leaching process of the solid waste of zinc plant purification cake was milled to the powder and dissolved in 2.0 M sulphuric acid solution (solid /liquid ratio of 1/4 at 85 °C for 4 hours). The composition of the final acidic leach solution was determined by the trace analysis of Zn, Cu, Cd, Fe, Al, Ni, and Co by flame AAS. As a further process, the controlled precipitation of Fe, Al, Cu, Zn, Pb by the addition of NaOH and another precipitation reagents except for Cd, Co, Ni, and Zn. Despite the fact that the concentrations of Cd, Co, Zn and Ni in the feed solution were scarcely changed due to some undesirable precipitations. The final concentrations of Cd, Co, Ni and Zn in acidic leach solution were identified as 1900, 1000, 1600 and 780 mg L<sup>-1</sup> respectively. Then, potassium iodide was added to acidic leach solution to convert metal ions its iodide complexes such as CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>, ZnI<sub>4</sub><sup>2-</sup> etc. So, the acidic feed solutions prepared by approximately six times dilution to obtain 300 mg L<sup>-1</sup> cadmium-containing acidic leach solution to utilize it as a feed solution in ELM experiments for interference studies.

30 mL of Alamine 336 and Span 80 in kerosene are vigorously mixed at a mixing speed of 1800 rpm by a variable speed mixer in 250 mL glass beaker. 18 mL of 6 mol/L ammonia solution was added dropwise to form WOW emulsion, while membrane solution was mixing up to the desired phase ratio. The emulsified mixture was stirred continuously for 20 minutes at constant mixing speed to obtain a stable ELM, and it was used in the transport experiments.

The ELM explained its preparation method in the previous step, was slowly poured into 250 ml of the cadmium-containing feed solution in 600 mL glass beaker. Both ELM and feed phases were stirred by a variable speed mixer equipped with a Teflon coated turbine-type impeller at the speed of 250 rpm for 10 minutes. To identify the executive parameters related to both ELM and aqueous phases over permeation and the separation of cadmium were investigated. The settings were individually studied while the other parameters were kept constant. A differential examination method on the process has been performed to identify optimum transport conditions. At the end of each run, the ELM phase was collected and separated from the feed phase and subsequently decomposed to its constituents on niobium electrodes by applying high voltage splitter. The metal ions uptake in ELM was monitored by quantitative trace analysis of the samples, which are taken from feed solution at certain time intervals. Flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) (Shimadzu AA-6701F model, Tokyo, Japan) was used for elemental trace analysis.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### Effect of acid concentration in the feed solution

To determine the effect of acid concentration of feed solution on the extraction of anionic CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> complexes, a set of the study were conducted with various acid concentrations in the range of 0.05–1.0 in sulfuric acid media. Fig.1a shows that the effect of sulfuric acid concentration on CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> extraction. The transport of CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> ions through ELM directly depends on the H<sup>+</sup> concentration in the feed solution. The transport experiments were accomplished in all concentrations of H<sup>+</sup> ions in the range of 0.05-1.0 mol/L in the feed solution. The tests showed that the carriage of the CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> ions increase with increasing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration up to 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The highest extraction efficiency of cadmium was 95.5% in 0.1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Further strengthening of H<sup>+</sup> concentration than 0.1 mol/L adversely affected the extraction efficiency of cadmium. The transport efficiency decreases above or below this limit concentration value (0.1 mol/L) for the CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> transport. Similar previous results have been reported by many scientists on cadmium transport from acidic solutions in presence or absence of complexing reagent (Li, Liu et al. 1997, He and Ma 2000, Aly, Ghonaim et al. 2012, Malik, Hashim et al. 2012)

### Effect of KI concentration in the acidic leach solution

According to (Kumbasar 2009), an anion exchanger reagent such as Alamine 336 can be useful for the transport of cadmium as cadmium-iodide complexes like as  $\text{CdI}_4^{2-}$ ,  $\text{CdI}_3^-$  from the outer aqueous phase into the internal aqueous phase. This mechanism implies that transfer efficiency is to depend on KI concentration in acidic aqueous feed phase. To confirm this assumption, KI concentration versus constant concentration of cadmium in the aqueous phases was studied in the range of 0.1- 1.0 mol/L and the results were given in Fig. 1b. According to the figure, when KI concentrations higher than 0.5 mol/L, cadmium transport declined. A similar lead to cadmium permeation was also reported in a previous study (Jafari, Yaftian et al. 2009). The excess mole of the iodide more than the stoichiometric rate of 1:4 or 1:3; ( $\text{Cd}^{2+}:\text{I}^-$ ) remains without complexing with cadmium, and it acts as new anionic species in the aqueous phase. The situation reduces cadmium iodide transport. Also, it can be attributed to the competitive extraction of I<sup>-</sup> with anionic  $\text{CdI}_4^{2-}$  complexes at the ELM-feed phase interface. So, 0.5 mol L<sup>-1</sup> potassium iodide was selected as a suitable concentration for the optimum conditions with the highest cadmium extraction rate.

### Effect of stripping reagent type and concentration

Stripping reagent and extractant are strictly dependent on each other. Their chemical nature should neutralize the affinity of the adduct formation between solute and extractant molecule. For this reason, mentioned previous, firstly stripping reagent type like  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  was utilized in the formation of ELM since we were used ammonia-derivative basic extractant (Alamine 336). The effect of the chemical reagent type was tested at the same concentration of the stripping reagents, (6.0 mol L<sup>-1</sup>), to assess their impacts on cadmium transport through ELM. According to the results that  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  are not suitable for stripping reagent due to their instability in ELM formation step and lower extraction efficiencies than  $\text{NH}_3$ . It was found that  $\text{NH}_3$  solution is more appropriate stripping reagent, which gives higher extraction efficiency and more stable emulsion. Therefore, the  $\text{NH}_3$  solution was accepted as the best suitable stripping reagent, and then subsequent studies were performed with  $\text{NH}_3$ . In this study, the effect of  $\text{NH}_3$  concentration on the efficiency of  $\text{CdI}_4^{2-}$  transport in the stripping solution was also investigated, and the results were shown in Fig. 1c. As seen from the illustration, it was found that maximum cadmium extraction was obtained best with 6 mol L<sup>-1</sup>  $\text{NH}_3$ . However, above this concentration, extraction rate decreased, and ELM decomposition was observed with the naked eye. The highest cadmium extraction efficiency during the transport process was obtained with 6 mol L<sup>-1</sup> of  $\text{NH}_3$ , and it was accepted as optimal stripping reagent concentration.

### Effect of surfactant concentration

The surfactant is a chemical substance to reduce surface tension and to form emulsion or foam for many industrial and scientific purposes. Span 80 (sorbitan monooleate) has extensive usage for different purposes in various industrial applications as an emulsifier. So, its concentration directly affects emulsion stability and durability in the process. In our study, we experimentally investigated the effect of Span80 concentration in ELM phase, while the other parameter variables in ELM were kept constant. Fig. 1d shows the effect of surfactant concentration in the ELM on the extraction of  $\text{CdI}_4^{2-}$ . As seen from the figure, the concentration of Span 80 in the membrane phase was varied between 4% and 8% (v/v) to investigate the effect of **surfactant concentration**. The optimum concentration of Span 80 was determined as 6% (v/v) in the light of experimental studies. When Span 80 content in ELM was below 6% (v/v), **a significant deterioration of the emulsion membrane** was seen in the total duration of extraction time (10 min). Except for Span 80 concentrations below 6% (v/v), increased **surfactant concentration** up to 8% (v/v) resulted in a slight decrease in the transport rate of cadmium through ELM.

### Effect of extractant concentration

An experimental investigation to determine the effect of extractant concentration on the cadmium extraction by amine derivative extractant (Alamine 336) was established in the extractant concentration range of 2 %-6% (v/v). The results are shown in Fig. 1e. It is also seen that cadmium extraction from acidic iodide solutions is preferable even if its concentration is too low in ELM. The cadmium transport through ELM was increased with increase in extractant content in ELM phase up to 4% (v/v). As seen from the figure, instability of ELM depending on extractant concentration can be seen at the higher concentration percent than 4% (v/v). In various solvent extraction based studies, the extractant **concentration** leads to increase in the extraction rate of solute (Sulaiman, Othman et al. 2014, Zhao, Li et al. 2014, Eyupoglu and Kumbasar 2015). However, decomposition of ELM phase and a decrease of the extraction rate is an observable phenomenon versus increasing extractant rate. This observation can be attributed to the increasing ELM phase viscosity and another barrier formation by extractant molecules in the feed-ELM interface. Furthermore, the presence of an oxidizer in the feed phase



causes the degradation of weak intermolecular bonds between surfactant and extractant (Chanukya and Rastogi 2013, Kandwal and Mohapatra 2013, Kumbasar 2013). This phenomenon results in a decrease of ELM stability and target metal ion transport. As a result, it can be observed that the highest cadmium transport through ELM was obtained by **4 % (v/v) of extractant concentration**. Therefore, efficient and convenient extractant **concentration** was identified as **of 4 % (v/v)** taking into consideration ELM stability.

#### **The effect of initial cadmium concentration from the leach solution**

The optimum conditions were determined and given in Table 1. The effect of initial cadmium ion concentration on the transport of cadmium from iodine acidic leach solution containing Cd, Co, Ni, and Zn ions. The results were shown in Fig. 10. As seen from the figure, cadmium concentration in the acidic leach solution was varied from 150 to 650 mg/L. The concentration of cadmium in the feed solution was reduced from 150 to 6.7 mg/L, from 300 to 40 mg/L, and from 650 to 160 mg/L, with the extraction efficiency of 95.5, 86.6 and 75.3 %, respectively within 10 minutes. On the other hand, the cadmium was concentrated in the stripping solutions from 0 to 1980, 3595, and 6780 mg/L respectively at the end of 10 minutes. In light of the obtained results, we can claim that experimentally optimized ELM can have a unique potential when the solute concentrations are relatively low, and other techniques cannot be efficiently applied. On the other hand, the extraction efficiency increases with the decreasing cadmium concentration in the feed solution. It means that the advanced process is more suitable for dilute solutions of cadmium from acidic iodine solution.

#### **Extraction of cadmium and other ions at optimum conditions and membrane selectivity**

The acidic leach solution containing cadmium and other ions was also tested as a feed phase that it was summarised in the feed solution preparation section according to the optimum conditions. However, the yellowish-brown complex in the feed solution was also observed due to the presence of  $CdI_4^{2-}$  predominantly. If I is oxidized to  $I_2$  by air oxygen, this situation can adversely affect the transport efficiency. So, the prepared feed solution was immediately used in the transport experiments after it is prepared. In the effect of optimum conditions, the initial concentration of metal ions in the acidic leach solutions was measured as 300 mg/L Cd, 253 mg/L Ni, 158 g/L Co, and 123 mg/L Zn and obtained extraction results were shown in Fig. 11. From Fig. 11, it was observed that cadmium concentration in the feed solution at the end of the period of 10 minutes was reduced from 300 to 6 mg/L with the extraction efficiency of 98 % and the emulsion was also stable during the experimental period. The variations for Cd, Co, Ni, and Zn concentration versus time were given in Table 1. In light of the table, 300 mg/L cadmium concentration in the feed solution continuously decreased versus time. On the contrary to that, the concentrations of cobalt, nickel, and zinc ions in the first four minutes remain relatively stable and almost not extracted. After the fourth minute, zinc was removed from the stripping solution at higher ratios, as compared to nickel and cobalt ions at the end of 10 minutes. The transport rate of Cd, Ni, Co, and Zn was found as 98, 1.5, 2.5, and 10.8 %, respectively. The metal ion concentrations in the stripping solution against time in the sixth and tenth minutes are given in Table 2. As seen from the results, zinc extraction by optimized ELM process from the acidic feed solution observed after the fourth minute. Therefore, we can say that the extraction process is preferable for cadmium zinc separation with up to the fourth minute. Consequently, cadmium is selectively separated and concentrated by optimized ELM process from the acidic feed solution into the stripping solution.

Under the optimum conditions, the transport rate of cadmium over other ions are given in Fig. 1f and Table 1. It is indicated that there is a significantly higher cadmium extraction is achieved than other ions under these conditions within 10 minutes. The separation factor was calculated using equation (6).

$$\beta_{Cd/M} = \frac{(C_{Cd}/C_M)_{strip}}{(C_{Cd}/C_M)_{feed,0}}$$

(6)

Where  $C_{Cd}$  and  $C_M$  are the concentrations of cadmium and any metal ion in stripping and initial feed phases. The concentrations of cadmium and other ions in the strip solution, extraction and separation factors are indicated in Table 2. The system is significantly selective for cadmium, especially in the first four minutes. Further separation of cadmium on other ions could be achieved by increasing the number of extraction stages.

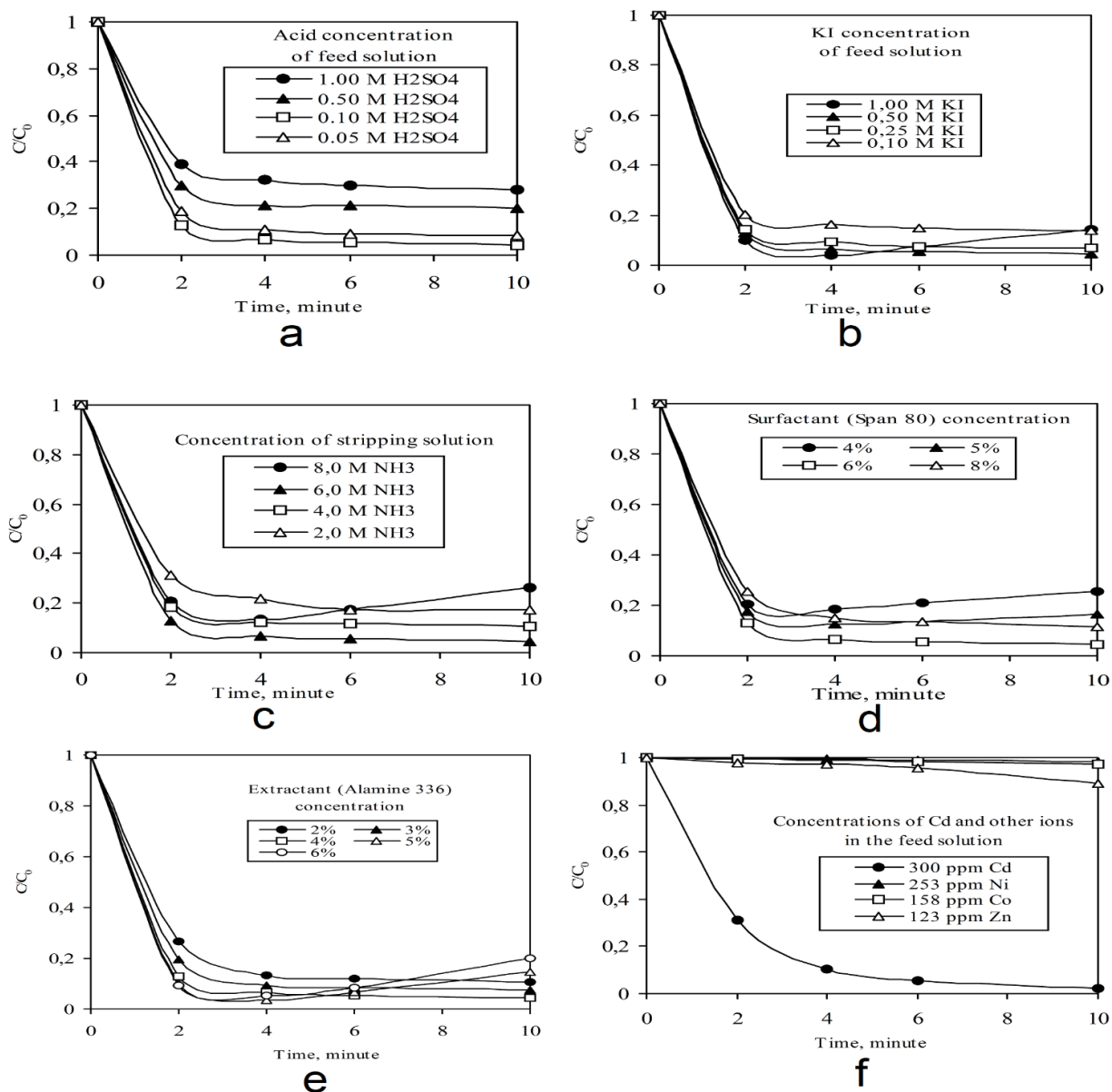


Fig. 1. The effects of extraction parameters on cadmium extraction.

Table 1. Separation factors of cadmium over other ions in the optimum conditions in optimum conditions

Metal ion concentration of feed solution	Separation factors, $\beta_{ij}$				Extraction %		mg/L in strip solution	
	2 min	4 min	6 min	10 min	6 min	10 min	6 min	10 min
300 mg/L Cd	-	-	-	-	94.4	98	3910	4063
253 mg/L Ni	138	112	78	65	1.0	1.5	33	51
158 mg/L Co	138	90	63	39	1.5	2.5	31	53
123 mg/L Zn	35	32	23	9	4.2	10.8	70	182

## CONCLUSIONS

The selective separation of cadmium has been investigated and optimized by ELM process using Alamine 336 as a mobile carrier from the leached zinc plant purification cake in sulfuric acid containing KI as a complexing agent. According to the obtained results, some meaningful conclusions can be mentioned in this section. In this context, the optimum transport conditions were experimentally identified regarding ELM properties and aqueous phase properties as well. All of the optimum conditions were tabulated in Table 1. At these conditions, 98 % of Cadmium was selectively extracted within 10 min from sulfuric acid leach solutions using Alamine 336 as a carrier. It was found that cadmium transport from feed solution to stripping solution was affected by

many parameters like as surfactant concentration, mixing speed, extractant concentration, the acid concentration of the feed solution, type and concentration of stripping solution. The most effective parameter on cadmium transport was determined as extractant concentration and surfactant concentration because they directly affect the emulsion stability and transport kinetic. According to the results, these parameters increased the cadmium extraction efficiencies up to an optimum value. The higher and the lower values than this exact value, extraction efficiencies were decreased, and ELM stability was broken down. The liquid membrane selectivities of cadmium over the other metal ions that they existed in the leach solutions, were reasonably identified as high. The cadmium concentration could be concentrated in the inner phase called as stripping phase about fourteen times in one stage. Using more than one stages of this transport process, the selectivity and concentration of cadmium could be improved excessively. The experimental results reported in this paper that it shows the ability of ELM technique to be used for the transport of cadmium selectively. The improved process has application capabilities to extract cadmium from valuable and toxic metal impurities selectively. This process can be applied either for recovery or removal of cadmium from precious metal-containing industrial or hydrometallurgical aqueous solutions. Also, the reduced amount of solvent requirement for metal extraction and its enrichment capacity, account for the promising performance of this technology in practical applications.

#### ACKNOWLEDGMENT

The author wishes to express his sincere gratitude to Sakarya University that all experimental studies were conducted by using their laboratories and instrumental facilities. Also, many thanks to Cytec Co.USA and TUPRAS Oil Co. TURKEY for their chemical and diluents supporting as free of charge.

#### REFERENCES

- Aly, H. F., A. K. Ghonaim, S. Abdel-Wanes and A. T. Kasem (2012). "Modeling of Pertraction of Cadmium(II) by ELM of Co(III)dicarbonyl in Xylene Using Nitrilotriacetic Acid as Stripping Agent." *Journal of Dispersion Science and Technology* **33**(7): 1077-1082.
- Brahmia, N., C. Bouasla, F. Ismail and M. E. Samar (2014). "Recovery of 4-chlorophenol from an aqueous solution by ELM: stability of the membrane, modeling, and optimization of the extraction using experimental designs." *Desalination and Water Treatment* **52**(1-3): 375-383.
- Bulgariu, L. and D. Bulgariu (2013). "Selective extraction of Hg(II), Cd(II) and Zn(II) ions from aqueous media by a green chemistry procedure using aqueous two-phase systems." *Separation and Purification Technology* **118**: 209-216.
- Chanukya, B. S. and N. K. Rastogi (2013). "Extraction of alcohol from wine and color extracts using liquid emulsion membrane." *Separation and Purification Technology* **105**: 41-47.
- Chaouchi, S. and O. Hamdaoui (2014). "Extraction of Priority Pollutant 4-Nitrophenol from Water by Emulsion Liquid Membrane: Emulsion Stability, Effect of Operational Conditions and Membrane Reuse." *Journal of Dispersion Science and Technology* **35**(9): 1278-1288.
- Choi, S. Y., V. T. Nguyen, J. C. Lee, H. Kang and B. D. Pandey (2014). "Liquid-liquid extraction of Cd(II) from pure and Ni/Cd acidic chloride media using Cyanex 921: A selective treatment of hazardous leachate of spent Ni-Cd batteries." *Journal of Hazardous Materials* **278**: 258-266.
- Choudhury, A., S. Sengupta, C. Bhattacharjee and S. Datta (2010). "Extraction of Hexavalent Chromium from Aqueous Stream by Emulsion Liquid Membrane (ELM)." *Separation Science and Technology* **45**(2): 178-185.
- Cote, G. and D. Bauer (1980). "Liquid-Liquid-Extraction of Germanium with Oxine Derivatives." *Hydrometallurgy* **5**(2-3): 149-160.
- Eyupoglu, V. and R. A. Kumbasar (2015). "Extraction of Ni(II) from spent Cr-Ni electroplating bath solutions using LIX 63 and 2BDA as carriers by emulsion liquid membrane technique." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **21**: 303-310.
- Fang, J. Z., B. Tang, M. Y. Li and Z. H. Xu (2004). "Recovery of cadmium from a zinc hydrometallurgical leachate using reactive emulsion liquid membrane technology." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **79**(4): 313-320.
- Gameiro, M., P. Bento, M. Ismael, M. Reis and J. Carvalho (2007). "Extraction of copper from ammoniacal medium by emulsion liquid membranes using LIX 54." *Journal of Membrane Science* **293**(1-2): 151-160.
- Guo, L., J. Zhang, D. Zhang, Y. Liu, Y. Deng and J. Chen (2012). "Preparation of Poly(vinylidene fluoride-co-tetrafluoroethylene)-Based Polymer Inclusion Membrane Using Bifunctional Ionic Liquid Extractant for Cr(VI) Transport." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **51**(6): 2714-2722.

- Hachemaoui, A., K. Belhamel and H.-J. Bart (2010). "Emulsion liquid membrane extraction of Ni(II) and Co(II) from acidic chloride solutions using bis-(2-ethylhexyl) phosphoric acid as extractant." *Journal of Coordination Chemistry* **63**(13): 2337-2348.
- He, D. S. and M. Ma (2000). "Effect of paraffin and surfactant on coupled transport of cadmium(II) ions through liquid membranes." *Hydrometallurgy* **56**(2): 157-170.
- Ho, W. S. and N. N. Li (1981). "Modeling of Liquid Membrane Extraction." *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **182**(Aug): 95-Inde.
- Hsu, E. C. and N. N. Li (1985). "Membrane Recovery in Liquid Membrane Separation Processes." *Separation Science and Technology* **20**(2-3): 115-130.
- Jafari, S., M. R. Yaftian and M. Parinejad (2009). "Facilitated transport of cadmium as anionic iodo-complexes through bulk liquid membrane containing hexadecyltrimethylammonium bromide." *Separation and Purification Technology* **70**(1): 118-122.
- Kafritsas, I. A., C. A. Alexiades and J. A. Stratis (1989). "Solvent-Extraction and Atomic-Absorption Spectrometric Determination of Cadmium in Environmental-Samples." *Toxicological and Environmental Chemistry* **20-1**: 169-173.
- Kandwal, P. and P. K. Mohapatra (2013). "A Novel Liquid Emulsion Membrane Containing TODGA as the Carrier Extractant for Am Recovery from Acidic Wastes." *Separation Science and Technology* **48**(8): 1167-1176.
- Kumbasar, R. A. (2008). "Transport of cadmium ions from zinc plant leach solutions through emulsion liquid membrane-containing Aliquat 336 as a carrier." *Separation and Purification Technology* **63**(3): 592-599.
- Kumbasar, R. A. (2009). "Extraction and concentration study of cadmium from zinc plant leach solutions by emulsion liquid membrane using trioctylamine as extractant." *Hydrometallurgy* **95**(3-4): 290-296.
- Kumbasar, R. A. (2013). "Selective Extraction of Cadmium from Multicomponent Acidic Leach Solutions by Emulsion Liquid Membrane using Amberlite LA-2 as Extractant." *Separation Science and Technology* **48**(12): 1840-1849.
- Li, Q. M., Q. Liu, K. Li and S. Y. Tong (1997). "Separation study of cadmium through an emulsion liquid membrane." *Talanta* **44**(4): 657-662.
- Mahamadi, C. and R. Chapeyama (2013). "Determination of cadmium, lead, nickel, and zinc in *Micropterus salmoides* and *Oreochromis niloticus* by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction." *Toxicological and Environmental Chemistry* **95**(1): 163-171.
- Malik, M. A., M. A. Hashim and F. Nabi (2012). "Extraction of Metal Ions by ELM Separation Technology." *Journal of Dispersion Science and Technology* **33**(1-3): 346-356.
- Muthuraman, G. and M. Ibrahim (2013). "Use of bulk liquid membrane for the removal of Cibacron Red FN-R from aqueous solution using TBAB as a carrier." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **19**(2): 444-449.
- Rodriguez de San Miguel, E., X. Vital and J. de Gyves (2014). "Cr(VI) transport via a supported ionic liquid membrane containing CYPHOS IL101 as carrier: system analysis and optimization through experimental design strategies." *J Hazard Mater* **273**: 253-262.
- Sulaiman, R. N. R., N. Othman and N. A. S. Amin (2014). "Emulsion liquid membrane stability in the extraction of ionized nanosilver from wash water." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20**(5): 3243-3250.
- Zhao, R., X. C. Li, X. D. Zhang, J. P. Xu, G. H. He, C. X. Dong and X. B. Jiang (2014). "Formation Mechanism of Zinc Oxalate Particles in the Internal Aqueous Droplets of Emulsion Liquid Membrane." *Journal of Dispersion Science and Technology* **35**(10): 1369-1377.

## Isolation of lactic acid bacteria from tarhana

Burak Çalış<sup>1</sup>, Muhammet Fatih Polat<sup>1</sup>, Aysun Cebeci\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AGU Department of Molecular Biology and Genetics, Kayseri, Turkey

<sup>\*2</sup> AGU Department of Materials Science and Nanotechnology Engineering, Kayseri, Turkey

\*Corresponding author e-mail: aysun.cebeciaydin@agu.edu.tr

### Abstract

Tarhana is a staple food in Turkey and produced mainly by the fermentation of wheat flour and yogurt. There are variations in its use, it can be consumed as a snack, or as a soup, and its exact ingredients vary between different geographical regions. This study aims to isolate and identify lactic acid bacteria in representative examples via biochemical and molecular biology identification techniques. Three tarhana samples were studied for their Gram reaction, catalase activity, gas production, growth at 10°C and 45°C, in 6% and 16% NaCl concentrations and at pH 4.4 and pH 9.6 for the biochemical tests. For the molecular biology experiments, PCR-RFLP, sequencing and RAPD-PCR were performed to identify organisms at the species and strain level.

**Keywords:** Tarhana, lactic acid bacteria, PCR, identification, typing

### 1. Introduction

Fermented foods are preferred due to being inexpensive, practical and nutritious. Nutritional value of foods can be increased by fermentation since it is a natural way of synthesis of essential amino acids and vitamins (Simsek et al., 2017). In addition, fermentation helps preventing food spoilage and foods can be preserved for longer periods (Kabak & Dobson, 2011). Tarhana is a traditional Anatolian fermented food that is composed of wheat flour, yogurt, sourdough, vegetables and species (including tomato, red pepper, onion, mint, dill, and salt) in either dried or fresh form, and is fermented at room temperature for about 1-7 days (Simsek et al., 2017; Bayrakçı & Bilgiçli, 2015). Tarhana is a staple of Turkish cuisine as well as in Balkans, and in the Middle East due to its high nutrient value and long-shelf-life. Fermentation of tarhana is generally by lactic acid bacteria (LAB) in a critical process to increase the nutritional values and to achieve unique savor and aroma. (Ozdemir et al., 2007; Celik et al., 2005) The metabolites produced by LAB (lactic acid, ethyl alcohol, carbon dioxide and aromatic compounds) (Sengun et al., 2009) give Tarhana its characteristic taste and flavor and increase its storage life by increasing the acidity (Simşek et al., 2017). Studies (Sengun et al., 2009; Settani et al., 2011) showed that the bacterial population of an ordinary home-made tarhana is composed of genus *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*.

LAB are generally rod- or spherical-shaped gram-positive bacteria which are catalase negative. They have been important for humans for centuries as they contribute positively to the nutritional value of food products and biological protection of nutrients, thus are important microbial agents in human nutrition and health. LAB can be isolated from various sources including plants and animals, and used for both traditional and industrial biotechnological processes (Gezginç & Akyol, 2010).

Phenotypic identification of isolates can be performed according to colony morphology on agar, gram staining, catalase production, growth at different pH values (pH 4.4, pH 9.6), different salt concentrations (6%, 16% NaCl (g/mL)) and different temperatures (10°C, 45°C), and gas production. Phenotypic identification methods of bacteria, however, may not provide accurate results 100% of the time, as there can be instability of phenotypic properties under different environmental conditions (Rossello-Mora & Amann, 2001). Therefore, biochemical and molecular biology-based identification of LAB is commonly preferred. Of these, molecular biology-based identification generally provides more robust results. RAPD-PCR, PCR-RFLP and DNA sequencing techniques are used for genetic identification of LAB (Cebeci & Gürakan, 2008). RAPD-PCR is generally used to differentiate the isolates at the strain level, and PCR-RFLP helps for identification of isolates at the species level. In order to get reliable results, 16s rRNA gene sequencing is commonly applied (Cebeci & Gürakan, 2011). This study aimed to identify and type LAB species isolated from three different traditional Turkish Tarhana samples with respect to their biochemical and genetic features.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Bacterial Strains and Growth Conditions**

Twenty-eight bacterial strains isolated from traditional Turkish food “Tarhana” were used in this study. Two out of three traditional samples were collected from Central Anatolia Region of Turkey, city of Ankara and the third sample was collected from Black Sea Region of Turkey, city of Sinop (Table 1).

Phenotypic identification of the 28 isolates was performed according to colony morphology on agar, gram staining, catalase production, growth at different pH values (pH 4.4, pH 9.6), salt concentrations (6% NaCl, 16% NaCl), and temperatures (10°C, 45°C). Gas production detected by using Durham test tubes.

### **2.2. Bacterial Growth and Isolation of Strains**

Tarhana samples were diluted with sterile 1x PBS (Amresco, USA) solution (pH 7.4). 1 gram of each tarhana sample was added to 10 ml of MRS and M17 broths (Merck, USA) and incubated at 37°C for 20 hours for further dilutions. Samples taken from diluted ( $10^{-4}$  and  $10^{-5}$ ) bacterial suspensions were spread-plated on MRS and M17 agar plates and incubated at 37°C for 18-24 hours. Seven different isolates were taken from  $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  dilutions. The streak-plate technique was implemented for each isolated strain at least three times until pure cultures are obtained. Isolated strains on agar plates were seeded into 10 ml broths by a metal loop incubated at 37°C for 18-24 hours. Stock cultures of isolated strains were prepared in 20% glycerol and stored at -80°C. All the experiments were done under aseptic conditions.

### **2.3. Biochemical Identification of the Strains**

#### **2.3.1. Gram Staining**

Gram-colour staining of overnight-incubated liquid cultures was performed for each strain by using Gram stain set (Merck, Germany) by following the instructions.

#### **2.3.2. Catalase Test**

Thirty percent  $H_2O_2$  applied onto a loopful of corresponding isolate on a microscopic slide. Absence of bubbles indicated negative catalase activity.

#### **2.3.3. Growth at 10°C and 45°C**

Growth at different temperatures was determined in MRS broth and M17 broth for 48 hours at 10°C and 45°C.

#### **2.3.4. Growth at pH 4.4 and pH 9.6**

MRS and M17, at pH 4.4, were prepared by using diluted HCl (Merck, Germany), or pH 9.6, was prepared by using 1 N NaOH solution (Merck, Germany). pH values were measured with a pH meter (ThermoScientific, USA). Fresh cultures were inoculated into the prepared tubes. Cultures were incubated for 24-48 hours.

#### **2.3.5. Growth at 6% NaCl and 16%NaCl**

6% NaCl (g/mL) and 16% NaCl (g/mL) broths were prepared and fresh cultures were inoculated and incubated for 24-48 hours.

### 2.3.6. Gas Production

Gas production was tested using Durham tubes in both MRS and M17 broth containing 2% glucose (g/L).

## 2.4. Genetic Identification of Strains

### 2.4.1. DNA Isolation

Genomic DNAs were prepared using Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen, USA). Before starting the isolation, OD<sub>600</sub> value of 1 mL bacterial culture was measured by Genesys 10S spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), for which the OD<sub>600</sub> value should be between 1 and 1.5. Briefly, 1 mL of overnight grown culture was centrifuged at 12,000 xg for 30 second in MicroCL 17R Centrifuge (ThermoScientific, USA). This step was performed twice. The pellet was suspended in 170 µL Buffer S solution containing RNase A and 20 µL lysozyme. Bacterial suspension was incubated at 37°C for 30min. The suspension was incubated on ice for 5 min after the addition of 30 µL of 0.25 M EDTA (pH 8.0). 450 µL Buffer G-A was added and incubated in a water bath at 65 °C for 10 min. The suspension was centrifuged at 12,000 xg for 2 min. 400µL of Buffer G-B and 1 mL of Buffer DV (pre-chilled to 4 °C) were added. The suspension was centrifuged at 12,000Xg for 2min. The upper phase was discarded without disturbing the interphase. 1ml of Buffer DV was added to the remaining interphase and lower phase and then centrifuged at 12,000 xg for 2min. Lower phase was transferred to a spin-filter, placed in a 2 mL microfuge tube (both provided) and centrifuged at 12,000 xg for 1min. 400 µL of Buffer BV was added to the filtrate. Miniprep column was placed in a 2 mL microfuge tube and the binding mix was transferred to the miniprep column and centrifuged at 12,000 xg for 1 min. The filtrate was discarded and miniprep column was replaced back to the 2 mL microfuge tube and 500 µL of Buffer W1 was added to the miniprep column and centrifuged at 12,000 xg for 1 min. The filtrate was discarded and 700 µL of Buffer W2 was added to the replaced miniprep column and centrifuged at 12,000 xg for 1 min. This step was performed twice and the filtrate was discarded. The miniprep column was replaced back to the 2 mL microfuge tube and centrifuged at 12,000 xg for 1 min. The column was then placed into a provided clean 1.5 mL microfuge tube. 130 µL pre-warmed 65 °C eluent was added to the center of the membrane. Centrifugation was done at 12,000 xg for 1 min. Genomic DNA samples were stored at -20 °C for further experiments.

### 2.4.2. Determination of DNA Concentration

The concentrations of isolated genomic DNA were determined by NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

### 2.4.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

The polymerase chain reactions were performed on SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Scientific, USA) machine. A master mix was prepared for each reaction. To prepare 50 µL reaction mixture, 2 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.62 µL of 10 mM dNTP mix, 5 µL of 10X ammonium buffer, 0.75 µL of 500U Taq DNA polymerase (Dr. Zeydanlı, Turkey), 1.25 µL of 10 mM of forward primer 9699 (5'- ATCCGAGCTCAGAGTTTGATCCTGGC-3'), 1.25 µL of 10 mM of reverse primer 9700 (5'- TCAGGTCGACGCTACCTTGTTACGAC-3') (Oligomer, Turkey), and 5 µL of 35 ng/µL genomic DNA were added in a 200 µL PCR tube. Amplification conditions for the PCR is given in Table 2.1.

Table 2.1. Amplification conditions for PCR

	Cycles	Temperature	Time
Initial Denaturation	1	95°C	2min
Denaturation	35	95°C	1min
Annealing		58°C	1min
Extension		72°C	1min
Final Extension	1	72°C	10min

#### 2.4.4. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

PCR-RFLP was performed on SimpliAmp Thermal Cycler machine. Four different restriction enzymes (*TaqI*, *LweI*, *XbaI*, *MboI*) were used in this study. The reaction mixtures and conditions were provided in Table 2.2.

Table 2.2. Reaction mixtures and conditions for PCR-RFLP

	<i>LweI</i>	<i>XbaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>MboI</i>
Nuclease Free Water (µL)	4	4	4	4
10x Buffer (µL)	1	1	1	1
Restriction Enzyme (µL)	0.075	0.2	0.2	0.1
PCR Product (µL)	5	5	5	5
Reaction temperature (°C)	37	37	65	37

#### 2.4.5. Sequencing of PCR Products

PCR products were purified by EasyPure® PCR purification kit. Briefly, each volume of PCR product (50 µL) were mixed with 5 volumes of binding buffer (BB). BB-PCR product mixture was transferred to the provided spin column with a collection tube and centrifuged at 10,000 xg for 1 min. The flow-through was discarded. 650 µL of wash buffer was added to the column and centrifuged at 10,000 xg for 1 min. The empty column was centrifuged at 10,000 xg for 2 min in order to remove any residual wash buffer. Finally, spin column was placed in a clean 1.5 mL microfuge tube and 40 µL of pre-warmed Eluent buffer was added. The columns were centrifuged at 10,000 xg for 1 min. Purified PCR products were sequenced by MedSanTek® (Istanbul, Turkey). Sequences were analysed using MEGA X (Kumar et al., 2018), and BLAST analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were performed to assign species.

#### 2.4.6. Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

RAPD-PCR experiments were performed on SimpliAmp Thermal Cycler machine. For one reaction, 2 µL of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µL of 10 mM primer M13 (Oligomer, Turkey), 0.625 µL of 10 mM dNTP mixture, 5 µL of 10X ammonium buffer, 0.75 µL of 500U *Taq* DNA polymerase, and 280 ng genomic DNA were mixed in 200 µL PCR tube. Amplification conditions for RAPD-PCR are given in Table 2.3.



Table 2.3. Amplification conditions for RAPD-PCR

	Cycles	Temperature	Time
Initial Denaturation	1	94 °C	2 min
Denaturation	40	94 °C	1 min
Annealing		42 °C	35 sec
Extension		72 °C	2 min
Final Extension	1	72 °C	5 min

#### 2.4.7. Visualization of Gels

A horizontal electrophoresis apparatus Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, USA) was used for electrophoresis. To visualize genomic DNA on agarose gel, 1.5% agarose gel was prepared in 50 mL of 1X TAE Buffer (Dr. Zeydanlı, Turkey). After gel mixture was melted, 4 µL EtBr was added. The prepared gel mixture was poured into the electrophoresis tank filled with 1X TAE buffer to cover the gel. Electrophoresis was performed at 50 V, 70 min for PCR and PCR-RFLP, and 80 V, 80 min for RAPD-PCR. Finally, the gel was monitored at molecular imager GelDocXR+ (Bio-Rad, USA) under UV and photographed.

#### 2.4.8. Phylogenetic Analysis

Analyses of the RAPD-PCR patterns were done with GelComparII (AppliedMaths, Belgium). UPGMA analyses were performed and grouping assignments were set arbitrarily at 80% similarity level (Cebeci and Gürakan, 2003).

### 3. Results

#### 3.1. Biochemical Tests of Tarhana Isolates

Results for the testing of the isolates according to their gram reaction, catalase activity, bacterial morphology, and growth under different temperatures and pH values are shown in Table 3.1. The isolates were grown on either MRS or M17 media, and isolates that are either rod or spherical, gram positive, and catalase-negative are presumed as lactic acid bacteria. All of the isolates were able to grow at 45 °C and at pH 9.6.

Table 3.1. Testing of Tarhana isolates according to pH, salt concentration, temperature and gas production

Isolate	Source	Gram stain	Bacterial morphology	Catalase activity	Temperature		pH		Salt concentration		Gas production
					10°C	45°C	4.4	9.6	6%	16%	
M17 H1	Sinop	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
M17 H2	Sinop	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
M17 H3	Sinop	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-

M17 H4	Sinop	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 H5	Sinop	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 H6	Sinop	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
M17 H7	Sinop	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
M17 N1	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N2	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N3	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N4	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N5	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N6	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
M17 N7	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
MRS T 1	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 2	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 3	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 4	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 5	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 6	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS T 7	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS N1	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS N2	Ankara	+	Cocci	-	-	+	-	+	+	-	-
MRS N3	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS N4	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS N5	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-

MRS N6	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-
MRS N7	Ankara	+	Cocci	-	-	+	+	+	+	-	-

### 3.2. Genetic Identification of Tarhana Isolates

Presuming that the isolates are lactic acid bacteria (LAB), we performed PCR-RFLP experiments. The fingerprinting experiments with four different restriction enzymes (TaqI, MboI, LweI and XbaI) showed no resemblance to the fingerprints of the cultures in our limited laboratory culture collection (data not shown). Thus, in order to identify the isolates, we had our samples sequenced for the 16S rRNA gene. Sequencing results were used for BLAST analysis and isolates were successfully identified (Table 3.2). It can be seen in Table 3.2 that the majority of the isolates grown on MRS media belong to either *Lactobacillus plantarum* or *Pediococcus pentosaceus* species. *L. plantarum* species are commonly known for their association with fermented foods (Cebeci & Gürakan, 2003; Mujagic et al., 2017). They also comprise several probiotic strains, among which *L. plantarum* 299v is the most recognized one. Thus, it is no surprise to isolate *L. plantarum* from Tarhana. *P. pentosaceus* is also a frequently recognized member of the fermented foods, and has been studied for their potential as probiotics (Damodharan et al., 2015; Jonganurakkun et al., 2008). Two isolates were identified as *E. dispar* and one isolate was identified as *E. faecium*. *Enterococcus* species are common inhabitants of the human and animal intestinal tracts, and are associated with several fermented foods. M17 isolates were all assigned to one species, *E. faecium*. The food associated Enterococci are thought to contribute to flavor development in cheese (Inoglu and Tuncer, 2013, Gelsonimo et al., 2002). Although most of the members of the genus are non-pathogenic, some strains of the genus are major source for the hospital acquired infections, due to being highly resistant to vancomycin.

Table 3.2. Identification of Tarhana isolates according to sequencing of the 16S rRNA gene

Isolate	Source	Species
M17-H1	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H2	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H3	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H4	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H5	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H6	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-H7	Sinop	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N1	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N2	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N3	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N4	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N5	Ankara	<i>Enterococcus mundtii</i>
M17-N6	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
M17-N7	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
MRS-T1	Ankara	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-T2	Ankara	<i>Enterococcus dispar</i>

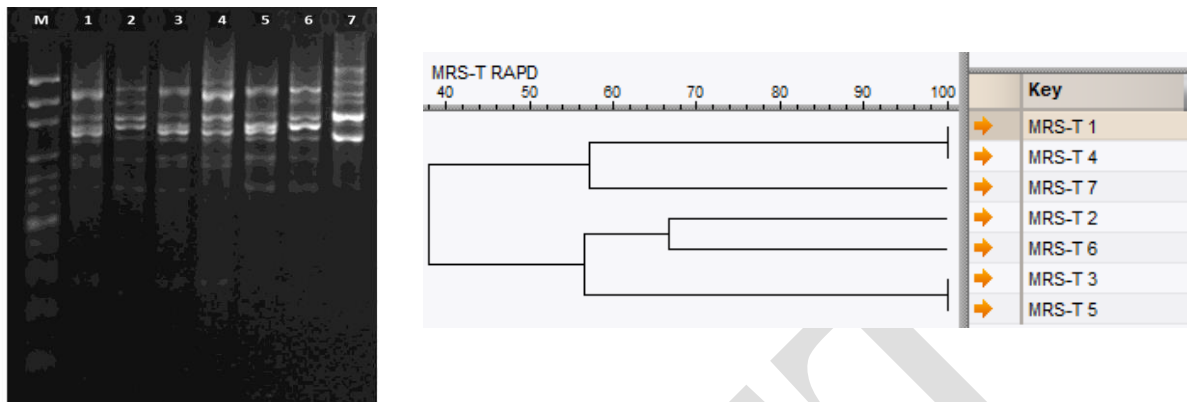
MRS-T3	Ankara	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-T4	Ankara	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-T5	Ankara	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS-T6	Ankara	<i>Enterococcus dispar</i>
MRS-T7	Ankara	<i>Enterococcus faecium</i>
MRS-N1	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N2	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N3	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N4	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N5	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N6	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
MRS-N7	Ankara	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

After identification at the species level, we performed RAPD-PCR analysis of isolates according to their sampling sources. For this purpose, we used primer M13, an established primer for discriminating between lactic acid bacteria (Cebeci and Gürakan, 2003). RAPD-PCR is an easy to perform analysis but strict conditions are necessary because reproducibility among laboratories is low and contamination issues may be encountered. For this purpose, stringent RAPD-PCR protocols were followed to make sure no such problems were encountered. Successful analyses were ensured using triplicate experiments. M17 isolates have a common band around 1200 and 3000bp, while for the MRS isolates a common band at around 2000bp is visible. Analyses of the RAPD-PCR patterns were used to construct dendrograms (Figure 3.1). According to the dendrograms, primer M13 was successful in discriminating most of the tarhana isolates. MRS-T isolates formed 5 groups at the 80% similarity level, with several common bands, and the lowest similarity level for them was around 40%. MRS-T isolates also formed the highest number of bands with primer M13. On the other hand, MRS-N isolates were not differentiated at all, and all of the isolates were pooled into the same group at 100% similarity level. M17-N isolates formed 3 groups at the 80% similarity level and the lowest similarity level for them were around 30%. M17-H isolates formed only 2 groups at the 80% similarity level, and the lowest similarity level was 50%.

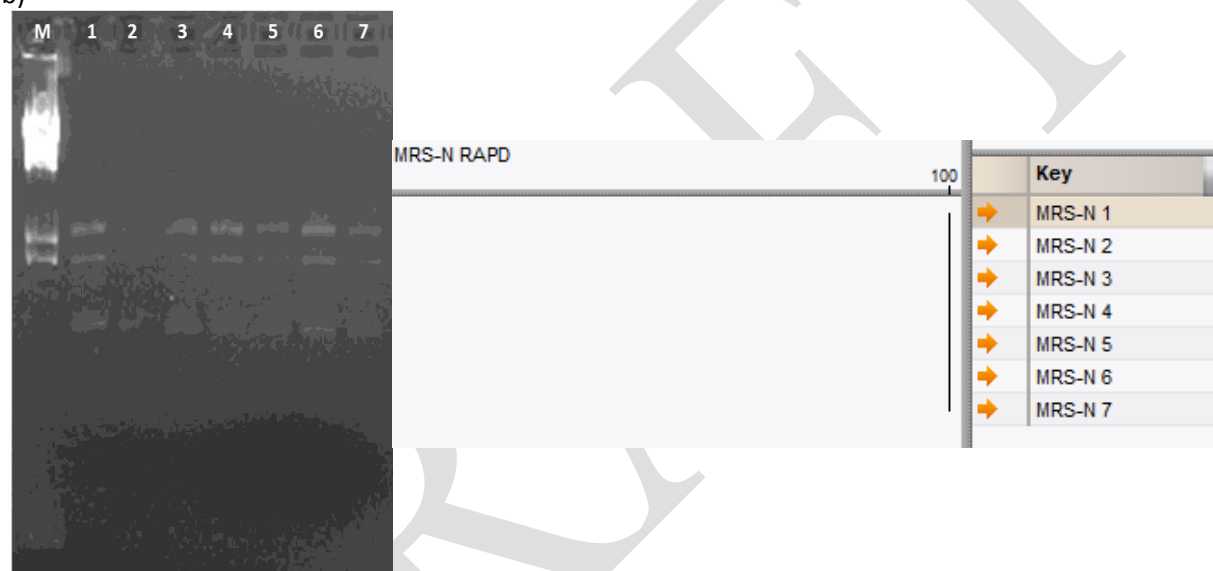
#### 4. Discussion

Twenty eight LAB isolates were successfully isolated from three different Tarhana samples. The morphological and biochemical analyses were performed, followed by growth at different pH values and temperatures. These analyses were then followed by genetic analyses. Sequencing of the 16S rRNA gene resulted in identification at the species level. Dominant species were detected to be *E. faecium*, *P. pentosaceus* and *L. plantarum*. The differentiation of the isolates at the strain level was obtained using RAPD-PCR. RAPD-PCR was able to discriminate most of the isolates into different groups, except for one group (MRS-N). The fingerprinting patterns were similar among the isolates from the same source. Therefore, preliminary identification of lactic acid bacteria followed by the sequencing of the 16S rRNA gene and RAPD-PCR were successful for the identification and typing of different tarhana samples.

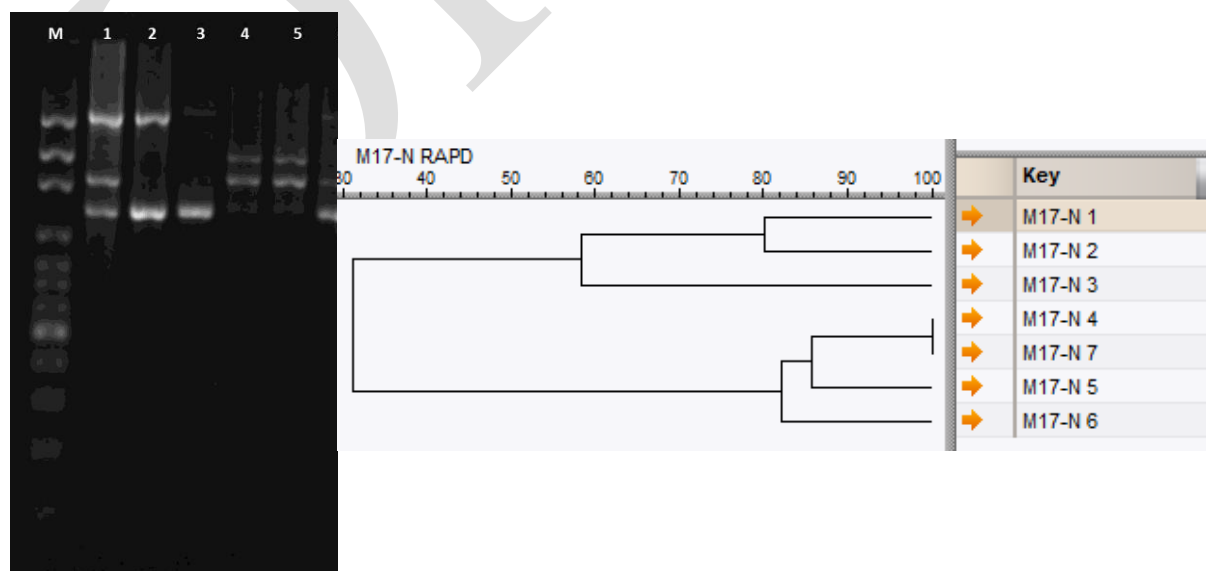
a)



b)



c)



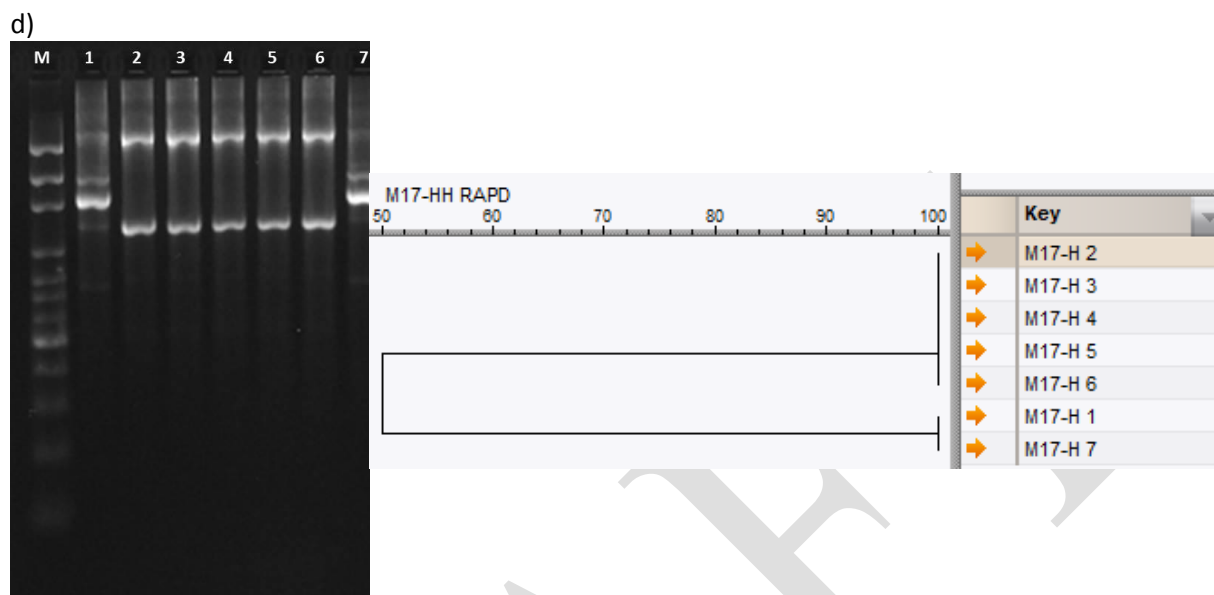


Figure 3.1. RAPD-PCR analyses of tarhana isolates and their corresponding dendrograms. a) MRS-T isolates. M: Phage Lambda / HindIII digest, 1: MRS-T1, 2: MRS-T2, 3: MRS-T3, 4: MRS-T4, 5: MRS-T5, 6: MRS-T6, 7: MRS-T7. b) MRS-N isolates. M: Axygen 100bp ladder plus, 1: MRS-N1, 2: MRS-N2, 3: MRS-N3, 4: MRS-N4, 5: MRS-N5, 6: MRS-N6, 7: MRS-N7. c) M17-N isolates. M: Axygen 100bp ladder plus, 1: M17-N1, 2: M17-N2, 3: M17-N3, 4: M17-N4, 5: M17-N5, 6: M17-N6, 7: M17-N7. d) M17-H isolates. M: Axygen 100bp ladder plus, 1: M17-H1, 2: M17-H2, 3: M17-H3, 4: M17-H4, 5: M17-H5, 6: M17-H6, 7: M17-H7.

## 5. References

- Bayrakçı, H. A., & Bilgiçli, N. (2014). Influence of resistant starches on chemical and functional properties of tarhana. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5335–5340.
- Cebeci, A., & Gürakan, G. C. (2011). Comparative typing of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains using multilocus sequence typing and RAPD-PCR. *European Food Research and Technology*, 233(3), 377–385. doi:10.1007/s00217-011-1526-5
- Cebeci, A., & Gürakan, G. C. (2008). Molecular methods for identification of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* using methionine biosynthesis and 16S rRNA genes. *Journal of Dairy Research*, 75(04), 392.
- Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20(5), 511–518.
- Celik İ, Işık F, Şimşek Ö, Gürsoy O. (2005) The effects of the addition of baker's yeast on the functional properties and quality of Tarhana, a traditional fermented food. *Czech J. Food Sci.* 23: 190–195 DOI: 10.17221/3390-CJFS
- Damodharan, K., Lee, Y. S., Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., & Suh, J.-W. (2015). Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00768
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560–3565.
- Gezginç, Y., & Akyol, İ. (2010). Geleneksel Yoğurtlardan İzole Edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* ların Tanımlanması . *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 13(2), 23–29.

- Jonganurakkun, B., Wang, Q., Xu, S. H., Tada, Y., Minamida, K., Yasokawa, D., Asano, K. (2008). *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(1), 69–73.
- Inoglu Z, Tuncer (2013) Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Journal of Food Safety* 33: 369–377.
- Kabak, B., and Dobson, A. D. W. (2011) An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), 248–260.
- Kumar S., Stecher GG., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, Issue 6, 1547–1549
- Mujagic, Z., de Vos, P., Boekschoten, M. V., Govers, C., Pieters, H.-J. H. M., de Wit, N. J. W., Troost, F. J. (2017). The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/srep40128
- Ozdemir, S., Gocmen, D., & Yildirim Kumral, A. (2007). A Traditional Turkish Fermented Cereal Food: Tarhana. *Food Reviews International*, 23(2), 107–121.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 39–67.
- Sengun, I. Y., Nielsen, D. S., Karapinar, M., & Jakobsen, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 105–111.
- Settanni, L., Tanguler, H., Moschetti, G., Reale, S., Gargano, V., & Erten, H. (2011). Evolution of fermenting microbiota in tarhana produced under controlled technological conditions. *Food Microbiology*, 28(7), 1367–1373.
- Simşek, Ö., Özel, S., & Çon, A. H. (2017). Comparison of lactic acid bacteria diversity during the fermentation of Tarhana produced at home and on a commercial scale. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 181–187.

## Farklı ambalaj materyallerinde muhafaza edilen zeytinyağlarında kalite parametrelerinin karşılaştırılması

Pervin Uzun, Aysun Şehirli, Nurdan Akbaş, Orhan Eren  
Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail:pervin.uzun@tarimorman.gov.tr

### Özet

Çalışmamızda Gemlik ve Memecik çeşitlerinden erken hasat döneminde elde edilen zeytinyağların kalite parametrelerinin zamana bağlı olarak değişimine farklı ambalaj materyallerinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla açık ve koyu renk cam, açık ve koyu renk polietilen ve metal ambalaj materyalleri kullanılmıştır. Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsünden temin edilen zeytinyağları Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bitkisel Ürünler Bölümü Yağ Laboratuvarında, 25±3°C' de muhafaza edilmiştir. 1 yıl boyunca 2 aylık periyotlarda, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, özgül soğurma analizleri yapılarak ambalaj materyalinin etkisi ve çeşitler arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Jump istatistiki analiz programında değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytinyağı, peroksit, serbest yağ asitliği, özgül soğurma

### Comparison of quality parameters in olive oil preserved in different packaging materials

### Abstract

In this study, it is aimed to investigate the effect of different packaging materials on the change of quality parameters of olive oil obtained from Gemlik and Memecik varieties during early harvest period. For this purpose, light and dark glass, light and dark polyethylene and metal packaging materials were used. Olive oils obtained from Bornova Olives Research Institute and they were kept at 25 ± 3 ° C in the Oils&Fats Laboratory of the Central Research Institute of Food and Feed. Effect and differences between varieties were examined by free fatty acids, peroxide value and ultraviolet analysis. These analysis were obtained each 2 months periods for 1 year. The results were evaluated in Jump statistical analysis program.

**Keywords:** Olive oil, peroxide value, free fatty acids, ultraviolet analysis.

### GİRİŞ

Natürel sızma zeytinyağı; doğrudan tüketime uygun, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 0,8 gramdan fazla olmayan yağlardır (TGK, 2017). Zeytinyağı muhafazasında kaliteyi etkileyen en önemli faktörler genel olarak ısı, ışık ve oksijendir. Ambalajlama sırasında da ambalaj materyalinin seçiminden başlayarak, gerek metal kontaminasyonu ve sıcaklık artışını engellemek, gerekse yağın hava ve ışıkla temasının engellenmesine daima özen göstermek gerekmektedir. Zeytinyağı ambalajlamada kullanılan malzemeler: teneke cam plastik (pvc, polietilen) özel kaplanmış karton kutulardır.

**1.Teneke Kutular:** Teneke kutularda aranacak nitelikler: Sert olmaları İçindeki ürünü iyi bir şekilde korumaları Ulaşım ve depolama dayanıklılığı İstiflenebilme özellikleri Ancak bunların kalay kaplamalarının kusurlu ve dağılımının homojen olmadığı durumlarda, bu kutulara konan ürünün kalitesinde bozulmaya, kutuların korozyona uğramasına ve paslanmasına neden olabilmektedir.

**2.Cam Şişeler:** Kimyasal olarak nötr olmaları İçlerine giren maddeyle reaksiyona girmemeleri Çekici tasarımları İçlerindeki mamulü göstermeleri Cam şişelerin olumsuz özellikleri nelerdir? Kırılgan oluşu Diğer malzemelere göre daha ağır olması Cam bir ambalaj malzemesi olarak sahip olduğu olumlu özellikler nedeni ile gıda ve içecek sektöründe çok yaygın ölçüde kullanılmaktadır. Cam şişelerin ışık geçirgenliği ile ilgili dezavantajı



renklendirilmek suretiyle giderilebilmektedir. Kahverengi (amber) ve yeşil renkli cam şişeler elde etmek mümkündür. Görülebilir ışık amber renkli şişe camından %10-40 oranında geçebildiği halde, şeffaf şişe camında bu oran %85-90 dır. Zeytin yağları cam şişelerde ambalajlı olarak uzun süre doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmamalı ve vitrinlerde bekletilmemelidir. Bu husus ürün etiketinde de belirtilmelidir.

**3. Plastik şişeler :** İçeriğin dış etkenlerden korunması Kimyasal ve bakteriyolojik bulaşmaların önlenmesi Kolay işlenebilir olması Taşıma ve kullanım kolaylıkları Bu ambalajlarla ilgili dezavantaj ise uygun plastik malzemelerin kullanılmaması halinde gıda ile plastik arasında migrasyonun söz konusu olmasıdır (Kıvrak M., 2019).

## MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda Gemlik ve Memecik çeşitlerinden erken hasat döneminde elde edilmiş naturel sızma zeytinyağında ışığın ve ambalaj materyalinin raf ömrü üzerine olan etkisini görmek amacıyla; açık renk cam, koyu renk cam, açık renk plastik, koyu renk plastik ve teneke ambalaj olmak üzere 5 farklı ambalaj materyali kullanılmıştır.

Zeytinyağları Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Zeytinyağları Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Bitkisel Ürünler Bölümü Yağ Laboratuvarında, 25±3°C’ de muhafaza edilmiştir. 1 yıl boyunca 2 aylık periyotlarda, ransimat analizi yapılarak raf ömrü üzerine ambalaj materyalinin etkisi ve çeşitler arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Ransimat analizi Metrohm 892 Professional Ransimat cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Jump istatistiki analiz programında değerlendirilmiştir.

Serbest yağ asitliği; zeytinyağı ve prina yağındaki serbest yağ asitleri miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntemi tanımlar. Serbest yağ asitlerinin miktarı, genel olarak hesaplanan serbest asitlik (oleik asit cinsinden, %) şeklinde ifade edilir.

Yağların sınıflandırılmasında ve kalite açısından değerlendirilmesinde kullanılan bir değerdir. Elde edilen yağların serbest yağ asitliği AOCS Official Method Ca 5a-40’a göre yapılmış ve sonuç % oleik asit cinsinden hesaplanmıştır (Anonymous 2006; Karakuş 2008).

Peroksit değeri; Tanımlanan analiz şartları altında potasyum iyodürü okside eden bir kilogram yağdaki aktif oksijenin milieşdeğer ağırlığıdır.

Örneklerin peroksit sayıları, AOCS Official Method Cd 8-53’e göre yapılmış (Anonymous 2006b), sonuç 1 kg yağda bulunan peroksit oksijenin milieşdeğer oksijen cinsinden hesaplanarak verilmiştir (Anonymous 2006; Karakuş 2008).

Özgül soğurma; Bu metot, zeytinyağı ve pirina yağının ultraviyole ışıkta spektrofotometrik olarak incelenmesi yöntemini tanımlamaktadır. Elde edilen sonuçlar saklama ve işleme sırasında yağda meydana gelebilecek kalite değişimlerinin göstergesidir.

Bu yöntemde belirtilen özgül dalga boylarındaki soğurma, yağlarda bulunan konjuge dien ve trien yapılarından kaynaklanmaktadır. Özgül soğurma  $E_{1cm}^{%1}$  (% 1’lik çözeltinin 1 cm ışık yolundaki soğurması) “soğurma katsayısı” olarak bilinen K ile eşdeğerdir. Uygun bir çözücüde çözünen numunenin belirtilmiş olan dalga boylarında saf çözücüye karşı soğurmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesidir. Tam olarak % 1’lik (w/v) konsantrasyondaki numunenin özgül soğurması; 10 mm’lik hücrede, izo-oktan kullanılıyorsa 232 ve 268 nm’de, sikloheksan kullanılıyorsa 232 ve 270 nm’de belirlenir.

Yağların önemli kalite parametrelerinden olan bu değerler, 60 °C’ da oksidasyona tabi tutulan yağlarda oluşabilecek konjugasyonlar UV-VIS spektrofotometrede AOCS 12 Official Method Ch 5-91’e göre yapılmıştır ve sonuçlar K (E) değerleri olarak verilmiştir (Anonymous 2006; Karakuş 2008).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

**Tablo 1.** Çeşitlere ait serbest yağ asitliği (%) değerleri

Serbest Yağ Asitliği (%)		
Çeşit	İlk Ay	1 yılın sonunda
Memecik	0.08 A	0.20 A
Gemlik	0.15 B	0.20 A

**Tablo 2.** Ambalaj materyallerine ait serbest yağ asitliği (%) değerleri

Serbest Yağ Asitliği (%)		
Ambalaj	İlk ay	1 yılın sonunda
Teneke	0.12 A	0.20 A
Açık renk cam	0.12 A	0.20 A
Koyu renk cam	0.12 A	0.20 A
Açık renk plastik	0.12 A	0.20 A
Koyu renk plastik	0.12 A	0.20 A

**Tablo 3.** Çeşitlere ait Peroksit Değeri (meg/kg)

Peroksit Değeri(meg/kg)		
Çeşit	İlk Ay	1 yılın sonunda
Memecik	6.81 B	12.01 B
Gemlik	6.44 A	10.71 A

**Tablo 4.** Ambalaj materyallerine ait Peroksit Değeri (meg/kg)

Peroksit Değeri(meg/kg)		
Ambalaj	İlk ay	1 yılın sonunda
Teneke	6.63 B	9.09 A
Açık renk cam	6.72 B	9.1 A
Koyu renk cam	6.70 AB	9.13 A
Açık renk plastik	6.59 AB	9.12 A
Koyu renk plastik	6.49 A	20.35 B

**Tablo 5.** Çeşitlere ait Özgül Soğurma (270nm)

Özgül Soğurma (270nm)		
Çeşit	İlk Ay	1 yılın sonunda
Memecik	0.08 A	0.25 B
Gemlik	0.11 B	0.21 A

**Tablo 6.** Ambalaj materyallerine ait Özgül Soğurma (270nm)

Özgül Soğurma (270nm)		
Ambalaj	İlk ay	1 yılın sonunda
Teneke	0.17 A	0.20 A
Açık renk cam	0.25 C	0.20 A
Koyu renk cam	0.24 BC	0.20 A
Açık renk plastik	0.26 C	0.20 A
Koyu renk plastik	0.23 B	0.20 A

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre Gemlik çeşidinin serbest yağ asitliği ve peroksit değeri açısından memecik çeşidine göre daha üstün olduğu; özgül soğurma açısından ise memecik çeşidinin daha iyi değerlere sahip olduğu görülmüştür.

Ancak, aylara göre değişim incelendiğinde bir yıl sonunda memecik çeşidinin daha hızlı bozulma gösterdiği tespit edilmiştir. Serbest yağ asitliğinin ise aylara bağlı olarak değişim göstermediği tespit edilmiştir. Peroksit değerlerinde aylara bağlı değişim önemli oranda görülmesi de koyu renk plastik ambalajda muhafaza edilen zeytinyağlarının peroksit değerlerinin yükselerek sızma özelliğini kaybettiği gözlenmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Zeytin Yağı Tebliği (2007)'ne göre natürel sızma zeytinyağlarının serbest asitliği oleik asit cinsinden en yüksek % 0.8 olarak belirtilmektedir. Buna göre, çalışmada bulunan sızma zeytinyağlarının serbest asitlikleri kodekse uygun bulunmuştur.

Türk Gıda Kodeksi Zeytin Yağı Tebliği (2007)'ne göre natürel sızma zeytinyağlarının peroksit değeri en yüksek 20 meg/kg olarak belirtilmektedir. Buna göre, çalışmada bulunan sızma zeytinyağlarının peroksit değerleri kodekse uygun bulunmuştur. Ancak depolama sonucunda koyu renk plastik ambalajda muhafaza edilen zeytinyağının peroksit değeri 1 yılın sonunda 20.35 meg/kg olduğu ve natürel sızma zeytinyağı özelliğini kaybettiği tespit edilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi Zeytin Yağı Tebliği (2007)'ne göre natürel sızma zeytinyağlarının özgül soğurma 270 nm değeri en yüksek 0,22 olarak belirtilmektedir. Buna göre, çalışmada bulunan sızma zeytinyağlarının özgül soğurma değerleri kodekse uygunluk göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Anonymous. 2006. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' society, fourth Edition, Methods: Ca5a-40, Cd8-53, Ch5-91 and Cd 12b-92.
- Dıraman H. ve Baydır T, A., 2017. Yağların Oksidasyon Kararlılıklarının Tespit Edilmesinde Kullanılan Hızlandırılmış Stabilite Metotları ve Bu Metotların Karşılaştırılması. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology 18: 34-41 (2017/2) [arastirma.tarim.gov.tr/bursagida](http://arastirma.tarim.gov.tr/bursagida) ISSN 1303-3107).
- Karakuş, 2008. Bazı Zeytin Çeşitlerinden Elde Edilen Yağların Oksidasyon Stabilitelerinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Kıvrak M., 2019. Zeytincilik Ve Zeytin İşleme Teknolojisi Programı Ders Notları T.C. Balıkesir Üniversitesi Edremit Meslek Yüksekokulu. 01.07.2019
- TGK, 2017. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı Ve Prina Yağı Tebliği Tebliğ No: 2017/26).
- Yavuz, H. 2008. Türk Zeytinyağlarının Bazı Kalite ve Saflık Kriterleri'nin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

## Antimicrobial activity and QSAR studies of some new (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanols

Meryem Pir<sup>1\*</sup>, Fatma Budak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli University, Köseköy Vocational School, Department of Chemistry, Kocaeli, Turkey.

<sup>2</sup>Kocaeli University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Kocaeli, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: meryem.pir@kocaeli.edu.tr

### Abstract

Antimicrobial activity of some new compounds (**1a-l**) was studied against a panel of microorganisms including *Staphylococcus aureus* (ATCC 25983), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Candida albicans* (ATCC 90028). The geometrical optimization of all the compounds was done by the ab initio (RHF/3-21G) method incorporated in the Hyperchem package. Some theoretical descriptors, namely, surface area approx (SAA), molecular volume (MV), molar refractivity (MR), polarizability (polar), magnitude of dipolar moment ( $\mu$ ), the calculated log of octanol–water partition coefficient (clogP), RMS Gradient, hydration energy (HE), energy of binding ( $E_b$ ), electronic energy (EE) and nuclear energy (NE), were calculated. Some of the compounds exhibited fair activities against these microorganisms. The pMIC values of the compounds were correlated with  $\sigma$ ,  $\pi$  and some theoretical descriptors and fair 1D- and 2D-quantitative structure–activity relationship models were obtained.

**Keywords:** Antibacterial activity, antifungal activity, dimethanol compounds, MIC, QSAR.

### INTRODUCTION

Infections caused by pathogenic microorganisms cause concern in many areas. Compared to other causes, infectious diseases cause the death of many more people worldwide. The oldest health problems in history are problems caused by microbial infections. Antibiotics, due to the resistance resulting from inappropriate, unnecessary and unconscious use of antibiotics, have lost their effects at present (Serpi et al., 2012; Öztürk, 2008). In recent years, scientific research has focused on the discovery of new antimicrobial agents.

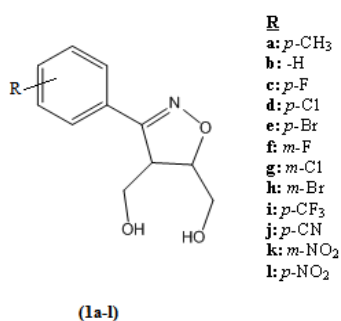
There isn't any report discussing 4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl dimethanol's antimicrobial activity backwards. Therefore, compounds (**1a-l**) are important compounds because they contain heterocyclic system that contain C=N, N-O and two –OH bonds.

The aim of this study was to investigate the *in vitro* antibacterial and antifungal activity of (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanols and to determine the effect of substituents on physicochemical parameters by theoretical calculations.

### MATERIALS AND METHODS

#### Experimental

Synthesis of compounds (**1a-l**) (Figure 1) are in the literature (Pir et al., 2017; Kara, 2009).



**Figure 1.** Structure of (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanol compounds (**1a-l**)

## Biological activity

The antimicrobial activity of compounds (**1a-l**) have been evaluated against a panel of microorganisms including three Gram positive bacteria, two Gram negative bacteria and one fungi by their minimal inhibitory concentrations (MIC) via broth microdilution susceptibility tests (CLSI, 2002; CLSI, 2005; CLSI, 2006). Multiwell microdilution plates (96 U-shaped wells) (sterile and disposable) were used for broth microdilution procedures. The stock solutions were prepared in pure ethanol (Sigma).

For the antibacterial activity studies, all the dilutions of (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanol solutions were done in the wells of microdilution plates by Mueller-Hinton Broth (Oxoid). For *S. mutans* antimicrobial activity tests, Mueller-Hinton Broth (Oxoid) with lyophilized horse blood was used. The concentrations were 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09 and 0.04 µg/mL. Ampicillin and ciprofloxacin were used as reference compounds, obtained from the manufacturers.

For the antifungal activity studies, all the dilutions of the compounds were done with RPMI medium with L-glutamine buffered, pH 7, with MOPS (Sigma) in the wells of microdilution plates. The concentrations were the same as above. The fluconazole was used as a reference compound, obtained from the manufacturer.

## QSAR analysis

We also have studied linear regression of molecular descriptors against antimicrobial activities of compounds (**1a-l**). The geometrical optimization of all the compounds (**1a-l**) has been carried out by ab initio (RHF/3-21G) method incorporated in the Hyperchem package (Hyperchem, 2002). Theoretical descriptors (surface area approx (SAA), molecular volume (MV), molar refractivity (MR), polarizability (polar), magnitude of dipolar moment ( $\mu$ ), the calculated log of octanol-water partition coefficient (clogP), RMS Gradient, hydration energy (HE), energy of binding ( $E_b$ ), electronic energy (EE) and nuclear energy (NE)) of the compounds were also computed by Hyperchem software (RHF/3-21G) method.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of antimicrobial activities are given in Table 1. Among the tested compounds, (**1c**), (**1f**), (**1j**), (**1k**) and (**1l**) have been found to be the most active derivatives against fungi (*C. albicans*) with the MIC value of 100 µg/mL. The results showed that the compounds (**1a-l**) have the most effective activity against *Pseudomonas aeruginosa* among the microorganisms (MIC: 50 µg/mL). All the compounds exhibited antimicrobial activity with MIC values between 100 and 400 µg/mL against *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. mutans* and *C. albicans*. (**1c**) is the most active derivative against all microorganisms.

The biological activities, reported as MIC values (Table 1), were converted to  $pMIC$  ( $-\log MIC$ ) on a molar basis and used as dependent variables to obtain the linear relationship. The  $pMIC$  values were first correlated with Hammett polar substituent constant ( $\sigma$ ) together with lipophilic constant ( $\pi$ ) as independent variables and nine statistically significant correlations were obtained ( $r=0.733-0.917$ ). When SAA, MV, MR, Polar, clogP,  $\mu$ , RMS, HE,  $E_b$ , EE and NE were used as independent variables, forty significant correlations with  $pMIC$  values were obtained.

Squared correlation matrix of the theoretical descriptors used in the quantitative structure-activity relationship study showed no correlation between the descriptors (Table 2). The statistical calculations were performed by SigmaPlot program package.

## CONCLUSION

Here, we report the antimicrobial activity tests of twelve (3-substituted phenyl-4,5-dihydroisoxazole-4,5-diyl)dimethanol compounds (**1a-l**). Antimicrobial activity studies of this compounds haven't evaluated in the literature. So that results are very important for new studies.

*P. aeruginosa* bacteria shows the most dramatic resistance problems related to nosocomial infections and multiresistant strains. Compounds (**1a-l**) have the most effective activity against *P. aeruginosa* among the microorganisms (MIC: 50 µg/mL).

In addition, QSAR studies were carried out. The QSAR study has given us critical information regarding the structural properties of compounds. Therefore, such new compounds can be improved and used for the design of more potent and a new class of antibacterial and antifungal agents in the future.

**Table 1.** Antimicrobial activities of compounds (**1a-l**)

Comp. (Substituent) and Reference Compounds	Antibacterial and antifungal activities, µg/mL					
	<i>S. aureus</i> ATCC 25983	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
<b>1a</b> ( <i>p</i> -CH <sub>3</sub> )	200	200	50	100	100	200
<b>1b</b> (-H)	200	200	50	100	100	200
<b>1c</b> ( <i>p</i> -F)	100	100	50	100	100	100
<b>1d</b> ( <i>p</i> -Cl)	100	100	50	100	100	200
<b>1e</b> ( <i>p</i> -Br)	100	100	50	100	100	400
<b>1f</b> ( <i>m</i> -F)	100	200	50	100	100	100
<b>1g</b> ( <i>m</i> -Cl)	100	100	50	100	100	200
<b>1h</b> ( <i>m</i> -Br)	100	100	50	100	100	200
<b>1i</b> ( <i>p</i> -CF <sub>3</sub> )	100	200	50	100	100	200
<b>1j</b> ( <i>p</i> -CN)	100	200	50	100	100	100
<b>1k</b> ( <i>m</i> -NO <sub>2</sub> )	100	200	50	100	100	100
<b>1l</b> ( <i>p</i> -NO <sub>2</sub> )	100	200	50	100	100	100
Ampicillin	0.78	0.78	–	6.25	≤ 0.25	–
Ciprofloxacin	0.25	0.25	0.25	0.04	–	–
Fluconazole	–	–	–	–	–	0.25

**Table 2.** Correlation coefficients of squared correlation matrix of the theoretical descriptors used in the QSAR study

SAA	1.000											
MV	0.848	1.000										
clogP	-0.114	-0.024	1.000									
MR	0.601	0.909	-0.008	1.000								
Polar	0.541	0.848	-0.006	0.968	1.000							
HE	-0.249	-0.079	0.693	-0.043	-0.036	1.000						
E <sub>b</sub>	-0.016	-0.222	-0.057	-0.439	-0.371	0.062	1.000					
µ	0.153	0.046	-0.538	0.020	0.012	-0.629	0.056	1.000				
EE	-0.050	-0.300	-0.036	-0.512	-0.422	0.041	0.987	0.032	1.000			
NE	0.550	0.697	-0.033	0.620	0.456	-0.027	-0.348	0.063	-0.462	1.000		
RMS	0.006	0.048	0.069	0.078	0.115	0.029	-0.048	-0.066	-0.038	-0.001	1.000	
<b>Variables</b>	SAA	MV	clogP	MR	Polar	HE	E <sub>b</sub>	µ	EE	NE	RMS	

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study is based on the Project No: 2019/009HD supported by Kocaeli University, BAP.

## REFERENCES

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS) 2002. Approved Standard, CLSI Document M27 A2, 2nd ed.; CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Fifteenth Informational Supplement, CLSI-M110-S15, Villanova, PA.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS) 2006. Approved Std. M-7, A-7, USA.
- HyperChem 7.2 for Windows 2002. Hypercube, Inc., Gainesville, FL.
- Kara Y 2009. Nitril oksit ve amidoksim kullanarak yeni hetero halkalı bileşiklerin sentezi. Doctoral Thesis, Kocaeli University, Kocaeli.
- Öztürk R 2008. Akılcı antibiyotik kullanımı ve ülkemizde antimikrobik maddelere direnç sorunu. Toplumdan edinilmiş enfeksiyonlara pratik yaklaşımla. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi, 7-8 Şubat, İstanbul.
- Pir M, Agirbas H, Budak F, Sahin O 2017. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and QSAR studies of some new 6-substituted phenyl 3-(4-chlorophenyl)-3a,4,8,8a-tetrahydro-[1,3,2]dioxaborepino[5,6-d]isoxazoles. Heteroatom Chemistry, 28(2), e21363.
- Serpi M, Özdemir ZÖ, Salman Y 2012. Bazı bitki ekstraktlarının *Propionibacterium acnes* üzerine antibakteriyel etkilerinin araştırılması. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 15(1), 7-12.

## İyonik sıvı modifiye edilmiş polimer sorbentler ile sulu çözeltilerden Zn(II) giderimi

Özgür Özalp, Özgür Arar, Müşerref Arda

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir, Türkiye  
Sorumlu yazar e-mail: muserref.arda@ege.edu.tr

### Özet

Dünya nüfusunun gün geçtikçe artması ve endüstriyel uygulamaların gelişmesi, tatlı suya olan ihtiyacı arttırırken aynı zamanda daha fazla miktarda atık su açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu atık sular değişik maddeleri içerir (organik kirleticiler, ağır metaller, toksik maddeler).

Çevre sorunu oluşturabilen ağır metallerin (Cu, Zn, Fe, Hg, Cd, Pb, Co, Cr, Ni) derişimlerinin izlenmesi ve giderilmesi çevre korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Sulardan ağır metallerin giderilmesi için; çöktürme, adsorpsiyon, membran prosesleri ve elektrodializ gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu klasik yöntemlerin yanında alternatif yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemlerden biri sıvı-sıvı özütlemesi ile iyon değişimi arasında bağlantı kuran ve çevre dostu bazı iyonik sıvıların polimerlere emdirilmesiyle hazırlanan özütleyici emdirilmiş reçinelerdir.

Bu çalışmada, bazı iyonik sıvıların gözenekli polimerlere bağlanmasıyla elde edilen sorbentler(özütleyici emdirilmiş reçineler(SIR)) kullanılarak, sulu çözeltilerde bulunan Zn(II) iyonlarının giderimine etki eden parametreler (optimum sorbent miktarı, pH, zaman, derişim, yabancı iyon etkileri..) incelenmiş ve ticari reçinelerle performans karşılaştırması yapılmıştır.

Optimum özütleyici emdirme oranını bulmak amacıyla Purolite PAD500 ve Purolite MN202 polimer sorbentleri değişik oranlarda - bis-2,4,4-trimetilpentil-fosfinik asit (Cyanex 272) özütleyicisi ile karıştırılıp özütleyici emdirilmiş reçineler sentezlenmiş ve FT-IR ve TGA yöntemleri ile karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan özütleyici emdirilmiş reçine ile yapılan çalışmalar sonucunda optimum reçine miktarı, 0.5 g/ 25 mL, optimum çalışma pH'ı 6.0 olarak saptanmıştır. Özütleyici emdirilmiş reçinelerin, Zn(II) giderim kapasiteleri; PAD500-SIR için 6.32 mg/g, MN202-SIR için ise 5.55 mg/g olduğu hesaplanmış ve Langmuir izoterm modeline uygunluk gösterdikleri belirlenmiştir. Sentezlenen özütleyici emdirilmiş reçinelerin, dengeye ulaşma süreleri; PAD500-SIR için 120 dakika, MN202-SIR için ise 60 dakika olarak belirlenmiş, kinetik açıdan yalancı 2. mertebe izoterm modeline uydukları saptanmıştır.

Farklı derişim oranlarında Cu(II), Ni(II), Co(II) ve Cr(III) iyonlarının girişim etkileri de incelenmiş ve bu iyonların hangi oranda olursa olsun Zn(II) giderimine önemli bir etkisi olup olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** İyonik sıvı emdirilmiş reçineler, Cyanex 272, Zn(II), iyon değişimi, Lewatit TP260

### Abstract

As the world's population grows and industrial applications develop, the need for fresh water increases and more waste water is released. These waste waters contain different substances (organic pollutants, heavy metals, toxic materials). Monitoring and removal of heavy metals (Cu, Zn, Fe, Hg, Cd, Pb, Co, Cr, Ni) that may pose an environmental problem is important for environmental protection. Many methods such as precipitation, adsorption, membrane processes and electrodialysis are used to remove heavy metals from the waters. In addition to these classical methods, alternative methods have been used recently. One of these methods is impregnated resins, which link between liquid-liquid extraction and ion exchange and are prepared by impregnating some environmentally friendly ionic liquids into polymer sorbents.

Batch shaking adsorption experiments were performed in order to examine the effects of pH, dosage of resin, concentration, contact time and foreign ion effects on removal process using sorbents obtained by binding environmentally friendly ionic liquids to porous polymers.

Purolite PAD500 and Purolite MN202 polymer sorbents were mixed with ionic liquid (-bis-2,4,4-trimethylpentyl-phosphinic acid (Cyanex 272)) and impregnated resins were synthesized and characterized by FT-IR and TGA methods in order to find the optimum impregnation rate.

The optimum dosage of resin was determined as 0.5 g/ 25 mL and the optimum working pH was 6.0 as a result of the studies with the prepared impregnated resin. The maximum adsorption capacities of zinc ions on PAD500 and MN202 impregnated resins at 6.32 and 5.55 mg/g, respectively. The Langmuir adsorption isotherm



gave a satisfactory fit of the equilibrium data. The time for the synthesized impregnated resins (PAD500-SIR and MN202-SIR) to reach equilibrium was determined as 120 minutes and 60 minutes, respectively. It was determined that removal of and Zn(II) was well-fitted by second-order reaction kinetic.

Interference effects of Cu(II), Ni(II), Co(II) and Cr(III) ions were also examined at different concentration rates and it was determined whether the concentrations of had no effect of these other ions present in aqueous on removal of zinc ions.

**Key words:** Solvent impregnated resins, Cyanex 272, Zn(II), ion exchange, Lewatit TP260

## 1.GİRİŞ

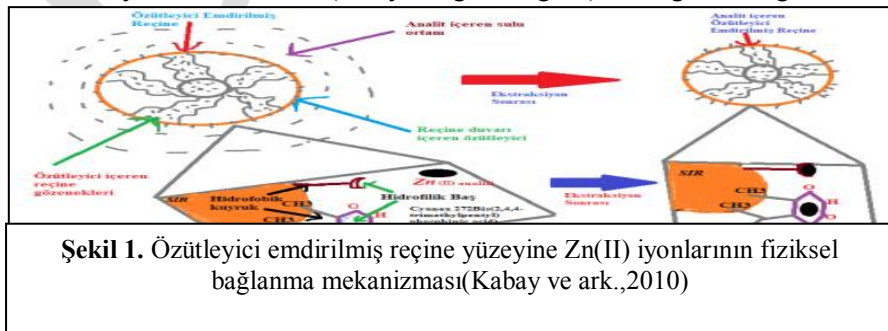
Günümüzde canlıların değişik aktiviteleri sonucunda oluşan atıklar, çevrede hızla yayılmakta ve bunların sonucu olarak bazı çevresel sorunlara neden olmaktadır. Çevre kirleticilerinin en önemlilerinden biri olan ağır metaller, belirli derişimlerden sonra ekosistemde ve canlıların yaşamsal aktivitelerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Bu ağır metallerin (Al, Ag, Be, Cd, Cu, Zn, Ni, Pb...) yasal standartlar ile öngörülen sınır değerlere çekilebilmesi için uygun yöntemlerle giderilmeleri gerekmektedir. Atık sulardan ağır metallerin giderilmesi için kimyasal çöktürme, adsorpsiyon, elektrokimyasal indirgeme, membran prosesleri, sıvı-sıvı özütleme ve iyon değişimi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Son yıllarda, özellikle seyreltik sıvı fazda bulunan metallerin seçici olarak adsorbe edilmesine yönelik özütleyici emdirilmiş reçinelerin(SIR) kullanımı yaygınlaşmıştır. Özütleyici emdirilmiş reçineler, gözenekli bir polimer ile uzaklaştırılmak istenilen metale karşı seçici olduğu bilinen organik özütleyicinin karıştırılması ile hazırlanan sorbentlerdir(Şekil 1) (Kabay ve ark., 2010). Bu türdeki reçinelerin kolay yöntemlerle hazırlanabilmeleri, özütleyici - metal iyonu arasındaki mekanizmanın bilinmesi ve sentezleme sırasında kullanılan organik özütleyicilerin çeşitliliği gibi nedenlerden dolayı, seçiciliği fazla ürünler elde edilmektedir.

Çinko, yerkabuğunun doğal bileşenlerinden olup %0,013' nü oluşturmaktadır ve periyodik tabloda Zn ile gösterilen, 65,4 g/ mol atom ağırlığına ve 30 atom numarasına sahip, oda sıcaklığında katı halde bulunan bir elementtir. İnsan sağlığı için önemli bir mineral olan çinko, endüstride de en çok kullanılan metaller arasında bulunmaktadır. Çinko ve bileşikleri, otomotiv sektöründe, galvanizleme işlemlerinde, kaplamacılıkta, boya ve kozmetik sektöründe, bazı ilaç ve merhemlerde, pil gövdelerinde ve elektrik elemanlarının üretiminde kullanılmaktadır(Boğa, 2007).

Çinko vücutta oluşan birçok biyokimyasal tepkimelerde bazı enzimleri (Timidin kinaz) aktif hale getirmekte olup bağışıklık sistemini ve kemik gelişimini arttırmakta ve yaraların çabuk iyileşmesini sağlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Çinko eksikliğinde; şeker ve prostat sorunları oluşmakta, saç ve tırnaklarda, koku ve tat alma duyusunda zayıflama, çocuklarda gelişim yetersizliği, zihinsel kapasitenin azalması, iştahsızlık, yaraların iyileşme hızında yavaşlama görülmektedir. Çinkonun aşırı kullanımında ise; bulantı, kusma ve ishal durumları gözlenir. Ayrıca tümör oluşumuna, mide krampları, deri tahrişlerine de sık sık rastlanmaktadır (Kahvecioğlu ve ark., 2003).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre alınması gereken günlük çinko miktarları; 1-6 yaş grubu için; 1.12 mg/gün, 10-15 yaş grubu için; 1,6 mg/ gün, 15+ yaş grubu için ise; 1,97 mg/ gün olarak belirlenmiştir(Nazanin ve ark., 2013). Bazı kuruluşlar içme sularında Zn(II) derişimleri için limit değerleri belirlemişlerdir. TSE (Türk Standartlar Enstitüsü) ve EPA(Amerika Çevre Koruma Kurumu), 2005 yılında içme sularında çinko derişiminin sınırını 5 mg/L olarak belirtirken, 2006 yılında ise WHO (Dünya Sağlık Örgütü) bu değeri, 3 mg/L olarak kabul etmiştir.



Bu çalışmada, bazı çevre dostu iyonik sıvıların gözenekli polimerlere bağlanmasıyla elde edilen sorbentler(özütleyici emdirilmiş reçineler (SIR)) kullanılarak, sulu çözeltilerde bulunan Zn(II) iyonlarının giderimine etki eden parametreler incelenmiş ve ticari reçinelerle performans karşılaştırması yapılmıştır.

## 2.MATERYAL ve METOD

### 2.1.Materyal

Çalışmalarda Purolite firmasının ürettiği PAD500 ve MN202 polimerik adsorbanlar ve Lewatit firmasının ürettiği TP260 ticari reçinesi kullanılmıştır. Bu polimerik adsorbanların ve reçinenin özellikleri Çizelge 1’de özetlenmiştir. Organik özütleyci iyonik sıvı olarak kullanılan Cyanex 272 (bis(2,4,4-trimetilpentil fosfinik asit) Cytec Solvay firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm ürünler Merck firmasından alınmıştır.

**Çizelge 1.** Purolite PAD500 ve Purolite MN202 polimer sorbentleri ve Lewatit TP260 reçinesinin özellikleri

Polimerik Sorbentler&Reçine	PAD500	MN202	TP260
Polimer Yapısı	Polistiren	Polistiren	Polistiren
Görünüm	Küresel Boncuklar	Küresel Boncuklar	Küresel Boncuklar
Fonksiyonel grup	İyonik olmayan	İyonik olmayan	Amino Metil Fosfinikasit
İyonik Form	-	-	Na <sup>+</sup>
Parçacık Boyutu	300-500µm	300-1200 µm	400-1250 µm
Yüzey Alanı (min.)	800 m <sup>2</sup> / g	900 m <sup>2</sup> /g	-
Gözenek Hacmi	1,5 mL / g	0.2 mL/g	-

### 2.2 Özütleyci emdirilmiş reçinelerin hazırlanması

Bu çalışmada 1 g kuru polimer adsorban farklı miktarlarda Cyanex 272’nin(0,05;0,1;0,2;1.0;2.0;3g) %66,6 (hacim/hacim) etanol:su karışımında hazırlanan çözeltisi ile 25 °C’ de 24 saat süre ile karıştırıldı . Polimer tanecikleri vakum pompası yardımı ile gözenekli filtreden süzüldü ve deiyonize su ile yıkandı. Reçineler önce açık havada sonra 30 °C’ de vakum altında kurutuldu. Kütle değişiminden yararlanılarak bağlanan özütleyci miktarı bulundu. Yapı aydınlatması için FT-IR ve TGA analizleri de gerçekleştirildi(Zagorodni ve Andrei, 2007).

### 2.3 Kesikli Çalışmalar

#### 2.3.1 Optimum SIR ve optimum ticari reçine miktarının belirlenmesi

Optimum sorbent miktarını saptamak için optimum emdirme oranına sahip (2g Cyanex 272/ g-polimer) emdirilmiş reçine ile 25 °C’ de 24 saat karıştırıldı. Emdirilmiş reçineler tarafından adsorbe edilen Zn(II) ve sorpsiyon sonrası çözeltide kalan Zn(II) miktarı AAS ile ölçülerek bulundu.

#### 2.3.2 Optimum pH Belirlenmesi

Zn(II) sorpsiyonu üzerine pH’ ın etkisini saptamak için 0,5 g emdirilmiş reçine (optimum miktar), farklı pH’ larda 25 mL 20 mg/ L Zn(II) çözeltisi ile 25 °C’ de 24 saat süreyle temas ettirildi. Başlangıçta ve çözeltide kalan Zn(II) AAS ile ölçüldü.

#### 2.3.2 Denge İzoterm Çalışmaları

Adsorpsiyon izoterm çalışmaları, 0,5 g emdirilmiş reçine (PAD500 ve MN202) 25 mL, farklı derişimlerdeki Zn(II) çözeltileri 20, 50, 100, 150, 200 ve 300 mg/ L) kullanılarak pH:6’ da 25 °C sıcaklıkta 24 saat çalkalanarak, su banyosunda gerçekleştirildi. Zn(II) analizleri AAS ile gerçekleştirildikten sonra elde edilen veriler değişik izoterm modellerine uygulandı.

#### 2.3.4 Kinetik Çalışmalar

Kinetik çalışmalar, 2 g Cyanex/ g-reçine emdirme oranına sahip 10 g emdirilmiş reçinenin 500 mL, 20 mg/ L Zn(II) çözeltisinin (pH:6) 25°C’ de 330 RPM’ de karıştırılma hızı kullanılarak gerçekleştirildi. Değişik zaman aralıklarında (1; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90; 120; 180; 240; 300; 360; 420; 480; 540; 600; 1440 dakika) tepkime kabından alınan çözeltilerdeki Zn(II) derişimleri AAS kullanılarak saptanmıştır. Elde edilen veriler değişik kinetik modelleme eşitliklerine uygulanmıştır.

### 2.3.5 Yabancı İyon Etkisi

Hazırlanan emdirilmiş reçinelerin ayırma seçiciliği, organik özütleyicinin kimyasal yapısına ve çalışma koşullarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Değişik derişimlerde (20;100;200;1000 mg/ L) ayrı ayrı yabancı iyonlar (Cu(II), Ni(II), Co(II) ve Cr(III)) ve 20 mg/ L Zn(II) içeren çözeltinin 25 mL' si 0,5 g emdirilmiş reçinelerle 24 saat 25°C' de karıştırıldı. Sorpsiyon öncesi ve sonrası metal derişimleri AAS ile ölçüldü.

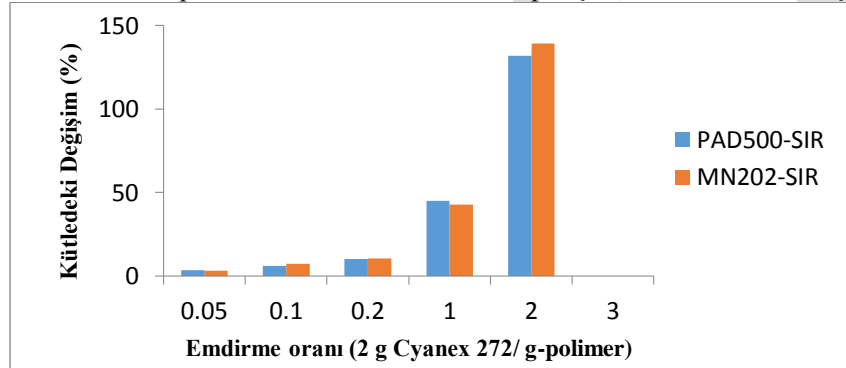
### 2.4 Analizler

Zn(II) analizleri alevli atomik absorpsiyon spektrofotometresi (model Varian Spectra AA-20) kullanılarak gerçekleştirildi.

## 3.SONUÇLAR

### 3.1 Emdirilmiş reçinelerin hazırlanması ve karakterizasyonu

Optimum organik özütleyici Cyanex 272 miktarını belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda Şekil 2' de görüldüğü gibi polimerlerin emdirme işlemi sonrası görülen kütle değişimleri, emdirme oranlarına (g Cyanex/ g-polimer adsorban) karşı grafiğe geçirildi ve emdirme oranı 2 g Cyanex 272/ g-polimer olarak bulunmuştur. Diğer kesikli çalışmalar, bulunan optimum emdirme oranına sahip reçineler ile sürdürülmüştür.



Şekil 2. Emdirme oranlarına karşı polimer kütledeki yüzdesel değişim

Yapı aydınlatması için Purolite PAD500 ve Purolite MN202 polimer sorbentlerine organik özütleyici emdirilmeden önce ölçülen FTIR değerlendirildiğinde; Stiren Divinilbenzen yapısına ait pikler gözlemlenirken, emdirilme işleminden sonra, Stiren Divinilbenzen yapısı piklerine ek olarak organik özütleyici yapısına ait fosfinik asit belirgin pikler gözlemlendi.(3014 cm<sup>-1</sup> (C-H aromatik halkalar), 2917 cm<sup>-1</sup> (Alifatik C-H gerilme), 1602, 1510 ve 1478 cm<sup>-1</sup> (aromatik halkalar), 2954, 1703, 1604 cm<sup>-1</sup> (P-OH),1394 cm<sup>-1</sup>(P-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1365, 1168 cm<sup>-1</sup>(P=O) ve 710, 548 cm<sup>-1</sup> (P-C)).

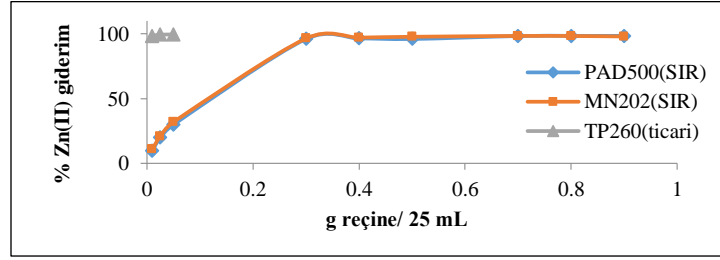
Polimer sorbentlerin özütleyici emdirilmeden ve emdirildikten sonra bozunma sıcaklıklarını belirleyebilmek için Termal Gravimetrik Analiz(TGA/DTA) yapılmıştır. Emdirilme işlemi olmadan önce tek basamakta bozunan polimer sorbentler (T:390 °C), emdirilme işleminden sonra iki basamakta bozunmuşlardır(T<sub>1</sub>:250 °C, T<sub>2</sub>:430 °C)

### 3.2 Reçine Miktarının Belirlenmesi

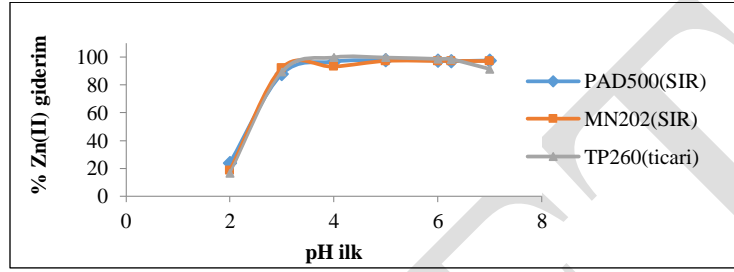
Reçine miktarının Zn(II) giderimi üzerine etkisi her iki emdirilmiş reçine(0,1;0,2;0,3;...;1 g) ve ticari reçine(0,01;0,02;0,025;0,05;0,1g) için pH:6' da 20 mg/L Zn(II) çözeltileri kullanılarak bir dizi sorpsiyon çalışmasıyla incelendi. Reçine miktarına karşı Zn(II) giderim yüzdeleri sonuçları Şekil 3'de verilmiştir. Her iki emdirilmiş reçine için optimum miktar 0,5 g/ 25 mL, ticari reçine için 0,025 g/ 25 mL olarak belirlenmiştir.

### 3.3 pH etkisi

Çözelti pH' nın Zn(II) giderimine etkisini incelemek için yapılan sorpsiyon çalışmalarının sonuçları Şekil 4 'de verilmiştir. pH: 3 ile 8 aralığında Zn(II) giderimi % 99 civarında olmaktadır. Bu aralıkta giderim oranında büyük bir değişim olmadığından, diğer çalışmalar çözeltinin kendi pH' ı olan 6.0' da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. Sulu çözeltilerden Zn(II) giderimine emdirilmiş reçineler ve ticari reçine miktarının etkisi



Şekil 4. Sulu çözeltilerden emdirilmiş reçineler ve ticari reçine ile Zn(II) gideriminde pH etkisi

### 3.4 Denge Çalışmaları

Emdirilmiş reçineler ve ticari reçineler ile Zn(II) sorpsiyonu için denge çalışmaları (pH: 6.0) yapılmış ve elde edilen sonuçları değişik izoterm modellerine(Langmuir, Freundlich, Dubinin Radushkevich(D-R), Redlich-Peterson ve Sips uygunluğu incelenmiştir.

Her iki özütleyici emdirilmiş reçine (PAD500-SIR), MN202-SIR) ve ticari Lewatit TP260 reçinesi için; denge izoterm modelleri karşılaştırıldığında korelasyon değeri ( $R^2$ ) en yüksek olan izoterm Langmuir izotermi olduğu tespit edilmiştir(Çizelge 2). Bu da bize adsorpsiyonun tek tabakada gerçekleştiğini açıklar. D-R izotermi; sıvı faz adsorpsiyonunun meydana geldiği durumlarda kullanılır ve adsorpsiyon enerjisi D-R denkleminde uygun olarak hesaplanır. Bulunacak olan enerji değerinin 8-16 kJ/ mol değerleri arasında yer alması adsorblamanın genel olarak iyon değişimi ile olduğu anlamına gelir. Enerjinin 8 kJ/ mol 'den küçük olması durumunda ise adsorblama fiziksel etkileşmeler ile açıklanabilir. Enerji değeri 8 kJ/ mol 'den daha büyük ise, adsorblama mekanizması kimyasal etkileşmeler ile açıklanabilir (Kurtoğlu ve Atun, 2006).

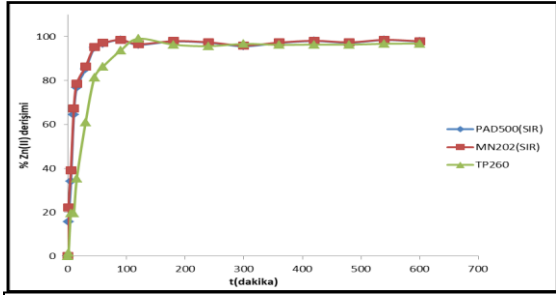
Elde edilen denge değerleri D-R izoterminde yerine konulduğunda enerji değeri; PAD500-SIR için 12,46 kJ/ mol, MN202-SIR için 12,58 kJ/ mol olarak hesaplanmıştır. Bu değerler emdirilmiş reçinelerle Zn(II) gideriminde ( $8 < E < 16$ ) arasında olduğundan adsorpsiyon iyon değişimi gerçekleşmiştir. Ticari Lewatit TP260 reçinesinde ise E değeri 24,79 kJ/ mol olarak saptanması ise adsorplamada kimyasal etkileşimlerin etkili olduğu ile açıklanabilir.

### 3.5 Kinetik Çalışmalar

Emdirilmiş reçineler ve ticari reçine ile sulu çözeltilerden Zn(II) ayrılmasında kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Zaman ve % Zn(II) giderimi arasında çizilen grafik incelendiğinde emdirilmiş PAD500 reçine için 120 dakikada %97 oranda Zn(II) gidererek dengeye ulaşırken, emdirilmiş MN202 reçinesi 60 dakikada dengeye ulaşmaktadır. Ticari Lewatit TP260 reçinesi 120 dakikada dengeye ulaşarak %96 oranında giderim sağlamıştır(Şekil 5). Elde edilen kinetik veriler yalancı 1. Mertebe, yalancı 2. mertebe, Weber-Morris kinetik modellerine uygulanmış ve hesaplanan sonuçlar değerlendirilmiştir(Çizelge 3-4) Her iki emdirilmiş reçine ve ticari reçine için elde edilen sonuçlara göre yalancı 2. mertebe modellerinin korelasyon katsayılar ( $R^2$ ) diğer modellerin korelasyon katsayılarından daha yüksektir.

Kinetik çalışmaların sonuçları ayrıca difüzyon ve reaksiyon modellerine de uygulanmıştır Çizelge 4'de emdirilmiş ve ticari reçine için elde edilen korelasyon katsayılarını göstermektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde emdirilmiş reçine için (MN202-SIR) sonsuz çözelti hacmi(ISV) modeline göre hız tayin basamağının tanecek difüzyon, ticari reçine için film difüzyon olduğu anlaşılmaktadır. Reaksiyona girmemiş çekirdek modeline göre ise(UCM) emdirilmiş reçine (MN202-SIR) ve ticari reçine (Lewatit TP260) için sıvı film olduğu görülmektedir.

Emdirilmiş PAD500-SIR reçinesinin kinetik verileri ISV ve UCM modeline uygulandığında, hız kontrol basamağının hangisine uyum gösterdiğini saptamak mümkün olmamaktadır.



**Şekil 5.** Emdirilmiş reçineler (PAD500-SIR, MN202-SIR) ve ticari reçine (Lewatit TP260) ile yapılan kinetik çalışmalarının sonuçları (zamana karşı %Zn(II) giderim)

**Çizelge 2.** Emdirilmiş reçineler(PAD500-SIR) ve MN202-SIR ve ticari reçine için elde edilen denge izoterm modelleri (Langmuir, Freundlich, D-R, Redlich Peterson ve Sips) uygulanarak elde edilen ait korelasyon katsayılarının değerlendirilmesi

Reçine	Langmuir (R <sup>2</sup> )	Freundlich (R <sup>2</sup> )	Dubinin Radushkevich		Redlich-Peterson (R <sup>2</sup> )	Sips (R <sup>2</sup> )
			(R <sup>2</sup> )	E(kJ/mol)		
PAD500 (SIR)	<b>0,9876</b>	0,8714	0,9894	12,46	0,9957	0,9999
MN202 (SIR)	<b>0,9960</b>	0,9831	0,9891	12,58	0,9941	1
TP260 (Ticari)	<b>0,9902</b>	0,8161	0,8504	24,79	0,9722	0,9613

**Çizelge 3.** Emdirilmiş reçineler(PAD500-SIR, MN202-SIR) ve ticari reçine (Lewatit TP260) için elde edilen klasik kinetik modelleme sonuçları

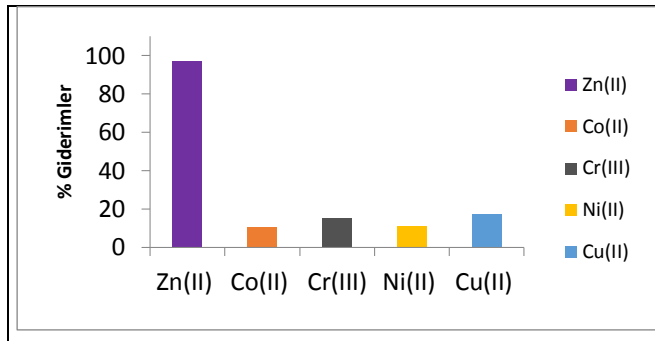
**Çizelge 4.** Emdirilmiş reçineler(PAD500-SIR, MN202-SIR) ve ticari reçine (Lewatit TP260) için difüzyon ve reaksiyon modelleri uygulanarak elde edilen korelasyon katsayılarının değerlendirilmesi

SIR/ Ticari	Klasik Kinetik Modelleme		
	Pseudo 1. Mertebe	Pseudo 2. Mertebe	Weber-Morris
<b>PAD500-SIR</b>	0,5077	<b>0,9996</b>	0,9693
<b>MN202-SIR</b>	0,9822	<b>0,9971</b>	0,9522
<b>Lewatit TP260</b>	0,9796	<b>0,9976</b>	0,8923

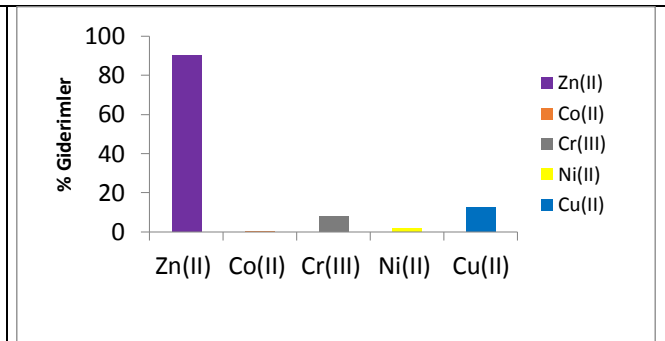
SIR/ Ticari	R <sup>2</sup>			
	ISV		Sıvı Film (X)	Tepk Girn Tabl X <sup>2/3</sup>
	Film Difüzyon -ln(1-X)	Parçacık Difüzyon ln(1-X <sup>2</sup> )		
<b>PAD500-SIR</b>	0,5535	<b>0,5557</b>	0,4017	0,410
<b>MN202-SIR</b>	0,9916	<b>0,9921</b>	0,9191	0,909
<b>Lewatit TP260</b>	<b>0,9779</b>	0,9762	0,9844	0,964

### 3.6 Yabancı İyon Etkisi

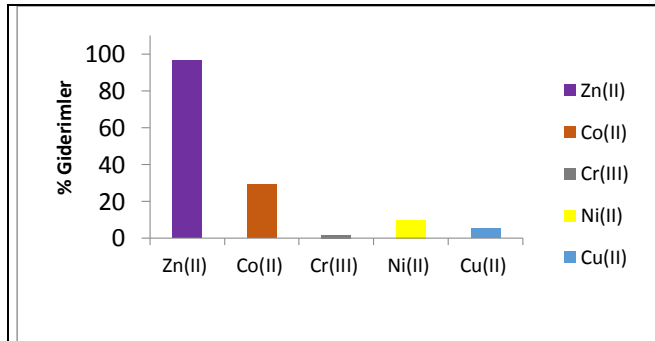
Çözeltide bulunan diğer iyonların Zn(II) giderimine olan girişim etkilerini incelemek amacıyla değişik derişim oranlarında çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda 20 mg/ L Zn(II) ve ortamdaki miktarları 20;100;200;1000 mg/ L olacak şekilde (Cu(II), Ni(II), Co(II) ve Cr(III)) iyonlarını içeren karışımları olduğu ortamlarda Zn(II) giderimleri saptanmış ve hesaplanan sonuçlar ile elde edilen grafikler Şekil 6-11 olarak verilmiştir. Grafikler incelendiğinde ortamdaki diğer iyonların derişimleri artsa bile (20 mg/ L' den 1000 mg/L' a dek) aynı ortamda bulunan Zn(II) iyonlarının, emdirilmiş reçineler ile giderim performansında önemli bir derişim olmamaktadır.



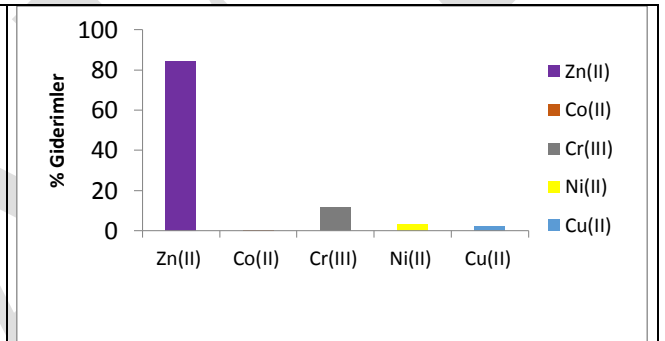
**Şekil 6.** PAD500-SIR Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:20$  mg/l



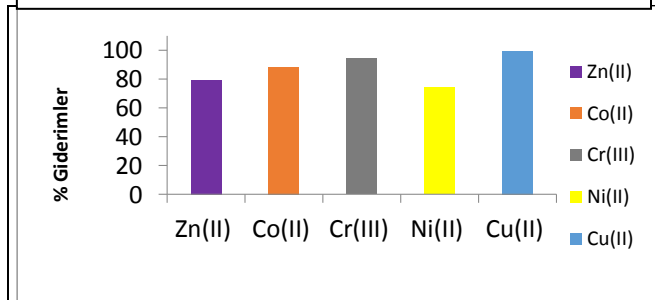
**Şekil 7.** PAD500-SIR Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:20 mg/L,  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:1000$  mg/l



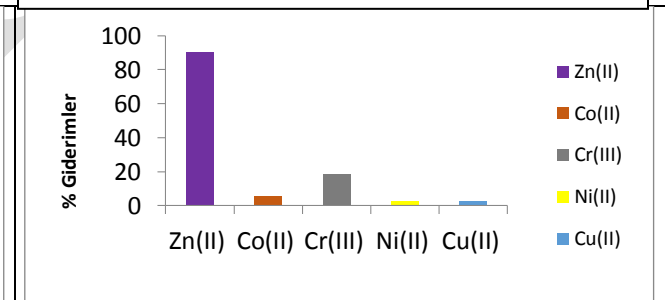
**Şekil 8.** MN202-SIR Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:20$  mg/l



**Şekil 9.** MN202-SIR Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:20 mg/L,  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:1000$  mg/l



**Şekil 10.** Ticari reçine (Lewatit TP260) Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:20$  mg/L



**Şekil 11.** Ticari reçine (Lewatit TP260) Zn(II) iyonları arasındaki adsorbisyona diğer iyonların girişim etkileri [ $Zn^{2+}$ ]:20 mg/L,  $[Cu^{2+}]:[Ni^{2+}]:[Co^{2+}]:[Cr^{3+}]:1000$  mg/L

## Denklemler

### Denge izoterm modelleri

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_0} + \left(\frac{1}{b \cdot Q_0}\right) * \left(\frac{1}{C_e}\right)$$

(1) **Langmuir**

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e$$

(2) **Freundlich**

$$E = (-2K)^{-1/2}$$

(3) **D – R**

$$q_e = \frac{AC_e}{1 + BC_e^q}$$

(4) **R – P**

$$q_e = \frac{q_m K_s C_e^{1/m}}{1 + K_s C_e^{1/m}}$$

(5) **Sips**

### Denge izoterm sembolleri

C<sub>e</sub>: sorbentin dengedeki derişimi (mg/ L)

q<sub>e</sub>: Dengedeki adsorbentin adsorplanan madde miktarı(mg/g)

Q<sub>0</sub>: Tek tabakada kaplanan alan (mg/g)

K<sub>L</sub>: Langmuir izoterm sabiti (L/mg)

K<sub>f</sub>: Freundlich izoterm sabiti

E; Ortalama sorpsiyon enerjisi(kJ/ mol)

K; Adsorpsiyon enerjisi ile ilgili sabit ( mol/ kj)

A, B ve q; Redlich-Peterson izoterm sabitleri

K<sub>s</sub>: adsorpsiyon enerjisine ait Sips sabiti (L/mg)<sup>1/m</sup>

q<sub>m</sub>: 1g reçine başına düşen analit (mg) miktarı(mg/g)

### Kinetik izoterm modelleri

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e + \frac{k_1}{2,303} t$$

Yalancı 1.mertebe izotermi (

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t,$$

Yalancı 2.mertebe izotermi (

$$q_t = k_{id} * t^{\frac{1}{2}} + C$$

Weber – Morris izotermi

### Kinetik izoterm sembolleri

q<sub>e</sub>: Denge anında adsoblanan Zn(II) miktarı

q<sub>t</sub>: Farklı zamanlarda adsoblanan Zn(II) miktarı

k<sub>1</sub>: adsorpsiyonun birinci mertebeye hız sabiti (dk<sup>-1</sup>)

k<sub>2</sub>: adsorpsiyonun ikinci mertebeye hız sabiti (g/mg.dk)

k<sub>i</sub>: Weber Morris-partikül içi difüzyon hız sabiti(g/mg.dk<sup>2</sup>)

## SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Optimum özütleyici derişiminin belirlenmesi için belirli oranlarda Cyanex272 özütleyicisi, %66 Etanol/Su çözgeninde çözülerek polimer sorbentlere emdirilmiş ve optimum özütleyici derişimi 2 g Cyanex 272/ g-polimer olarak tespit edilmiştir.

Özütleyici emdirilmiş reçineler (Purolite PAD500 ve Purolite MN202) ile sulu çözeltilerden Zn(II) iyonlarının giderimi için optimum SIR miktarı 0,5g/ 25 mL çözelti, ticari Lewatit TP260 reçinesi için ise 0,025g/ 25 mL olarak bulunmuştur.

Tüm reçineler ile Zn(II) giderimi için pH: 6.0' da çalışmalara gerçekleştirilmiştir.

Sulu çözeltilerden Zn(II) iyonlarının emdirilmiş reçineler (SIR) ile gerçekleştirilen denge çalışmalarında PAD500-SIR, MN202-SIR ve ticari Lewatit TP260 reçinesi için en uygun izoterm modeli Langmuir olarak belirlenmiştir.

Üç reçine içinde (PAD500-SIR, MN202-SIR ve Ticari Lewatit TP260 reçinesi) kinetik izoterm grafiklerine ait korelasyon katsayıları ( $R^2$ ) karşılaştırıldığında, yalancı 2.mertebe izoterm modeline uygunluğu saptanmıştır.

Yabancı iyonların (Co(II), Ni(II), Cu(II) ve Cr(III)) derişimleri arttırıldığında, Zn(II) iyonunun giderimine önemli bir etkisi bulunmamaktadır.

## TEŞEKKÜR

Mali destek sağlayan Ege Üniversitesi BAP (FYL-2018-20302) kurumuna teşekkür ederiz. İyonik sıvılar için Solvay Cyanex firmasına ve reçineler için Purolite firmasına teşekkür ederiz. TGA ölçümleri için Dr. Sıla BALCAN GÜMÜŞTAŞ' a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

Boğa A 2007. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 16.3

Kabay N, Cortina JL, Trochimczuk A, Streat M 2010."Solvent-impregnated resins (SIRs)–methods of preparation and their applications." Reactive and Functional Polymers 70.8: 484-496.

Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S 2003. Metalurji Dergisi 136: 47-53.

Kurtoğlu AE, Atun G 2006. Determination of kinetics and equilibrium of Pb/Na exchange on clinoptilolite. Separation and Purification Technology, 50, 62– 70.

Nazanin R 2013. Zinc and its importance for human health: An integrative review." Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences 18.2 : 144.

Zagorodni, Andrei A 2006. Ion exchange materials: properties and applications. Elsevier



## Apiterapinin Türkiye'deki yeri

Sema Çetinkaya

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Kütahya, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: sema.cetinkaya@dpu.edu.tr

### Özet

Bireyler daha sağlıklı ve daha düzenli bir yaşam sürdürebilmek adına tıbbi yöntemler yanında tamamlayıcı tıp ve alternatif tıp yöntemlerini de tercih etmektedirler. Bunlardan biri, bal, polen, arı sütü, propolis, arı zehiri ve balmumu gibi arı ürünlerinin kullanıldığı apiterapi yöntemidir. Arı ürünleri insan sağlığını korumada ve iyileştirmede fayda sağlayan, tedavi edici gıda destekleyicileridir. Arı ürünleri bağışıklık sisteminin destekleyicileri olarak kullanıldıkları için kimyasal yapılarını bilmek gerekmektedir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın sistemine kayıtlı yaklaşık 30 GETAT (Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp) Merkezi bulunmaktadır. Ülkemizde anlamlı sonuçları elde edebilecek daha çok akademisyene ve bulunan sonuçların dahil edilebileceği bir veri havuzuna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerinden olan apiterapinin önemine değinilmiş ve ülkemizdeki mevcut durum tartışılmaya çalışılmıştır.

**Anahtar Kelime:** Apiterapi, Arı sütü, Arı zehiri, Bal, Bal mumu, Polen, Propolis

### The place of apitherapy in Turkey

#### Abstract

Individuals prefer complementary and alternative medicine methods, in addition to medical methods, in order to maintain a healthier and more regular life. One of them is apitherapy method which uses bee products such as honey, pollen, royal jelly, propolis, bee venom and beeswax. Bee products are therapeutic food supplements that provide benefits in protecting and improving human health. As bee products are used as supporters of the immune system, it is necessary to know their chemical structure. In Turkey there are about 30 GETAT (Traditional and Complementary Medicine) Center is registered in the Ministry of Health system. In our country, there is a need for more academicians who can obtain meaningful results and a data repository where the results can be included. In this study, the importance of apiterapy, one of the complementary and alternative medicine methods, has been mentioned and the current situation in our country has been discussed.

**Keyword:** Apitherapy, Bee venom, Beeswax, Honey, Pollen, Propolis, Royal jelly

### GİRİŞ

Günümüzde artan ilaç kullanımı modern tıp dışındaki tedavi yöntemlerine olan ilgiyi artırmıştır. Tamamlayıcı tıp ve alternatif tıp olarak bilinen bu tedavi yöntemleri çeşitli şekillerde uygulanmaktadır. Bunlardan biri bal arısı ürünlerinin sağlıktaki kullanımı olan apiterapi tedavi yöntemidir. Apiterapinin bilinen geçmişi antik Yunan, Mısır ve Çin'e dayanmaktadır. Ülkemizde bu konuda ulaşılan en eski kayıtlar Sümer tarihine kadardır. Apiterapinin günümüzde yapılan çalışmalarının önünü açan bilim insanı ise Avusturya'lı doktor Phillip Terc (1800) olmuştur (D' eprio ve Walsh, 1999). Uzak doğu ülkelerinin apiterapi çalışmalarına olan yoğun ilgisi tüm dünyaya yayılmaktadır. Apiterapinin bilinen faydalarına tıp dünyası da kayıtsız kalamamıştır (Aydın ve Tekeoğlu, 2018). Bu konuda yeni keşifler oldukça bilim insanlarının ve ilaç firmalarının ilgisi de bu yöne kaydığı görülmektedir.

Hukawng vadisinde amber taşında bulunan petek ve arı fosilleri, günümüzdeki bal arılarının atası kabul edilmektedir. Arılar, polenin devamlılığını sağlayarak bitkilerin çoğalmasına çok büyük katkıda bulunurlar. Bunun yanında bal arıları, ürettikleri ürünlerle de insanlığa faydalı olmayı sürdürmektedirler. Arı ürünleri antitoksidan özelliği yüksek ve özellikle bağışıklık sistemini destekleyen ve düzenleyen tamamlayıcı uygulama yöntemleri olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı, kimyasal yapılarını bilmek gerekmektedir. Çünkü arı ürünleri çiçeklerin yetiştiği bölgelere göre değişmektedir.

Propolis ve balın insan sağlığı için bilinen kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. Bunun yanında arı ürünlerinden kullanımı yeni keşfedilmiş olan uygulama ise apilarnildir. Dünyanın birçok yerinde ve tarih öncesi çağlardan beri kullanılan propolis, tıpta da uygulanabilmektedir (Sforcin, 2007). Propolisin kullanım amacı bağışıklığı güçlendirmektir. Bunun yanında, arı poleni bağışıklığı güçlendirirken, enerji kaynağı da olmaktadır. Bal, boğaz ağrısı ve yanık tedavisi için uygulanırken bir antiseptik olarak da kullanılabilir. Arı sütü, vücut direncini artırıcı ve güç verici olarak kullanılabilir (Premratanachai ve Chanchao, 2014).

Arı zehiri kronik iltihaplı hastalıkların tedavisinde kullanılabilen geleneksel tıp yöntemlerinden birisidir (Premratanachai ve Chanchao, 2014).

Ülkemizde yaklaşık 30 adet Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Merkezi'nden (GETAT) yalnızca 3'ü apiterapi tedavi yöntemine sahiptir. Arı ürünlerinin faydaları düşünüldüğünde ülkemizdeki apiterapi merkezlerinin sayısı oldukça düşüktür. Bu derleme makalesinin amacı arı ürünleri ile faydaları ve ülkemizdeki apiterapi merkezlerine olan ihtiyaç hakkında farkındalık oluşturmaktır.

## ARI ÜRÜNLERİ VE KULLANIMLARI

### Polen

Literatüre göre bilinen en eski polen çalışması İspanya'daki Yahudi ve Arap hekimleri tarafından yapılmıştır. O zamanın hekimlerinden olan Cordoba'lı Maimoides kanı pıhtılaştırıcı özelliğinden dolayı poleni hastalarına önermiştir (Crane E, 1999). Eski Mısır'da 'hayat veren toz' ismiyle bilinen polen günümüzde ise tam besin kaynağı olarak bilinmektedir. İnsanlar günlük mineral, vitamin ve protein gereksinimini sadece polen kullanarak karşılayabilmektedir. Bu sebeple polen birçok Avrupa ülkesinde günlük besin diyetine dahil edilmiştir (Aydın ve Tekeoğlu, 2018). Arılar poleni, özel ağız salgılarını ve bal özünü birleştirerek bal arısı polenini oluştururlar. Arı polenin çoğunluğunu flavonoid glikozidler, polifenolik bileşikler ve fenolik asitler oluşturur (Han ve ark., 2007). Arı polenleri farklı yollarla toplanan polenlerden ayrı tutulmalıdır. Polen 21 günlük işçi arılar tarafından koloninin protein gereksimini karşılamak için toplanır. Bal arısı poleninde B1-2-3-5-6-7-8-9-12 vitaminleri, A-C-D-E provitaminleri, K-Na-Ca-Mg-S mineralleri, ham protein, karbonhidrat, yağ, su bulunmaktadır. Arı polenleri yaşlanmayı geciktiren ve hücrelerin yenilenmesini aktive eden özelliğe sahiptir. Bunun yanında, hücrelerdeki solumu hızlandıran, yüksek miktarda karatenoid içermektedirler. Polenin iyileştirici özellikleri, bedensel güç, sindirim rahatlığı, gençleştirme, fiziksel güç hissi, ciltte gençleşme, iştah artışı, hemoglobin sayısında artış, fiziksel performanslarda artış olarak sıralanabilir. Polenin fayda verici tedavileri hayvan deneylerinde kanser, soğuk algınlıkları, sivilce, anemi, yüksek kan basıncı, sinir, endokrin bozukluklar, ülser ve erkeklerde kısırlık tedavileridir (Sharma, 1980).

### Arı Sütü

Arı sütü suda kısmen çözünen viskoz bir jeldir. Rengi, depolandığı günden sonra bekleme süresiyle ilişkili olarak değişmektedir (Liu ve ark., 2008). Esasında, kovadaki yavru arıları ve kraliçe arıyı beslemek için kraliyet jeli olarak da bilinen besin maddesidir. Arı sütünü işçi arıların 6-15 günlük olanları üst salgı bezlerinden salgılayabilirlerken daha sonra erginleşen işçi arılar bu jeli salgılayamamaktadırlar. Bir işçi arı 45 gün yaşayabilirken kraliçe arı ise bu arı sütüyle beslenerek 6-7 sene yaşayabilmektedir. Arı sütü, su, protein, yağ, şeker, mineral, 17 çeşit aminoasit ve 26 dan fazla yağ asidi, vitamin (B-C-D-E) içermektedir (Kaftanoğlu ve ark., 1997).

Hücreleri yenileyici özelliği, hücre üretimini sağlama özelliğine, kalp hastalıklarını tedavi edici sürece katkıda bulunma özelliğine, antibiyotik tedavisini destekleyici özelliğe ve metabolizmayı gençleştirme özelliğine sahiptir. Yapılan literatür araştırmasında arı sütünün etkileri lösemi, lenfoma ve hepatoblastomu olan çocuklarda incelenmiştir. Sonuçta bu hastalarda; genel durumda düzelme, kilo alma, kandaki lökosit, lenfosit ve nötrofil seviyesinde artma olduğu gözlenmiştir (Kaftanoğlu ve ark., 1997). Hidaka ve ark. menepoz sonrası kadınlarda arı sütünün etkisine bakmışlardır. Arı sütü kemiklerin kalsiyum kazanmasında etkin olmuştur ve osteoporozu engellenmiştir (Hidaka, 2006). Sağlıklı bireylerde arı sütünün kan şekeri üzerine etkisine bakılmıştır ve arı sütünün glukoz miktarına etki eden maddeleri kapsadığı ve arı sütü kullanan kişilerde glukoz seviyesinin dikkat çekici biçimde düştüğü gözlenmiştir (Münstedt ve ark., 2009).

Arı sütünün meme kanserli hastalarda lenfositler tarafından immunglobulin üretimini ve anti-kanser etkisi gösteren IgM ve IgG değerlerini artırdığı gözlenmiştir. Yani; BPA ile uyarılan MFC-7 hücrelerinin çoğalmasına arı sütünün olağan etkisine bakılmış ve BPA'nın çoğalmayı uyarıcı etkisini baskıladığı ileri sürülmüştür (Nakaya ve ark., 1990). Arı sütü ile hazırlanan preparatın malign duodenal ülser, böbrek ve sekretuar bez kanseri olanlarda palyatif etki gösterdiği, bu hastaların iştahlarının artıp ağrılarının azaldığı gözlenmiştir (Krylov ve ark., 2007).

### Propolis

Propolis bal mumuyla reçinenin karışımından oluşmaktadır. Propolis, yapısındaki bişenlerini bitkilerden alıp, bitkilerin savunma mekanizmasına destek olmaktadır. Arılar kovana taşıdıkları propolisi birçok durum için kullanabilmektedirler. Propolis arılar tarafından kovanda meydana gelen çatlakları onarmada, kovanda

öldürülen yabancı yağmacıları kaplayarak izole etmede ve yavru gözlerinin dezenfekte etmekte kullanılmaktadır. Propolis antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antitoksikan, antiparazitik yapıdadır. 60-70 °C'de sıvı, 25-45 °C'de yumuşak ve yapışkan, 15 °C'nin altında ise katı ve kırılabilir yapıdadır. Propolisin temel kimyasal içeriğini ise, flavonoidler, fenolikler ve farklı aromatik bileşikler oluşturmaktadır. Propolis, alkol, aseton, amonyak, benzen, kloroform ve eterde iyi çözünmektedir. Farklı propolis örnekleriyle yapılan çalışmalar sonucunda propolisin bileşiminde 300'den fazla madde belirlenmiştir (Münstedt ve Zygmunt, 2001).

Ülkemizde propolis üzerine yapılan araştırmalar literatürde mevcuttur (Sorkun ve ark., 2001). Farklı birkaç şehirden toplanan propolisler GC-MS ile analiz edilmiştir. Sonuçlara göre aynı bölgenin propolisleri benzerlik gösterirken farklı bölgelerdeki propolis içerikleri değişmektedir. Farklı bir çalışmada ise farklı bölgelerden toplanan propolislerin antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır (Kartal vd., 2002).

İspanya'nın iki farklı bölgesinden elde edilen propolis için yapılmıştır. Propolisler GC-MS ile analiz edilmiş ve propolislerde yüksek seviyede kafeik asit, ferulik asit ve onların türevleri ile düşük seviyede sinamik asit, kumarik asit ve onların esterlerine rastlanmıştır. Bunlar *Populus nigra* tomurcuk salgısının kimyasallarıdır. Propolis içeriğini inceleyebileceğimiz bilinen sabit yöntemlerimiz olmadığından, propolisin içerik analizinin belirlenmesi zorlaşmaktadır. Bitkinin yetiştirme alanı propolisin kimyasal analizlerinde, kalite basamağı olmalıdır (Garcia-Viguera, 1992).

Venezuela propolisiyle yapılan çalışmalarda ve toplanan örneklerde ise polyprenylated benzofenonları izole edilmiştir. Kromatografik çalışmalar sonucu *Clusia major* ve *Clusia minor* (*Guttiferae*) 'ün bu bölgelerde propolis kaynağı bitkiler olduklarını belirlenmiştir. Propolisin kimyasal içeriği propolisin bitkisel kökenine göre değişmektedir (Tomas-Barberan ve ark., 1993).

Bir diğer çalışmada ülkemiz ve Cezayir propolisleri karşılaştırıldığında Türkiye örneklerinde diterpenik asitlere rastlanmıştır. O yıllarda diterpenik asit bulunan ilk Brezilya ikinci Türkiye olmuştur (Velikova ve ark., 2000).

Ülkemizde propolis için Türk Standartları Enstitüsü (TSE-2003) tarafından bir standart çizelgesi oluşturulmuştur. Türkiye'de, propolisin içerisinde fenolik asit, benzoik asit (% 0,6-12,0 m/m), flavonlar, flavonoller, glikoz (% 0,8-7,7 m/m), sakkaroz (% 0,1-3,4 m/m) belirli oranlarda bulunmalıdır.

### **Arı Zehiri**

Arı zehiri suda çözünebilir, hemorajik bir yapıya sahiptir ve 63 bileşenden oluşmaktadır. Zehirin %88'i sudur ve geri kalan glukoz, fruktoz ve fosfolipit içerikleri, arının kanında bulunanlarla benzerdir (Crane, 1990). Arı zehirinin yapısında histamin, feromonlar, enzimler, peptitler, amino asitler ve diğer asitler bulunmaktadır. Arı zehiri hücreyi tahrip eden bir yapıdadır. Zehirin yapısında fosfolipaz A bulunmaktadır. Fosfolipaz A hücre zarlarının fosfolipitlerini parçalayarak hücreleri yok eder. Arı zehirindeki ağıruları ise mellitin oluşturmaktadır. Mellitin kan hücrelerinin duvarlarını parçalayarak hücreleri tahrip eder. Arı zehirinde bulunan histamin arının zehirinin geçtiği yerde kaşıntıya sebep olur. Arı zehiri özellikle kas-iskelet sistemiyle ilişkili olan nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. *Apis dorsata* (Dev bal arısı) ve *A. cerana* (Doğu bal arısı) zehiri çalışmalarıyla farklı türlerdeki arıların zehirlerinin farklılıklarının çok az olduğu gösterilmiştir (Sharma ve Singh, 1983).

Köpekler ile yürütülen arı zehiri ile ilgili çalışma (Vick ve Brooks, 1972); mellitin ve apaminin, yükselmiş plazma kortizolü ürettiklerini göstermiştir. Farklı başka değerler ve ölçümler ile birlikte bu durum; arı zehirinin birçok tedavi edici etkisinin bağışıklık sisteminin uyarılması ile aktif olarak çalıştığını ortaya koymaktadır. Arı zehirinde bulunan mellitin yan etkilerinin olduğu da bulunmuştur. Tüm zehir uygulandığında alerjik vakaların dışındaki vakalarda hiçbir yan etki gözlenmemiştir (Broadman, 1962). Arı zehirinin sara hastalığı için de faydaları çalışılmıştır (Ziai ve ark., 1990).

Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da 1980'lerden günümüze arı zehirine aşırı duyarlılığı olan insanlarda duyarsızlaştırma çalışmaları yasal olarak yapılmaktadır. Batılı ülkelerde özellikle romatizma ve eklem iltihabının tedavisi için arı zehiri uygulanmaktadır. İnsanlara zehir uygulamaları; doğal arı sokmaları, deriye enjekte etme, elektroforez, krem sürme, nefesle vücuda alma şeklinde olmaktadır (Sharma ve Singh, 1983). Bütün bu uygulamalarda kontrollü olmak ve uygulanan doza dikkat etmek çok önemlidir. Bunun eğitimini ve uygulama dozunu iyi öğrenmek gerekmektedir. Birçok şifa merkezine öncülük eden Japonya'da 1980 yılında bir Api-akupunktur birliği kurulmuştur. Arı zehiri uygulaması Çin'de tıp doktorları tarafından ve hastanelerde akupunktur tedavisi ile birlikte uygulanmaktadır. Arı zehiri içeren, eklem iltihaplanmasında eklemlere

uygulanabilecek kremler mevcuttur (Sharma ve Singh 1983). (Örn. Almanya'da Forapin ve Apicosan, Fransa'da Apivene ve Avusturya'da Immenin).

## **Bal**

Bal suda çözünebilen ve 10-18 °C arasında katı formda bulunabilen şeker içeriği yoğun bir besin maddesidir. Balın yapısında hidrojen peroksit, flavonoidler, fenolikler ve terpenler bulunmaktadır. Balın bileşimi ve lezzeti, toplandığı çiçeğin nektarına, toplayan kişinin toplama şekline göre değişmektedir. Balın lezzeti toplandığı bölgenin coğrafik şekillerine ve bitki örtüsüne göre farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre balın lezzet farklılığını oluşturan maddeler, içeriğindeki prolin miktarı, glukonik asit ve şekerdir (Maede ve ark.,1962).

Balın içeriğinde 200 madde bulunmaktadır. Bu maddelerin %80'i şeker, %17'si su, organik asit, vitamin, mineral, protein, fenolik asit, serbest aminoasitler ve yağlardır (White, 1979). Balda bulunan diğer bileşenler, B1 ve B2 vitaminleri, C vitamini, bal mumu ve polendir. Yapısında bulunan inorganik bileşenler K, Mg, Cl, P, S, Si elementleridir (Crane, 1980). Balın yapısındaki aminoasitlerin kaynağını bal arısı, polen ve nektar oluşturmaktadır. Balda bulunan bu aminoasitler, prolin, glutamik asit, alanin, fenil alanin, tirozin, lösin, izolösindir. Bu aminoasitlerden bazıları antioksidan özelliğindedir. Balın içerdiği aminoasit miktarı yaklaşık 20-300 mg/100 gr'dır. (Echigo ve ark.,1973).

Asit fosfatazın baldaki varlığını ilk ispatlayan Giri (1938) olmuştur. Asit fosfataz organik fosfatları inorganik fosfatlara çeviren hidrolaz enzimidir. Bu enzimin asıl yeri polen olmasına rağmen nektarın içerisinde de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarla depolanan balın yapısı altı aylık bekleyişin ardından incelendiğinde asit fosfataz miktarının önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Balda asit fosfataz aktivitesi tayini çok önemlidir, çünkü asit fosfataz miktarı balın fermantasyon kriteri olarak kabul edilmektedir (Zalewski, 1965; Ivanov, 1981).

Fermente balların, fermente olmayan ballara oranla daha fazla asit fosfataz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (Giri, 1938). Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında asit fosfataz enziminin balın botanik kaynağına bağlı olabileceği de belirtilmiştir. Balın kalite tayininde bu enzim, parametre olarak alınabilmektedir. Asit fosfataz baldaki pH ile de değişmektedir. Yapılan çalışmalarda pH arttıkça asit fosfataz aktivitesindeki düşüşün azaldığı bildirilmiştir (Torre ve ark., 2006).

## **Bal mumu**

Bal mumu bileşenleri; hidrokarbonlar (%14), monoesterler (%35), diesterler (%14), triesterler (%3), hidroksil monoesterler (%4), hidroksil polyesterler (%8), asit esterler (%1), asit polyesterleri (%2), serbest asitler (%12), serbest alkoller (%1) ve %6 tanımlanamamış içerikten oluşmaktadır (Çelik, Aşgun; 2016). Literatür çalışmalarına bakıldığında Asya Bal Arısının ürettiği bal mumlarında bulunan bileşik oranları düşük seviyede bulunmaktadır. *A. m. capensis* (Cape arısı) ve *A. m. scutellata* (Afrika bal arısı) bal mumlarında 13 protein bulunmaktadır, *A. Mellifera capensis* (Cape arısı) mumlarında en az 11 protein bulunmaktadır (Çelik ve Aşgun, 2016). Bal mumu üretildiği aylara göre oransal farklılıklar göstermektedir. Nisan ve haziran ayları arasında değişmektedir (Brown, 1981). MS 150-219'da Dr. Zhang Zhongjing bal mumundan faydalanabilecek, tedavi edilebilecek durumlar içinde kabızlık ve dizanteriyi saymıştır (Çelik ve Aşgun, 2016).

## **GETAT, APİTERAPİ VE ÜLKEMİZDEKİ YERİ**

Arı ürünlerinin sağlıkta kullanımına apiterapi denir. Türkiye'de sağlık bakanlığının resmi sistesine kayıtlı yaklaşık 30 GETAT (Geleneksel ve tamamlayıcı tıp) merkezinden sadece üçünde (Bursa, Kayseri ve Malatya) apiterapi uygulaması yapılabilmektedir (Sağlık, 2019). Türkiye GETAT Yönetmeliğince tedavi edici alanlar şu uygulamalarla sınırlandırılmıştır: Ozon Uygulaması, Mezoterapi, Apiterapi, Fitoterapi, Refleksoloji, Hipnoz, Sülük (Hirudoterapi), Homeopati, Kayropratik, Kupa (Hacamat) Uygulaması, Larva Uygulaması, Proloterapi, Osteopati, Müzik terapi uygulamaları güncel yönetmelik ile kabul edilen uygulamalardır. GETAT Yönetmeliği, Akupunktur tedavisi, Ozon tedavisi, Mezoterapi tedavisi, Kupa tedavisi (Hacamat), Fitoterapi, Sülük (Hirudoterapi) tedavisi, ve Homeopati tedavisi için Sertifikalı Eğitim Programı Standartları yayınlamıştır (Katı, 2016). GETAT Yönetmeliği, 27 Ekim 2014'te Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe girmiştir. Tedaviyi uygulamak üzere sertifika alan doktor, diş doktoru, uygulama merkezi, GETAT Uygulamaları Bilim Komisyonu tanımları ve alan eğitimi, tatbik etme, kontrol mekanizmaları GETAT Yönetmeliği'nde tanımlanmıştır. Bu yönetmelikler ve GETAT tarafından yapılan uygulamaların takip edilebileceği resmi bir internet sitesi bulunmaktadır (Sağlık, 2019).

Ülkemizdeki GETAT Uygulama Merkezleri; Namık Kemal Üniversitesi SUAM, Konya Selçuk Üniversitesi, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi MERAM Tıp Fakültesi, İstanbul Yeditepe Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi 1453 İstanbul Tıp Fakültesi SUAM, İstanbul Medipol Üniversitesi, İstanbul Biruni Üniversitesi, İnönü Üniversitesi, Harran Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi, Gazi Üniversitesi, Fırat Üniversitesi, Düzce Üniversitesi SUAM, Cumhuriyet Üniversitesi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Başkent Üniversitesi, Balıkesir Üniversitesi, Atatürk Üniversitesi, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, İstinye Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, T.C. Yüksek İhtisas Üniversitesi Özel Koru Hastanesi ve Sağlık Bakanlığına Bağlı Uygulama Merkezleridir (Sağlık, 2019). Ayrıca GETAT Eğitim Merkezleri, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi, İstanbul Yeditepe Üniversitesi, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Gazi Üniversitesi, Cumhuriyet Üniversitesi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Atatürk Üniversitesi, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, SBÜ-Sağlık Bakanlığı Eğitim ve Araştırma Hastaneleri şeklinde sıralanabilir (Sağlık, 2019).

Yukarıdaki GETAT Merkezlerinden yalnızca üçünün Apiterapi Merkezi olarak hizmet vermesi bu alandaki eksikliği ortaya koymaktadır. Apiterapik özellikleri olan arı ürünlerinin ülkemizdeki uygulama merkez sayısının artırılması gerekliliği oldukça önemlidir. Bunun yanında, Türkiye’de Apiterapi çalışmalarının “kanıta dayalı” bilgi paylaşımının yapıldığı bir Apiterapi Derneği mevcuttur. Üyelerinin çoğunluğu tıp hekimleri ve sağlık çalışanlarıdır. Gıda mühendisleri, Diyet ve Beslenme, Kimya, Biyoloji gibi farklı bölümlerden akademisyenler de Bilimsel Kurul Üyesi olarak yer almaktadır. Her ne kadar son yıllarda apiterapi konusunda çalışmalar yapılsa da (Apiterapi, 2019) araştırmaların sayısı oldukça azdır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Arı ürünlerinin sağlığa olan faydaları bilinmesine rağmen ülkemizde halen yeterli sayıda apiterapi merkezi bulunmamaktadır. Ürünlerin Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ve Türk Standardları Enstitüsü talimatlarına uygunluğundan emin olunmalı, kontrolü yapılmış olmalıdır. Yapılan çalışmalar literatüre destek verici nitelikte olsa da araştırılması gereken daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Buna ek olarak, açılmış GETAT merkezlerine yenileri katılarak Türkiye çapında bitki flora zenginliklerinin takibi, bunlardan elde edilen arı ürünleri ve arı ırklarının kontrolünün bir arada yürütüldüğü interdisipliner bir çalışma alanı oluşturulmalıdır. Bu çalışmalarda çıkacak sonuçların hassasiyeti esasında arı yetiştiriciliğine kadar dayanmaktadır. Bu sebeple kovanların kullanımına dikkat edilmesi, arıların ekolojik çevresinin sürekli değiştirilmemesine özen gösterilmesi, arıların geleneksel yöntemlerin yanında bilimsel sonuçları da dikkate alması son derece önemlidir. Ayrıca arı ve arı ürünleri üzerine araştırmalar yapan akademisyenlerin de arılarıyla etkileşimli olarak çalışmalarını sürdürmeleri gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Apiterapi 2019. <https://apider.org/bilimsel-makaleler/> Erişim Tarihi: Temmuz 2019.
- Aydın Y, Tekeoğlu İ 2018. Tamamlayıcı tıp ve güncel apiterapi uygulamaları. J Biotechnol and Strategic Health Res. ;2(2):64-73.
- Broadman J 1962 . Bee, Venom-the natural curative for arthritis and rheumatism, GF Putnam and Sons, New York, NY.
- Brown R 1981. Beeswax. Bee books new and old. Burrowbridge, somerset.74s.
- Crane E 1990. Bees and Beekeeping. Science, practice and world resources. New York: Cornell University Pres, 593 pp.
- Crane E 1999. History of other products from bees .The World history of beekeeping and honeyhunting, Gerald Duckworth&CoLtd; London. 545-553.
- Çelik K, Aşgun HF 2016. Arılardan gelen sağlık “apiterapi”. apitherapy-project.eu/pdf/20160920/apitherapy-handbook-tr.pdf.
- D’epiro, Walsh N 1999. Bee venom for multiple sclerosis. Academic One File ,15 Sept.; p. 27.
- Echigo T, Takenaka T, Ichimura M 1973. Effects of chemical constituents in pollen on the process of honey formation. Bull. Fac. Agric., Tamagawa Uni., 13, 1-9.
- Garcia- Viguera C 1992. Composition of propolis from two different spanish regions. Z. Naturforsch. 47c, 634-637.
- Han X, Shen T, Lou H, 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance Int.J.Mol.Sci., 8:950-988.

- Hidaka S, Okamoto Y, Uchiyama S, Nakatsuma A, Hashimoto K, Ohnishi ST, Yamaguchi M 2006. Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model. *Ecam*. 3(3):339-348.
- Hilda MR 1937. The sacredbee in ancient times and folklore. Manufactured in the United States of America, Dover Publications, Inc., 31 East 2nd Street, Mineola, N.Y. 11501. Originally Published: London: George Hallen&Unwin, ISBN 0-486-43494-X.
- Ivanov T 1981. Glucose oxidase, catalase and proteolytic activity and enzyme inactivation in heated and preserved honey. *Zhivot. Nauki* 18 : 119-25.
- Kaftanoglu O, Tanyeli A 1997. The use of royal jelly during treatment of childhood malignancies. *International Conference on: Bee Product: Properties, Applications and Apitherapy* P: 51. Israel.
- Katı Y 2016. Gelneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları hakkında bilinmesi gereken güncel mevzuat bilgileri. *Ankara Akupunktur* 2016; 4 (1): 65-70.
- Kartal M, Kaya S, Kurucu S 2002. GC-MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.* 57c, 905-909.
- Krylov V, Agafonov A, Krivtsov N, Lebedev V, Burimistrova L, Oshevskii L, Sokolski S 2007. Theory and agents of apitherapy (in Russian). Moscow.
- Liu JR, Yang YC, Shi LS, Peng CC 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11447-11452.
- Maeda S, Mukai A, Kosugi N, Okada Y 1962. The flavonoid components of honey. *J. Food Sci. Technol.* 9(7), 270-274.
- Münstedt K, Zygmont M 2001. Propolis-current and future medical uses. *Am. Bee J.*, 141 (7), 507-510.
- Münstedt K, Bargello M, Hauenschild A 2009. Royal jelly reduces the serum glucose levels in healthy subjects. *Journal of Medicinal Food*. 12(5): 1170-1172.
- Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yukiyoshi A, Tachibana H, Yamada K 2007. Effect of royal jelly on bisphenol A induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2207; 71(1): 253-255.
- Premratanachai P, Chanchao C 2014. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 337-44. <http://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1262>.
- Sağlık 2019. <https://www.saglik.gov.tr/> Erişim Tarihi: Temmuz 2019.
- Sforcin JM 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(1), 1-14. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
- Sharma D 1980. Pollen morphology of two cultivars of *P. somniferum* L. *Current Science*, 49,710.
- Sharma JR, Singh OP 1983. Genetics and genetic improvement. In: *The Opium Poppy. Medicinal and Aromatic Plants Series 1*. Eds.: Akhtan-Husain and Sharma, J.R. CIMAP, Lucknow, India, 39-68.
- Sorkun K, Slier B, Salih B 2001. Determination of chemical composition of Turkish Propolis. *Z. Naturforsch.* 56c, 666 - 668 (2001); received January 1/February 23, 2001.
- Tomas-Barberan FA, Garcia-Viguera C, Vit-Oliver P, Ferreres F, Tomas-Lorente F 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191-196.
- Torre GLLa, Saita M, Vilasi F, Pelliciano T, Dugo G 2006. *Food Chem.* 94-640.
- White JW 1979. Jr. Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62, 509-14.
- Velikova M, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, Marcucci MC 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian Propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71, 693-696.
- Vick JA, Shipman WH, Brooks RH, Hasset CC 1972. Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of apamin, a component of bee venom. *Am. Bee J.* 112, 339.
- Zalewski W 1965. Fosfatazy w miodach. - *Pszczeln. Zesz. Nauk.* 9(1-2) : 1 - 34.
- Ziai MR, Russek S, Wang HC, Beer B, Blume AJ 1990. Mast cell degranulating peptide: a multi-functional neurotoxin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42(7), 457-460.

## Studies on anticholinesterase and antioxidant effects of samples from *Iris* L. genus of Turkish origin

Duygu Sevim\*, Bilge Şener

Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: duygusvm@gmail.com

### Abstract

The genus *Iris* L. (Iridaceae) is a member of geophytes with attractive flowers. There are about 56 *Iris* taxa growing in Turkey, 24 of which are endemic. A survey of the literature indicates that the research carried out on *Iris* species are focused on the flavonoid and volatile compounds of the plant.

In present study, the dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* taxa growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) which the enzymes linked to Alzheimer's diseases and antioxidant capacities using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test as well.

The *Iris* extracts studied have been found more active against BChE than AChE. compared with 100 µg/ml galanthamine (89.29 ± 0.96 %) as reference, *Iris kerneriana* (coded as Y122) and *Iris pseudacorus* (coded as Y131) methanol extracts had significant BChE inhibition effect (respectively, 80.22 ± 1.04 % and 53.06 ± 1.13 %) at concentration of 200 µg/ml. Among tested samples, methanol extracts of *I. kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have shown remarkable antioxidant activity at concentration of 2 mg/ml for DPPH compared with gallic acid.

**Keywords:** *Iris*, Anticholinesterase, Antioxidant, Activity

### INTRODUCTION

Turkey is an important gen centers for biodiversity and it is known that Turkey possesses approximately 1045 geophyte taxons are economically important such as *Colchicum*, *Fritillaria*, *Hyacinthus*, *Lilium*, *Nectaroscordum*, *Polygonatum*, *Tulipa* and *Iris* species (Kaya, 2014). Among them, genus *Iris* (family *Iridaceae*) is represented by 56 species in Turkey, of which 24 are endemic (Güner, 2012). *Iris* species have gained great popularity in the perfume and cosmetic industries due to their sweet fragrance alongwith their ornamental purposes (Orhan et al., 2002; Atta-ur-Rahman et al., 2004; Sevim, 2018). *Iris* species have been previously recognized as rich sources of secondary metabolites and used in the treatments of cancer, inflammation and bacterial and viral infections (Wang et al., 2010; Singab et al., 2016). Previous phytochemical investigations on the *Iris* species have resulted in the isolation of a variety of compounds including flavonoids, isoflavonoids, isoflavonoid glycosides, benzoquinones, triterpenoids and stilbene glycosides and essential oils (Orhan et al., 2002; 2003, Atta-ur-Rahman et al., 2002; 2003; 2004).

The aim of the present study was to investigate the antioxidant capacities and anticholinesterase activities of 47 *Iris* L. species growing in Turkey in order to evaluate their medicinal value and to point to an easily accessible source of natural antioxidants that could be used as a possible food supplement in addition to cosmetic, and perfume industries.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant Material

The rhizomes of *Iris* L. species were collected from different locations in Turkey given in Table 1. Their identification was confirmed by Prof. Dr. Neriman Ozhatay and Prof. Dr. Adil Güner and preserved as *ex-situ* at Atatürk Horticultural Central Research Institute, Department of Ornamental Plant Breeding and Agronomy in Yalova, Turkey.

**Table 1.** Population Number and Sample Codes of *Iris* Taxa

Sample Codes	Name of Taxa	Population Number
Y139	<i>Iris albicans</i> Lange	3505
Y103	<i>Iris aucheri</i> (Baker) Sealy	2105
Y111	<i>Iris bakeriana</i> Foster	4710
Y102	<i>Iris barnumiae</i> Foster & Baker	6507
Y112	<i>Iris caucasica</i> Hoffm. subsp. <i>caucasica</i>	2507
Y140	<i>Iris caucasica</i> Hoffm. subsp. <i>turcica</i> B. Mathew	2404
Y108	<i>Iris danfordiae</i> (Baker) Boiss. *	5104
Y119	<i>Iris elegantissima</i> Sosn.	3602
Y141	<i>Iris galatica</i> Siehe *	5201
Y113	<i>Iris gatesii</i> Foster	4702
Y115	<i>Iris germanica</i> L.	4802
Y114	<i>Iris germanica</i> L.	4605
Y142	<i>Iris histrio</i> Rchb. f.	2702
Y116	<i>Iris histrio</i> Rchb. f.	2704
Y117	<i>Iris histrioides</i> (G. F. Wilson) S. Arnott *	5304
Y120	<i>Iris junonia</i> Schott & Kotschy ex Schott *	0101
Y122	<i>Iris kerneriana</i> Ascherson & Sint. ex Baker *	3702
Y123	<i>Iris kirkwoodiae</i> Chaudhary	3106
Y124	<i>Iris lazica</i> Albov	5303
Y118	<i>Iris lycotis</i> Woron.	3001
Y126	<i>Iris masia</i> Dykes subsp. <i>masia</i>	6302
Y127	<i>Iris nectarifera</i> Güner var. <i>nectarifera</i> Güner *	4706
Y128	<i>Iris nezahataiae</i> Güner & H. Duman *	0802
Y129	<i>Iris orientalis</i> Miller	1001
Y130	<i>Iris pamphylica</i> Hedge *	0706
Y109	<i>Iris paradoxa</i> Steven f. <i>choschab</i>	6512
Y100	<i>Iris persica</i> L.	0201
Y131	<i>Iris pseudacorus</i> L.	3108
Y143	<i>Iris pseudacorus</i> L.	3405
Y101	<i>Iris pseudocaucaucasica</i> Grossh.	4406
Y110	<i>Iris pumila</i> L. subsp. <i>attica</i> (Boiss. & Heldr.)	1401
Y132	<i>Iris purpleobracteata</i> B. Mathew & T. Baytop *	5401
Y104	<i>Iris reticulata</i> M. Bieb var. <i>reticulata</i>	2403
Y107	<i>Iris sari</i> Schott ex Baker *	1802
Y134	<i>Iris schachtii</i> Markgraf *	1804
Y144	<i>Iris sibirica</i> L.	7503
Y133	<i>Iris sintenisii</i> Janka subsp. <i>sintenisii</i>	3406
Y145	<i>Iris sprengeri</i> Siehe *	6805
Y135	<i>Iris spuria</i> L. subsp. <i>musulmanica</i> (Fomin) Takht.	2408
Y106	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	7003
Y105	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	0702
Y147	<i>Iris stenophylla</i> Hausskn. ex Baker subsp. <i>stenophylla</i> *	7005
Y137	<i>Iris suaveolens</i> Boiss. & Reut.	3401
Y146	<i>Iris taochia</i> Woronow ex Grossh. *	2505
Y136	<i>Iris unguicularis</i> Poir. subsp. <i>carica</i> (Wern. Schulze) var. <i>carica</i> *	0708
Y148	<i>Iris urminensis</i> Hoog	6505
Y138	<i>Iris xanthospuria</i> B. Mathew & T. Baytop *	4813

\* Endemic taxa



## Preparation of Extracts

The washed with tap water, dried and powdered rhizomes (2 g) were extracted by maceration with dichloromethane at room temperature and concentrated under vacuum. Then residues were extracted by maceration with methanol and dried by rotary evaporator.

## Cholinesterase Inhibition Assays

Extracts were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory activity at 200 µg/ml using ELISA microplate reader. AChE and BChE inhibitory activity was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (Ellman et al., 1961). Electric eel AChE (Type-VI-S; EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1.8, Sigma, St. Louis, MO, USA) were the enzyme sources used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as the substrates of the reaction. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All reagents and conditions were same as described in our previous publication (Sevim et al., 2013). Galanthamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), the anticholinesterase alkaloid-type of drug obtained from the bulbs of *Galanthus* sp., was used as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

## Antioxidant Capacity Assay

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of the extracts was also tested at 2 mg/ml stock concentrations by ELISA microplate reader. It was measured by spectrophotometric method of Mardsen S. Blois which was modified by Hatano (Blois, 1958; Hatano, 1995). Gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was employed as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

## RESULTS

The *in vitro* antioxidant and anticholinesterase activities of dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* species collected from Turkey have reported for the first time in this study. Anticholinesterase activities and antioxidant capacities by using DPPH radical scavenging activity of dichloromethane and methanol extracts of *Iris* species were given in Table 2 and 3.

**Table 2.** AChE and BChE Inhibition (Inhibition % ± S.E.M.\*) and DPPH Radical Scavenging Activity of (Scavenging activity % ± S.E.M.) of The Dichloromethane Extracts of *Iris* Taxa

Codes of Extracts	Taxa	AChE Inhibition (% ± S.E.M.)	BChE Inhibition (% ± S.E.M.)	DPPH Radical Scavenging Activity (% ± S.E.M.)
		200 µg/ml <sup>a</sup>	200 µg/ml	2000 µg/ml <sup>b</sup>
Y100D	<i>Iris persica</i>	- **	10.46 ± 0.63	35.73 ± 1.88
Y101D	<i>Iris pseudocaucasica</i>	-	3.41 ± 1.05	29.35 ± 3.12
Y102D	<i>Iris barnumiae</i>	-	-	24.98 ± 1.70
Y103D	<i>Iris aucheri</i>	-	-	30.72 ± 0.61
Y104D	<i>Iris reticulata</i> var. <i>reticulata</i>	-	11.42 ± 0.85	11.51 ± 2.37
Y105D	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	7.76 ± 0.16	27.79 ± 0.93
Y106D	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	-	31.51 ± 2.80
Y107D	<i>Iris sari</i>	-	11.65 ± 0.26	23.99 ± 0.66
Y108D	<i>Iris danfordiae</i>	-	19.07 ± 3.20	8.21 ± 1.05
Y109D	<i>Iris paradoxa</i> f. <i>choschab</i>	-	15.05 ± 4.60	30.32 ± 1.88
Y110D	<i>Iris pumila</i> subsp. <i>attica</i>	-	5.62 ± 0.32	9.10 ± 0.53
Y111D	<i>Iris bakeriana</i>	7.81 ± 1.95	8.40 ± 0.19	19.56 ± 1.98
Y112D	<i>Iris caucasica</i> subsp. <i>caucasica</i>	-	9.60 ± 0.01	22.82 ± 1.47
Y113D	<i>Iris gatesii</i>	-	5.80 ± 0.74	15.05 ± 1.08
Y114D	<i>Iris germanica</i>	-	-	30.30 ± 0.94

Y115D	<i>Iris germanica</i>	-	-	22.38 ± 0.78
Y116D	<i>Iris histrio</i>	-	22.92 ± 1.29	14.89 ± 1.57
Y117D	<i>Iris histrioides</i>	-	17.07 ± 5.43	8.92 ± 0.87
Y118D	<i>Iris lycotis</i>	5.14 ± 0.81	7.78 ± 0.68	10.04 ± 1.82
Y119D	<i>Iris elegantissima</i>	11.74 ± 1.33	-	15.96 ± 2.33
Y120D	<i>Iris junonia</i>	-	-	15.15 ± 2.43
Y122D	<i>Iris kerneriana</i>	6.42 ± 1.89	-	25.52 ± 0.96
Y123D	<i>Iris kirkwoodiae</i>	-	1.76 ± 0.52	10.47 ± 2.68
Y124D	<i>Iris lazica</i>	-	4.47 ± 0.73	52.09 ± 2.46
Y126D	<i>Iris masia</i> subsp. <i>masia</i>	6.99 ± 0.56	-	12.41 ± 1.23
Y127D	<i>Iris nectarifera</i> var. <i>nectarifera</i>	-	1.94 ± 0.73	29.28 ± 2.20
Y128D	<i>Iris nezahatiae</i>	-	-	7.49 ± 2.90
Y129D	<i>Iris orientalis</i>	-	-	10.94 ± 3.79
Y130D	<i>Iris pamphylica</i>	-	9.72 ± 0.18	21.58 ± 0.82
Y131D	<i>Iris pseudacorus</i>	-	5.18 ± 0.18	30.36 ± 1.62
Y132D	<i>Iris purpureobractea</i>	-	-	57.91 ± 3.20
Y133D	<i>Iris sintenisii</i> subsp. <i>sintenisii</i>	-	10.34 ± 1.08	12.69 ± 1.23
Y134D	<i>Iris schachtii</i>	-	-	7.99 ± 1.88
Y135D	<i>Iris spuria</i> subsp. <i>musulmanica</i>	-	1.34 ± 0.55	11.41 ± 2.99
Y136D	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>carica</i> var. <i>carica</i>	-	10.58 ± 0.26	23.13 ± 1.02
Y137D	<i>Iris suaveolens</i>	11.22 ± 0.99	6.18 ± 0.08	22.22 ± 0.63
Y138D	<i>Iris xanthospuria</i>	-	-	14.46 ± 1.26
Y139D	<i>Iris albicans</i>	-	-	4.76 ± 1.10
Y140D	<i>Iris caucasica</i> subsp. <i>turcica</i>	-	-	13.22 ± 1.37
Y141D	<i>Iris galatica</i>	-	14.51 ± 1.74	24.15 ± 1.86
Y142D	<i>Iris histrio</i>	13.49 ± 0.48	13.21 ± 0.87	9.89 ± 1.02
Y143D	<i>Iris pseudacorus</i>	8.41 ± 3.32	40.44 ± 0.12	63.46 ± 2.25
Y144D	<i>Iris sibirica</i>	-	6.39 ± 0.12	3.01 ± 2.20
Y145D	<i>Iris sprengeri</i>	-	3.95 ± 2.16	11.71 ± 0.89
Y146D	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	4.45 ± 0.56	32.70 ± 0.34
Y147D	<i>Iris taochia</i>	-	3.25 ± 2.26	7.87 ± 0.41
Y148D	<i>Iris urminensis</i>	-	-	21.19 ± 0.96
References				
Galanthamine	100 µg/ml	94.58 ± 0.82	89.29 ± 0.96	NT
Gallic acid	2000 µg/ml	NT ***	NT	91.56 ± 0.68

\* Standard error mean (n=3), \*\* No activity, \*\*\* Not tested, <sup>a</sup> Final concentration, <sup>b</sup> Stock concentration, D: Dichloromethane

**Table 3.** AChE and BChE Inhibition (Inhibition % ± S.E.M.\*) and DPPH Radical Scavenging Activity of (Scavenging activity % ± S.E.M.) of The Methanol Extracts of *Iris* Taxa

Codes of Extracts	Taxa	AChE Inhibition (% ± S.E.M.)	BChE Inhibition (% ± S.E.M.)	DPPH Radical Scavenging Activity (% ± S.E.M.)
		200 µg/ml ***	200 µg/ml	2000 µg/ml
Y100M	<i>Iris persica</i>	- **	7.53 ± 1.45	4.79 ± 1.84
Y101M	<i>Iris pseudocaucasica</i>	-	10.84 ± 1.06	7.51 ± 0.96
Y102M	<i>Iris barnumiae</i>	-	2.54 ± 0.84	65.28 ± 1.77
Y103M	<i>Iris aucheri</i>	-	14.07 ± 2.20	12.57 ± 0.68
Y104M	<i>Iris reticulata</i> var. <i>reticulata</i>	-	9.28 ± 1.17	4.84 ± 2.10
Y105M	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	15.96 ± 2.68	8.55 ± 2.37
Y106M	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	6.52 ± 1.48	5.04 ± 0.48
Y107M	<i>Iris sari</i>	-	15.36 ± 1.61	40.26 ± 0.70
Y108M	<i>Iris danfordiae</i>	-	19.81 ± 0.84	3.55 ± 1.27
Y109M	<i>Iris paradoxa</i> f. <i>choschab</i>	-	-	39.50 ± 2.69

Y110M	<i>Iris pumila</i> subsp. <i>attica</i>	-	23.23 ± 4.25	12.99 ± 2.52
Y111M	<i>Iris bakeriana</i>	-	37.63 ± 0.02	9.26 ± 0.66
Y112M	<i>Iris caucasica</i> subsp. <i>caucasica</i>	-	4.06 ± 0.41	7.71 ± 0.73
Y113M	<i>Iris gatesii</i>	-	17.02 ± 2.82	55.49 ± 1.34
Y114M	<i>Iris germanica</i>	-	-	15.58 ± 1.46
Y115M	<i>Iris germanica</i>	-	16.64 ± 3.74	21.90 ± 1.44
Y116M	<i>Iris histrio</i>	-	12.92 ± 1.47	5.15 ± 0.55
Y117M	<i>Iris histrioides</i>	-	4.19 ± 0.58	2.42 ± 0.66
Y118M	<i>Iris lycotis</i>	-	22.41 ± 1.39	37.70 ± 2.91
Y119M	<i>Iris elegantissima</i>	-	12.22 ± 2.63	42.33 ± 2.89
Y120M	<i>Iris junonia</i>	-	10.57 ± 2.51	24.26 ± 0.74
Y122M	<i>Iris kerneriana</i>	<b>40.40 ± 3.30</b>	<b>80.22 ± 1.04</b>	<b>91.33 ± 0.05</b>
Y123M	<i>Iris kirkwoodiae</i>	-	10.73 ± 3.17	44.85 ± 2.42
Y124M	<i>Iris lazica</i>	-	15.37 ± 4.09	<b>90.42 ± 0.40</b>
Y126M	<i>Iris masia</i> subsp. <i>masia</i>	-	28.40 ± 1.34	29.45 ± 1.46
Y127M	<i>Iris nectarifera</i> var. <i>nectarifera</i>	-	2.98 ± 1.49	44.68 ± 1.36
Y128M	<i>Iris nezahatiae</i>	-	3.26 ± 1.75	2.58 ± 0.66
Y129M	<i>Iris orientalis</i>	-	7.12 ± 1.62	7.25 ± 1.16
Y130M	<i>Iris pamphylica</i>	-	13.03 ± 0.51	4.92 ± 0.21
Y131M	<i>Iris pseudacorus</i>	9.89 ± 0.52	<b>53.06 ± 1.13</b>	<b>91.61 ± 0.58</b>
Y132M	<i>Iris purpureobractea</i>	-	6.40 ± 3.38	9.54 ± 0.19
Y133M	<i>Iris sintenisii</i> subsp. <i>sintenisii</i>	-	22.00 ± 2.20	12.44 ± 1.27
Y134M	<i>Iris schachtii</i>	-	3.45 ± 1.91	41.35 ± 0.39
Y135M	<i>Iris spuria</i> subsp. <i>musulmanica</i>	-	-	8.20 ± 0.22
Y136M	<i>Iris unguicularis</i> subsp. <i>carica</i> var. <i>carica</i>	-	-	55.72 ± 1.09
Y137M	<i>Iris suaveolens</i>	-	-	<b>84.31 ± 0.63</b>
Y138M	<i>Iris xanthospuria</i>	-	6.33 ± 0.46	5.67 ± 1.55
Y139M	<i>Iris albicans</i>	-	11.13 ± 1.47	12.28 ± 1.07
Y140M	<i>Iris caucasica</i> subsp. <i>turcica</i>	-	4.28 ± 0.26	12.92 ± 0.28
Y141M	<i>Iris galatica</i>	-	1.93 ± 0.10	11.98 ± 0.47
Y142M	<i>Iris histrio</i>	1.43 ± 0.43	6.36 ± 0.98	5.68 ± 0.79
Y143M	<i>Iris pseudacorus</i>	22.56 ± 1.86	5.86 ± 2.71	64.02 ± 14.37
Y144M	<i>Iris sibirica</i>	-	16.92 ± 1.76	13.43 ± 3.33
Y145M	<i>Iris sprengeri</i>	-	5.13 ± 0.49	16.69 ± 1.99
Y146M	<i>Iris stenophylla</i> subsp. <i>stenophylla</i>	-	2.34 ± 1.16	14.65 ± 1.73
Y147M	<i>Iris taochia</i>	-	8.06 ± 0.93	9.90 ± 0.06
Y148M	<i>Iris urminensis</i>	-	4.72 ± 2.22	52.05 ± 1.90
References				
Galanthamine	100 µg/ml	94.58 ± 0.82	89.29 ± 0.96	NT
Gallic acid	2000 µg/ml	NT ***	NT	91.56 ± 0.68

\* Standard error mean (n=3), \*\* No activity, \*\*\* Not tested, <sup>a</sup> Final concentration, <sup>b</sup> Stock concentration, M: Methanol

## DISCUSSION

Oxidative stress is known to play an important role in pathogenesis of several diseases such as diabetes mellitus and neurodegenerative disorders (Howes ve ark., 2003; Sevim, 2018). On the other hand, one of the hypothesis that has been proposed to restrain the cholinergic function is the inhibition of AChE and BChE for the elevation of acetylcholine level for treatment of AD. Depends on side effects of available drugs used for AD have resulted in continuing our researches to determine AChE inhibitors from geophytes.

During this extensive study, the extracts of 47 *Iris* taxa have been screened for their antioxidant and anticholinesterase effects due to their rich phenolic compounds. From these species, *Iris kerneriana* and *I. pseudacorus* have been found the highest BChE inhibitory effects. In the previous researches on the anticholinesterase activity of *I. suaveolens*, *I. albicans* and *I. schachtii* were also shown low activity against

AChE and BChE (Hacıbekiroğlu ve Kolak, 2011; 2015; Mocan ve ark., 2018). In regarding radical scavenging effect of *Iris kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have been determined above 90 % as similar standard compound used as gallic acid. These results indicated that the highest antioxidant activity was exhibited for methanolic extracts contained polar compounds.

## CONCLUSION

*Iris* species are cultivated on a commercial scale as ornamental plants. In this study, the dichloromethane and methanol extracts prepared from the rhizomes of 47 *Iris* taxa growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) which the enzymes linked to Alzheimer's diseases and also antioxidant capacities using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging test. The samples have been found more active against BChE than AChE. Compared with 100 µg/ml galanthamine (89.29 ± 0.96 %) as reference, *Iris kerneriana* (coded as Y122) and *Iris pseudacorus* (coded as Y131) methanol extracts had significant BChE inhibition effect (respectively, 80.22 ± 1.04 % and 53.06 ± 1.13 %) at concentration of 200 µg/ml (Table 3). In addition, methanol extracts of *I. kerneriana*, *I. lazica*, *I. pseudacorus* and *I. suaveolens* have shown remarkable antioxidant activity at concentration of 2 mg/ml for DPPH compared with gallic acid (Table 3.). Therefore, the aforementioned *Iris* species have been deserved further searches for their high BChE inhibition and antioxidant potential.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Turkish Scientific and Technological Research Council (TÜBİTAK) for financial source (Project code: KAMAG-110G007) was kindly acknowledged.

## REFERENCES

- Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Jahan IA, Sener B, Orhan I, Choudhary MI 2002. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50(8): 1100-1102.
- Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Orhan I, Sener B, Ayanoğlu F, Choudhary MI 2003. Isoflavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris germanica*. Helvetica Chimica Acta, 86: 3354-3362.
- Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Sener B, Orhan I, Ayanoğlu F, Choudhary MI 2004. Two new isoflavonoids from the rhizomes of *Iris soforana*, Natural Product Research, 18(5): 465-471.
- Blois MS 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181: 1119-1200.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2): 88-95.
- Güner A, 2012. *Iris* L. In: Güner A, Aslan S, Vural M, Babaş MT (eds), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanic Garden and Floristic Research Society, pp. 535-540.
- Hacıbekiroğlu I, Kolak U 2011. Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. Phytotherapy Research, 25: 522-529.
- Hacıbekiroğlu I, Kolak U 2015. Screening antioxidant and anticholinesterase potential of *Iris albicans* extracts. Arabian Journal of Chemistry, 8: 264-268.
- Hatano T 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species – Tannins and related polyphenols. Nature Medicine, 49(4): 357-363.
- Howes MJR, Houghton PJ, Perry NSL 2003. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Phytotherapy Research, 17: 1-18.
- Kaya E 2014. Geophytes of Turkey. Yalova: Atatürk Central Horticultural Research Institute, pp. 1-96.
- Mocan A, Zengin G, Mollica A, Uysal A, Gunes E, Crisan G, Aktumsek A 2018. Biological effects and chemical characterization of *Iris schachtii* Markgr. extracts - A new source of bioactive constituents. Food and Chemical Toxicology, 112: 448-457.
- Orhan I, Şener B, Hashimoto T, Asakawa Y, Özgüven M, Ayanoğlu F 2002. Iristectorone K, a novel monocyclic triterpene ester from *Iris germanica* rhizomes growing in Turkey. Fitoterapia, 73: 316-319.
- Orhan I, Nasim S, Şener B, Ayanoğlu F, Özgüven M, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman 2003. Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. Phytotherapy Research, 17: 575-577.
- Sevim D, Senol FS, Gulpinar AR, Erdogan Orhan I, Kaya E, Kartal M, Sener B 2013. Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. Industrial Crops and Products, 49: 240-246.

- Sevim D 2018. Pharmacognosic studies on some *Iris* L. species. Ph. D. Thesis, Ankara: Gazi Ü niversity Institute of Health Sciences, pp. 1-219.
- Singab ANB, Ayoub IM, El-Shazyl M, Korinek M, Wu T, Cheng Y, Chang F, Wu Y 2016. Shedding the light on Iridaceae - Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 92: 308-335.
- Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Hussain A, Ahmad S, Imran M, Zeb A 2016. Phenolic, flavonoid contents, anticholinesterase and antioxidant evaluation of *Iris germanica* var. *florentina*. *Natural Product Research*, 30(12): 1440-1444.
- Wang H, Cui Y, Zhao C 2010. Flavonoids of the genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10: 643-661.

DRAFT

## Isolation and identification of cholinesterase inhibitors from the bulbs of *Iris pseudacorus* L.

Duygu Sevim\*, Bilge Şener

Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Ankara, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: duygusvm@gmail.com

### Abstract

Most of the bulbous plants are known for their medicinal purposes in addition to their ornamental value. Turkey is one of the home country of many beautiful bulbous plants. In continuation of our extensive studies on finding new natural cholinesterase inhibitors from Turkish medicinal plants, *Iris* L. species were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects designed to assess cholinesterase inhibitor activities on both acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and antioxidant capacities with respect to their neuroprotective potential in this study.

The dichloromethane and methanol extracts prepared from the bulbs of 47 *Iris* taxa were screened by using modified Ellmann method and the highest butyrylcholinesterase inhibitory effect was found in the methanol extract of the bulbs of *Iris pseudacorus* L. The dichloromethane sub-extract, which is obtained bioactivity-guided fractionation of methanol extract of *I. pseudacorus* L., was exhibited significant butyrylcholinesterase inhibitory activity ( $73.65 \pm 2.06$  %). These active sub-extract was subjected to fractionation on column chromatography and obtained six fractions. Among the fractions, coded as N5 was shown the significant butyrylcholinesterase inhibitory activity ( $93.78 \pm 1.49$  %) compared with galanthamine ( $80.02 \pm 0.12$  %). Fractionation of N5 on flash chromatography the highest butyrylcholinesterase inhibitory activity of sub-fraction coded as DS-5 was determined as  $94.00 \pm 1.03$  %. The responsible compound from the activity of this sub-fraction was detected as irisolidone glucopyranoside based on its mass data by using LC-ESI-Q/TOF-MS-MS technique.

**Keywords:** *Iris pseudacorus* L., Iridaceae, Activity, Anticholinesterase

### INTRODUCTION

The genus *Iris* L. (Iridaceae) is a member of geophytes with attractive flowers. There are about 56 *Iris* taxa growing in Turkey, 24 of which are endemic (Güner, 2012). *Iris* species are an important plants as an ornamental due to their different colours and attractive flowers (Orhan et al., 2002; Atta-ur-Rahman et al., 2004; Wang et al., 2010); they have also evaluated in the preparation of products as an violet odour from their rhizomes in perfumery and cosmetic industries (Sevim, 2018). Besides, *Iris* species were reported to be utilized for the treatment of different ailments in traditional medicine as an anticholinesterase, antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, antiinflammatory, hepatoprotective, molluscicidal and cytotoxic effects depends on variety of secondary metabolites (Wang et al., 2010; Singab et al., 2016). Alzheimer's disease (AD) is one of the neurodegenerative disorder affecting the elder people (Howes ve ark., 2003). One of the main approaches has been for the control of AD is the inhibition of acetylcholinesterase and butrylcholinesterase for the elevation of acetylcholine level secreted from synaptic region in brain to restrain the cholinergic function related with memory loss. Currently, clinically available drugs are used for the treatment of AD. Continuing our researches in the field of anticholinesterase activity, we herein aimed to determine butyrylcholinesterase inhibitory activity of *Iris pseudacorus* L. showed the highest inhibitory activity *Iris* L. species.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant Material

The rhizomes of *Iris pseudacorus* L. were collected from Hatay province and identified by Prof. Dr. Neriman Ozhatay and Prof. Dr. Adil Güner and preserved as *ex-situ* at Atatürk Horticultural Central Research Institute, Department of Ornamental Plant Breeding and Agronomy in Yalova, Turkey (population no. 3108).

## Preparation of Extracts

The washed with tap water, dried and powdered rhizomes (350 g) were extracted with methanol at room temperature by maceration. The combined methanolic extracts were evaporated *in vacuo* and obtained as 87.75 g extract (D18RM).

## Cholinesterase Inhibition Assay

Extracts were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory activity at 200 µg/ml using ELISA microplate reader. AChE and BChE inhibitory activity was measured by slightly modified spectrophotometric method of Ellman et al. (Ellman et al., 1961). Electric eel AChE (Type-VI-S; EC 3.1.1.7, Sigma, St. Louis, MO, USA) and horse serum BChE (EC 3.1.1.8, Sigma, St. Louis, MO, USA) were the enzyme sources used, while acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) were employed as the substrates of the reaction. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic)acid (DTNB; Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for the measurement of the anticholinesterase activity. All reagents and conditions were same as described in our previous publication (Sevim et al., 2013). Galanthamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), the anticholinesterase alkaloid-type of drug obtained from the bulbs of *Galanthus* sp., was used as the reference. The measurements and calculations were evaluated by using Softmax PRO 4.3.2.LS software (Sunnyvale, CA, USA). Experiments were run in triplicate and the results were expressed as average values with S.E.M.

## Bioactivity-guided Fractionation

The dried methanolic extract (85 g) was diluted with distilled water-methanol mixture (50:450) and extracted with hexane (D18RM-H). After hexane extraction, the residue has extracted with dichloromethane (D18RM-D), ethylacetate (D18RM-E), *n*-butanol (D18RM-B) and water (D18RM-W).

## Column Chromatography

The active dichloromethane extract (D18RM-D) was subjected on column chromatography using silica gel 60 (63-200 µm, Merck) and dichloromethane-methanol to obtain six main fractions (N1-N6). Among them, sub-fraction (N5) was applied on flash chromatography (Combi flash EZ prep) on normal phase silica gel (Silica 12 g gold) collected five sub-fractions (DS-1-DS-5).

## LC-ESI-Q/TOF-MS-MS Analysis

The LC-UV equipment used was an Agilent 1260 system with vacuum degasser, binary pump, autosampler, thermostated column compartment and ultraviolet detector (Agilent Corporation, Palo Alto, CA, USA). The chromatographic separation was performed at 40°C on an Agilent Poroshell 120 SB-C18 column (4,6 mm x 150 mm x 2,7 µm) with a flow rate of 0.6 ml/min and the injection volume was 5 µl. The mobile phase consisted of 0.1 % formic acid (A) and acetonitrile (B), the gradient program was optimized as follows: 0-2 min, 5% B; 2-5 min, 20% B; 5-15 min, 50% B; 15-17 min, 50% B; 17-22 min 95% B; 22-26 min, 95% B, 26-32 min, 5% B. Samples were detected at 254 nm.

LC-ESI-Q/TOF-MS-MS analyses was performed by an Agilent series 1260 Infinity instrument coupled with an Agilent 6550 iFunnel Q/TOF mass spectrometer (Agilent Corporation, Palo Alto, CA, USA) equipped with an ESI ion source as interface. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid-water and acetonitrile was used. The gradient program and detection wavelength were the same with LC-UV detection system. The mass spectra were acquired across the range of *m/z* 100-1000 (for MS) and *m/z* 50-500 (for MS-MS) in positive mode. The operating parameters of mass spectrometer were as follows: drying gas flow rate 14 L/min; drying gas temperature, 290°C, nebulizer, 40 psi; capillary voltage, 3500 V; fragment voltage, 400 V; skimmer voltage, 65 V and Oct RFV, 750 V. The collision energy was set at 10, 20 and 40 V. All MS data were controlled by MassHunter software B.06.01 (Data Acquisition) and B.07.00 (Qualitative Analysis).

## RESULTS

### Cholinesterase Inhibition Results

Although none of the extracts, sub-extracts and fractions had significant activity against AChE, methanol extract (D18RM) had shown moderate BChE inhibitory activity ( $53.06 \pm 1.13$  % at 200  $\mu\text{g/ml}$ ) against the standard alkaloid galanthamine. The BChE inhibitions of the sub-extracts obtained from methanolic extract by using liquid-liquid chromatography were given in Table 1.

**Table 1.** BChE inhibitory effects of the sub-extracts of *Iris pseudacorus* L.

Sub-Extracts	Codes	BChE Inhibition (Inhibition % $\pm$ S.D*)
		200 $\mu\text{g/ml}$
<i>n</i> -Hexane	D18RM-H	$23,48 \pm 1,97$
Dichloromethane	D18RM-D	<b><math>73,65 \pm 2,06</math></b>
Ethylacetate	D18RM-E	$49,78 \pm 2,85$
<i>n</i> -Butanol	D18RM-B	$19,71 \pm 0,54$
Water	D18RM-W	$41,26 \pm 2,67$
Galanthamine		$80,02 \pm 0,12$

\* Values are expressed as mean  $\pm$  S.D are three parallel assays

The highest BChE inhibitory activity had determined in dichloromethane sub-extract. Therefore, this sub-fraction (D18RM-D) was subjected to column chromatography to obtain 120 fractions, after the combination of similar fractions, 6 main fractions coded as N1-N6 were collected (Table 2).

**Table 2.** The main fractions of the dichloromethane (D18RM-D) sub-extract *Iris pseudacorus* L.

Solvent systems	Fractions
Dichloromethane (%100)	(N1) Fractions 1-5
Dichloromethane : Methanol (99:1)	(N2) Fractions 6-20
Dichloromethane : Methanol (90:10)	(N3) Fractions 21-50
Dichloromethane : Methanol (85:15)	(N4) Fractions 51-58
Dichloromethane : Methanol (80:20)	(N5) Fractions 59-73
Dichloromethane : Methanol (60:40)	(N6) Fractions 74-120
Methanol (%100)	

The BChE inhibitory activities of these main fractions were presented in Table 3.

**Table 3.** BChE inhibitory effects of the sub-extracts of *Iris pseudacorus* L.

Fractions	BChE Inhibition (Inhibition % $\pm$ S.D*)
	200 $\mu\text{g/ml}$
D18RM (Methanol extract)	$53.06 \pm 1.13$
D18RM-D (Dichloromethane sub-extract)	<b><math>73.65 \pm 2.06</math></b>
N1	$10.35 \pm 0.01$
N2	$67.66 \pm 0.48$
N3	$52.26 \pm 2.64$
N4	$56.84 \pm 1.52$
N5	<b><math>93.78 \pm 1.49</math></b>
N6	$77.15 \pm 3.12$
Galanthamine	$80.02 \pm 0.12$

\* Values are expressed as mean  $\pm$  S.D are three parallel assays

The main fraction coded as N-5 exerted the highest BChE inhibition ( $93.78 \pm 1.49$ ) which was comparable to that of the standard (galanthamine). After the fractionation of N-5 by using flash chromatography, five sub-fractions (DS-1, DS-2, DS-3, DS-4 and DS-5) were isolated and the sub-fraction DS-5 was shown the highest BChE inhibition ( $94.00 \pm 1.03$ ) which had a closer value to that of the main fraction N-5. The BChE inhibitory activities of these fractions alongwith the sub-fractions were given in Table 4.

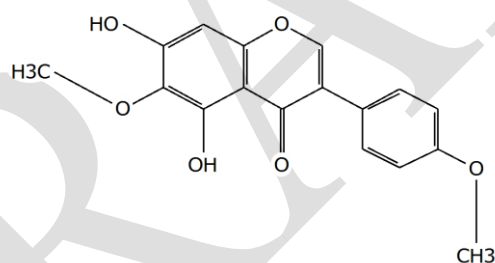


**Table 4.** BChE inhibitory effects of the sub-fractions isolated from the main fraction of N-5.

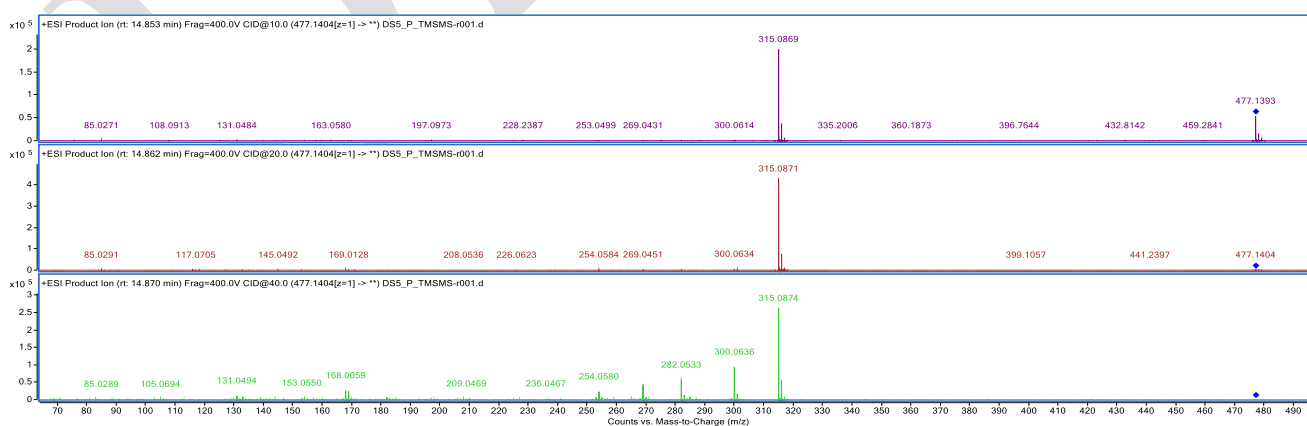
Extract, sub-extract, main fraction and sub-fractions	BChE Inhibition (Inhibition % ± S.D*) 200 µg/ml
D18RM (Extract)	53.06 ± 1.13
D18RM-D (Sub-extract)	73.65 ± 2.06
N-5 (Main fraction)	<b>93.78 ± 1.49</b>
DS-1	20.87 ± 1.95
DS-2	19.29 ± 3.39
DS-3	22.47 ± 3.40
DS-4	20.85 ± 4.91
DS-5	<b>94.00 ± 1.03</b>
Galanthamine	80.02 ± 0.12

\* Values are expressed as mean ± S.D are three parallel assays

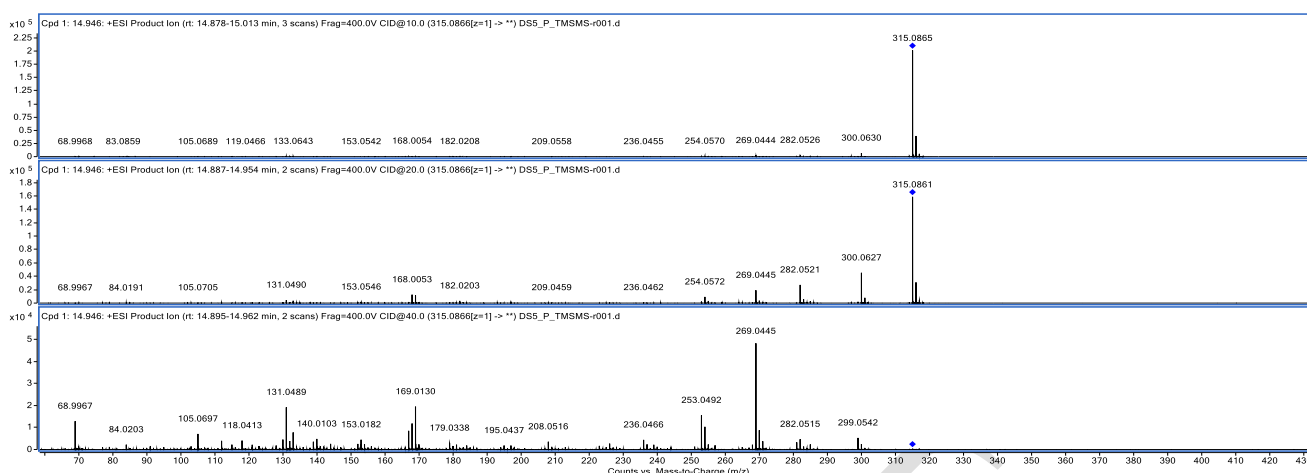
The responsible BChE inhibitory active compound of *Iris pseudacorus* L., which obtained from sub-fraction coded as DS-5, was analyzed by liquid chromatography-electron spray ionization-quadrupole/time-of-flight-mass spectrometry-mass spectrometry (LC-ESI-Q/TOF-MS-MS) and molecular ions at  $[M+1]^+$  477 and  $[M+1]^+$  315 were indicated (Spectrum 1 and 2). According to mass fragmentation pattern of  $[M+1]^+$  315; 300, 282 and 269 ions were obtained and the comparison of the data given in literature (Schütz ve ark., 2011; Xie ve ark., 2014; Bhat ve ark., 2014), this ion was determined as ‘Irisolidone’ (Figure 1). On the other hand, the mass fragmentation pattern of  $[M+1]^+$  477 were given 315 and 163 ions belonged to irisolidone and glucose. These findings were also confirmed with the data given in previous studies (Schütz ve ark., 2011; Xie ve ark., 2014; Bhat ve ark., 2014) and established as “Irisolidone glucopyranoside”.



**Figure 1.** Irisolidone



**Spectrum 1.** Mass fragmentation of  $[M+1]^+$  477 (irisolidone glucopyranoside)



**Spectrum 2.** Mass fragmentation of [M +1]<sup>+</sup> 315 (irisolidone)

## CONCLUSIONS

Discoveries of lead compounds for the development of new drug candidates from bioresources can help to promote incentives for conservation by providing an economic return to innovative use of those sources. Screening of natural sources has had an impressive tool of determining active agents. The key to successfully discovering therapeutic agents from bioresources is based on bioassay-directed isolation techniques. HTS tests and mechanism-based screening protocols as well as information of folkloric utilization of plants have led to the discovery of lead compounds as drug candidates.

In this study, *Iris* L. species belonged to ornamental geophytes growing in Turkey were investigated for their *in vitro* cholinesterase inhibitory effects and antioxidant capacities. The dichloromethane and methanol extracts prepared from the bulbs of 47 *Iris* species were screened by using modified Ellmann method and the highest butyrylcholinesterase inhibitory effect was found in the dichloromethane extract of the bulbs of *I. pseudacorus* L. According to bioassay-guided fractionation procedure, the active dichloromethane extract was subjected to fractionation on column and flash chromatographies and the activities of the fractions were tested. The determined active fraction was analyzed by using LC-ESI-Q/TOF-MS-MS technique. The responsible compound from the activity of this fraction was detected as irisolidone glucopyranoside as an isoflavonoid derivatives based on their mass data. Further studies should be performed to determine *in vivo* studies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Turkish Scientific and Technological Research Council (TÜBİTAK) for financial source (Project code: KAMAG-110G007) was kindly acknowledged.

## REFERENCES

- Atta-ur-Rahman, Nasim S, Baig I, Sener B, Orhan I, Ayanoğlu F, Choudhary MI 2004. Two new isoflavonoids from the rhizomes of *Iris soforana*, Natural Product Research, 18(5): 465-471.
- Bhat G, Shahl AS, Shah Z, Tantry M 2014. HPLC-DAD-ESI-MS/MS Identification and characterization of major constituents of *Iris crocea*, *Iris germanica* and *Iris spuria* L. growing in Kashmir Himalayas, India. Journal of Analytical and Bioanalytical Analyses: 5(6), 1-10.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7(2): 88-95.
- Güner A, 2012. *Iris* L. In: Güner A, Aslan S, Vural M, Babaş MT (eds), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanic Garden and Floristic Research Society, pp. 535-540.
- Howes MJR, Houghton PJ, Perry NSL 2003. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. Phytotherapy Research, 17: 1-18.
- Orhan I, Nasim S, Şener B, Ayanoğlu F, Özgüven M, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman 2003. Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. Phytotherapy Research, 17: 575-577.
- Schütz C, Quitschau M, Hamburger M, Potterat O 2011. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC-PDA-MS analysis. Fitoterapia, 82: 1021-1026.

- Sevim D, Senol FS, Gulpinar AR, Erdogan Orhan I, Kaya E, Kartal M, Sener B 2013. Discovery of potent *in vitro* neuroprotective effect of the seed extracts from seven *Paeonia* L. (peony) taxa and their fatty acid composition. *Industrial Crops and Products*, 49: 240-246.
- Sevim D 2018. Pharmacognosic studies on some *Iris* L. species. Ph. D. Thesis, Ankara: Gazi University Institute of Health Sciences, pp. 1-219.
- Singab ANB, Ayoub IM, El-Shazyl M, Korinek M, Wu T, Cheng Y, Chang F, Wu Y 2016. Shedding the light on Iridaceae - Ethnobotany, phytochemistry and biological activity. *Industrial Crops and Products*, 92: 308-335.
- Şener B, Orhan İ 2003. Alzheimer hastalığının tedavisinde geliştirilen bileşikler. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, 16(1): 3-8.
- Xie G, Zhu Y, Shu P, Qin X, Wu G, Wang Q, Qin M 2014. Phenolic metabolite profiles and antioxidants assay of three Iridaceae medicinal plants for traditional Chinese medicine 'She-gan' by on-line HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-Q-TOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98: 40-51.
- Wang H, Cui Y, Zhao C 2010. Flavonoids of the genus *Iris* (Iridaceae). *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10: 643-661.

DRAFT

## Sign of folic acid targeted pH-sensitive magnetic nanocarriers

Zeynep Cimen\*, Gokcen Birlik Demirel\*

Ankara Hacı Bayram Veli University, Polatlı Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry,  
Ankara, Turkey.

### Abstract

In this study, a new pH-triggered and folic acid-targeted hybrid nanocarrier system based on a core/shell nanoparticle system was synthesized. The core/shell hybrid nanoparticle contains a magnetic core ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$ ) which is surrounded by pH-triggered (PLH-PEG) and FA-Targeted (FA-PEG) polymer shells. The antitumor drug, doxorubicin (DOX), was loaded in the cores of the hybrid nanoparticles. The synthesized hybrid nanoparticles were characterized using DLS, TEM, BET and Zeta-potential measurements. DOX loading and release efficiencies of the nanoparticles were examined in different pH values in a function of time using Fluorescence Spectroscopy. The cytotoxicity of the hybrid nanoparticles was examined using the human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7). The hybrid nanoparticles were demonstrated very efficient controlled drug release profile under acidic environments. As a result, the hybrid nanocarriers exhibited potential applications in targeted/pH-control drug release for cancer treatment.

**Keywords:** cancer, magnetic hybrid nanoparticles, drug delivery, pH response

\*The authors are equally contributed.

### INTRODUCTION

Cancer disease and cancer-related deaths are rapidly increasing worldwide<sup>1</sup>. Although chemotherapy has so many disadvantages, it is still the most used treatment method<sup>2</sup>. The main problem of chemotherapy is that it is a non-targeted treatment method and also it has many side effects. For this purpose, researchers are trying to development of new materials to overcome these problems. In recently, nanobased drug delivery systems such as liposomes, dendrimers, inorganic, polymeric, core/shell nanoparticles have been developed<sup>3</sup> to fabricate personalized drug delivery systems. In particular, stimuli-responsive and tumor targeted multifunctional drug delivery systems have gained tremendous importance<sup>4</sup>. Core/shell nanoparticles are the most attractive materials for multifunctional drug delivery applications due to their unique properties such as higher biocompatibility, lower cytotoxicity, controlled and targeted drug delivery<sup>5</sup>. Core/shell nanoparticle is a nanocomposite system which is a combination of core (inner material) and shell (outer material). Core/shell nanoparticle systems could be composed of such as inorganic core /inorganic shell, inorganic core /organic shell, organic core /inorganic shell and organic core /organic shell<sup>6</sup>. Magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles are used as a core material of core/shell nanoparticle because of the providing magnetically targeted delivery and magnetic resonance imaging (MRI) properties<sup>7,8</sup>. However, it is known that the drug loading efficiency, stability, and biodegradability of iron oxide nanoparticles are insufficient<sup>9</sup>. For these reasons, various materials including silica/mesoporous silica and synthetic and natural polymers are utilized for the surface coating materials to solve these problems<sup>10</sup>. Furthermore, stimuli-responsive polymers and targeting molecules can be integrated into the core/shell systems to provide the controlled and targeted release. Stimuli-sensitive polymers are stimulated by external stimuli such as pH, light, magnetic, temperature<sup>11</sup> and they exhibit the stimuli-triggered delivery. pH-sensitive polymers have been extensively studied in cancer treatment applications due to the effect of pH-differences between the tumor tissues (pH= 5.5-6.8) and healthy tissues (pH=7.4)<sup>12</sup>. pH-stimuli polymers provide the controlled delivery of drug molecules via different mechanisms such as hydrophilic to hydrophobic transition, conformational change, cleavage of the acid sensitive bond<sup>13</sup>. For example, Yang and coworkers have developed a magnetic and pH-sensitive core/shell drug delivery nanosystem consisting of  $\beta$ -thiopropionatepoly(ethylene glycol)-modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$  nanoparticles. They showed the pH-triggered drug delivery due to the hydrolysis of  $\beta$ -thiopropionatepoly(ethylene glycol) polymer in acidic environment<sup>14</sup>.

In order to deliver the anti-cancer drugs into targeted tumor tissue, the surface of the nanoparticle may be functionalized with various ligands such as peptide, antibodies, nucleic acid, and folic acid<sup>15</sup>. Recently Cheng et al., have reported a targeted and pH-sensitive nanocarrier system based on folic acid (FA) functionalized polydopamine modified mesoporous silica nanoparticles. DOX-loaded and folic acid targeted nanoparticles showed higher antitumor efficiency than the FA-free nanoparticles<sup>16</sup>.

In this study, we developed a novel multifunctional nanocarrier system for controlled and targeted drug delivery. This multifunctional core/shell hybrid nanomaterial is consist of a drug-loaded mesoporous and

magnetic core ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$ ) which is surrounded by pH-triggered (PLH-PEG) and FA-targeted (FA-PEG) polymer shells. To fabricate the multifunctional nanocarrier system, first of all,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles as a magnetic core was synthesized by using the coprecipitation method. Then  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were coated with silica and mesoporous silica layers, respectively. After that DOX was loaded into mesoporous nanoparticles and then pH-triggered (PLH-PEG) and FA-targeted (FA-PEG) polymer shells were coated on the mesoporous and magnetic core to obtain targeted and pH-triggered drug release. We believe that these multifunctional core/shell hybrid nanoparticles have a promising potential for controlled and targeted drug delivery.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , ethanol, dimethylsulphoxide (DMSO), ammonia solution (25% wt), Tetraethyl orthosilicate (TEOS), Octadecyltrimethoxysilane (C18TMS), N-Hydroxysuccinimide (NHS), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAC), folic acid, 3-glycidoxypropyltriethoxysilane (GPTS), Poly-L-histidine (PLH, Mw= 5000-25000 g/mol), anticancer drug doxorubicin (DOX) all were obtained from Sigma-Aldrich and all chemicals used as received without purification.

### Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$ Nanoparticles

$\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles were synthesized in three steps. In the first step, magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were prepared by chemical coprecipitation method<sup>17,18</sup>. For this purpose 2,6 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ve 1 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  was dissolved in water (50 mL) at room temperature. Then, the homogeneous solution was heated at 50 ° C with stirring and the pH of the solution was adjusted to pH=8 with dropwise addition of ammonia solution (25% wt). The black precipitates formed and the solution was stirred for two hours. After 2h stirring, the magnetic nanoparticles were separated from the solution by a simple magnet. The synthesized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were washed with water three times and were dried at 40° C in a vacuum oven. In the second step, the silica layer was coated on the surface of prepared magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. In a typical procedure, 10 mg  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were dispersed in a mixed solution containing 25 mL ethanol, 4mL  $\text{H}_2\text{O}$  and 1ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%wt) for two hours. Then, the mixture of 200  $\mu\text{L}$  TEOS and 175  $\mu\text{L}$  EtOH were added into reaction mixture drop by drop and the mixture was stirred for 30 min to prepare  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  nanoparticles. In the third step,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  nanoparticles were coated with a mesoporous  $\text{SiO}_2$  layer. In this step, the mixture of 170  $\mu\text{L}$  TEOS and 50  $\mu\text{L}$  Octadecyltrimethoxysilane (C18TMS) was added into the solution of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  nanoparticles and the solution was stirred for 24 hour at rt. Then the  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles were collected by magnetic separation and washed with EtOH- $\text{H}_2\text{O}$  mixture and dried. After that, the dried product was calcined at 550 °C to obtain mesoporous  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles<sup>19</sup>.

### DOX Loading

DOX solution was prepared in the range of concentrations between 1,0 mg/mL- $2 \times 10^{-4}$  mg/mL in the 2mL pH=7.4 buffer and the calibration curve was constructed by measuring the absorbance of DOX at 480 nm using fluorescence spectroscopy (Figure S1). The amount of DOX was determined by using a calibration curve (Figure S2). DOX loading capacity and encapsulation efficiency of the prepared nanoparticles were calculated using following equations 1 and 2, respectively.

$$\text{DOX loading capacity (wt\%)} (\text{LC}) = \frac{\text{Amount of loaded DOX}}{\text{Amount of loaded nanoparticles}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

$$\text{DOX encapsulation efficiency (\%)} (\text{LE}) = \frac{\text{Amount of encapsulated DOX}}{\text{Amount of total added DOX}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

### Synthesis of PLH-PEG-NH<sub>2</sub>

First, PLH (20 mg) was dissolved in the mixture of 5mL DMSO/0.1 M HCl mixture. Then,  $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$  (5 mg) was dissolved in 2 mL DMSO. After, prepared PLH solution was added into the  $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$  solution. N-Hydroxysuccinimide (1.0 mg) dissolved in 500  $\mu\text{L}$  DMSO and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (1.2 mg) was added into this mixture and the solution was stirred under  $\text{N}_2$  atmosphere at room temperature for 72 h. To remove the unreacted component of the reaction mixture was dialyzed against deionized water for 2 days using dialysis membrane (Mw=3.5 kDa) and the PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer was lyophilized<sup>20</sup>.

### **Synthesis of FA-PEG-NH<sub>2</sub>**

Briefly, FA (20 mg), NHS (9.2 mg), EDAC (5.6 mg) were dissolved in DMSO and stirred under N<sub>2</sub> atmosphere in the dark at room temperature to activate of the acid end group of FA molecules. After reacting for 6h, the reaction mixture was filtrated to remove formed dicyclohexylurea. After that NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> (50 mg) was added into the activated FA solution and the reaction mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at room temperature for another 24 h. When the reaction was completed, the reaction mixture dialyzed (Mw=1 kDa) against distilled water for 2 days. At last, FA-PEG polymer was obtained by freeze drying<sup>21</sup>.

### **Preparation of Polymer-Coated Nanoparticles**

DOX-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles were coated with pH-sensitive PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer and tumor targeting NH<sub>2</sub>-PEG-FA polymer. For this purpose, firstly, the mixture of PLH-PEG-NH<sub>2</sub> (4mg) and NH<sub>2</sub>-PEG-FA (1mg) polymers was dissolved in 10 mL DMSO. Then, the solution of 5 $\mu$ L 3-glycidoxypropyltriethoxysilane (GPTS) in 5mL DMSO was added into the polymers solution and the mixture was stirred under N<sub>2</sub> atmosphere at room temperature for 3 h. After that, 5 mg DOX-loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles dispersed in 1mL DMSO and then added into the GPTS-modified polymer mixture and the solution was stirred for 24 h under N<sub>2</sub> at 50°C. After that, the polymer coated nanoparticles were collected by a simple magnet, and washed with DMSO and PBS and dried under vacuum.

### **In vitro Drug Release Profile of Polymer Coated Magnetic Nanoparticles**

Drug release profiles of the prepared polymer coated magnetic nanoparticles were investigated at 37°C in three different buffer solutions pH=7.4, 6.8 and 5.5 to mimic the normal cell and cancer cell environments. For this purpose, the DOX-loaded nanoparticles (50  $\mu$ g/mL) were dispersed in 5mL buffer solution and placed into the dialysis bag (MWCO 10kDa). The bag submerged in 10 mL same buffer media and dialyzed at 37°C with stirring. At certain time intervals, 3mL of the sample taken out from the release medium and replaced with an equal volume of the new buffer solution. Fluorescence measurements of samples were performed at 480 nm. At certain time intervals, DOX release amount of nanoparticles in different pH environments were determined using DOX calibration curves.

### **Cytotoxicity Assays of Hybrid Nanoparticles**

Cell cytotoxicity experiments of pH-controlled magnetic nanoparticles were investigated in which DOX release profiles were examined and optimum conditions were determined. Cytotoxicity assay of nanoparticles was performed with human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7). For cytotoxicity assays, MCF-7 cells incubated with different concentrations of DOX unloaded nanoparticles for 48 h and their cytotoxicity was evaluated using MTT assay. Afterward different concentrations of DOX-loaded nanoparticles were incubated for 48 h with MCF-7 and their cytotoxicity was determined by MTT assay<sup>22</sup>. The studies were performed with in-direct cytotoxicity method and MTT assay. In general, alpha-MEM medium containing 1/10 FCS was used in the studies. To obtain the extract of the materials, the samples interacted with the cell culture medium at a sample/1 ml of medium concentration for 72 hours at 37 °C. 1x10<sup>4</sup> cells were seeded in 96-well plates and 100  $\mu$ l of the sample extracts were pipetted onto the cells. Plates were incubated at 37°C for 48 h. The medium was then removed and 100  $\mu$ l of medium containing, 10  $\mu$ l MTT solution was pipetted into the wells. After 3.5 h incubation, the media were removed and 150  $\mu$ l DMSO was pipetted into the wells. The absorbance of each well was measured at 570 nm. Only the absorbances measured from routine cell culture media-interact cells were used as a negative study. As a positive study, DMSO diluted 1/10 with routine cell culture media was used.

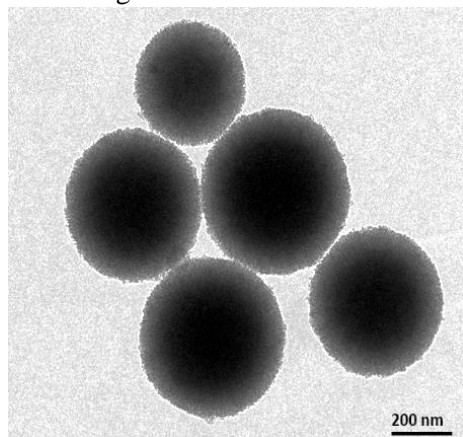
### **Characterization**

Transmission electron microscope (FEI 120kV CTEM) was used to observe the morphology of the nanoparticles. The particle size and the zeta potential value of the nanoparticles were performed on a Malvern Nano ZS90. The chemical structure of synthesized PLH-PEG-NH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-PEG-FA polymers were recorded by a Bruker Ultrashield 300 MHz <sup>1</sup>HNMR spectrometers. Magnetic hysteresis properties of the prepared nanoparticle were determined with Cryogenic Limited PPMS. Nitrogen adsorption/desorption analysis measurement was carried out on a Quantachrome Nova 2200 system. Anticancer drug DOX loading and release profiles were carried out by using Varian Carry Eclipse Fluorescence Spectrophotometer system.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis and Characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> Nanoparticles

TEM images of the nanoparticles confirmed the successful synthesis of spherical nanoparticles coated with silica and mesoporous silica layers (Figure 1). From Figure 1, a typical core/shell structure has a dark core of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and a less dark nonporous silica shell can be observed. The silica shell is about 40 nm in thickness. The second mesoporous SiO<sub>2</sub> shell is about 35 nm in thickness. The average size of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles is observed in the range of 300-400 nm. The fabricated mesoporous structure not only offers a large number of exposed active sites because of high surface area but also provides large accessible pore volume for the adsorption and release of drug molecules.



**Figure 1.** TEM image of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles

Additionally, the zeta charge values of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles were determined -18 mV and -32mV, respectively. The negative changes of zeta potential value of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles have confirmed the presence of silica layers<sup>23</sup>.

The surface area and pore size and pore volume parameters of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles are important for drug carrying potential of the system. For this purpose, the surface area, pore volume, and pore size of the nanoparticles were analyzed by Brunauer–Emmett–Teller (BET) and the related adsorption/desorption isotherm (Figure 2). As shown in Figure 2, the N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherm of the mesoporous Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles exhibited a typical of a type IV curve at relative pressures (P/P<sub>0</sub>) between 0.4 and 0.9, indicating the typical characteristics of mesoporous materials<sup>24,25</sup>. The surface area and pore volume of nanoparticles were determined as 131.18 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup> and 0.24 cm<sup>3</sup>/g, respectively. Moreover, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles showed a single model PSD and the pore size of the nanoparticles was calculated as 2.41 nm using NLDFT model.

The magnetic susceptibility of the prepared magnetic core nanoparticles was characterized by magnetic hysteresis measurements. The measurement was taken at room temperature. As a result, it can be said that the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles are suitable for drug loading applications.

The magnetic behavior of the nanoparticles was examined by using magnetic hysteresis measurements as seen in Figure 3. Figure 3 shows the magnetic hysteresis loops of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles. The insert photographs have presented the nanoparticles dispersed in water and the behavior of these nanoparticles under a magnet. The magnetic saturation value of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles was measured 77.001 emu/g at room temperature. It was observed that the magnetic properties of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles decreased slightly after coating with silica layers as expected and the magnetic saturation value of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> was 44.004 emu/g<sup>26</sup>.

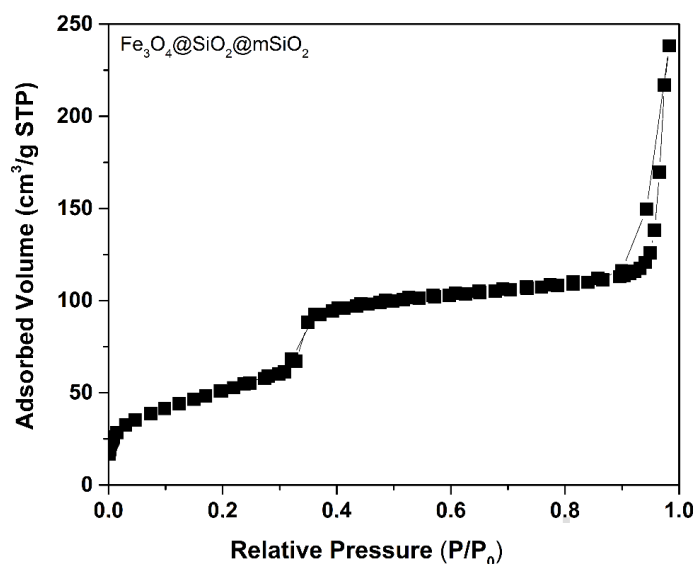


Figure 2. N<sub>2</sub> adsorption/desorption isotherm of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles

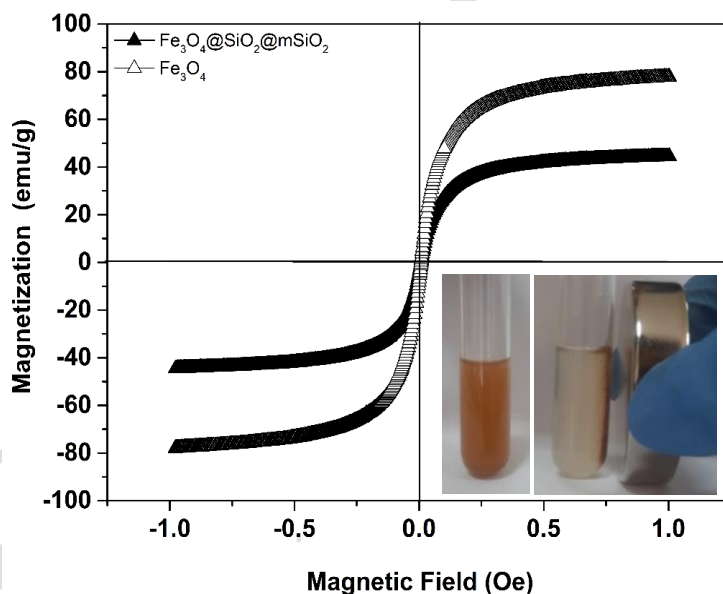
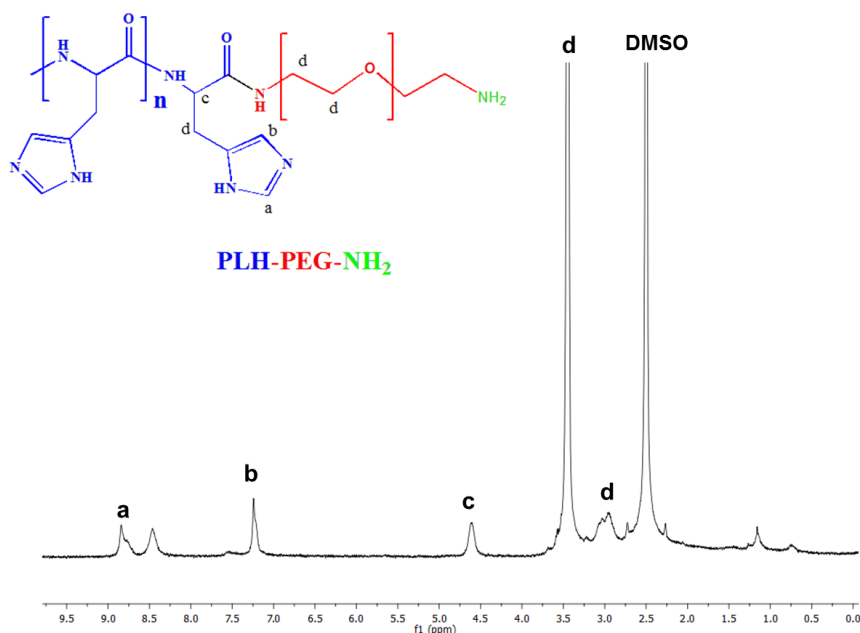


Figure 3. Magnetic hysteresis curves of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@mSiO<sub>2</sub> nanoparticles

### Synthesis and Characterization of PLH-PEG-NH<sub>2</sub>

The PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer was synthesized via the peptide bond formation between pH-sensitive PLH (M<sub>w</sub>= 5000-25000 g/mol) and NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> (M<sub>n</sub>=6000 g/mol) polymer. In the <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer (Figure 4) the peaks between 8.5-9.0 ppm are representing to the histidine protons which are symbolized with (a), the peaks between 7.0-7.5 ppm are corresponding to protons which are symbolized with (b), the peak between 2.5-3.5 ppm are representing to the histidine protons which are symbolized with (d) and the peak between 4.5-5.0 ppm are corresponding to the protons which are symbolized (c). In addition, the peaks observed between 3.40-3.60 ppm came from the PEG units. This results indicated that PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer was synthesized successfully.

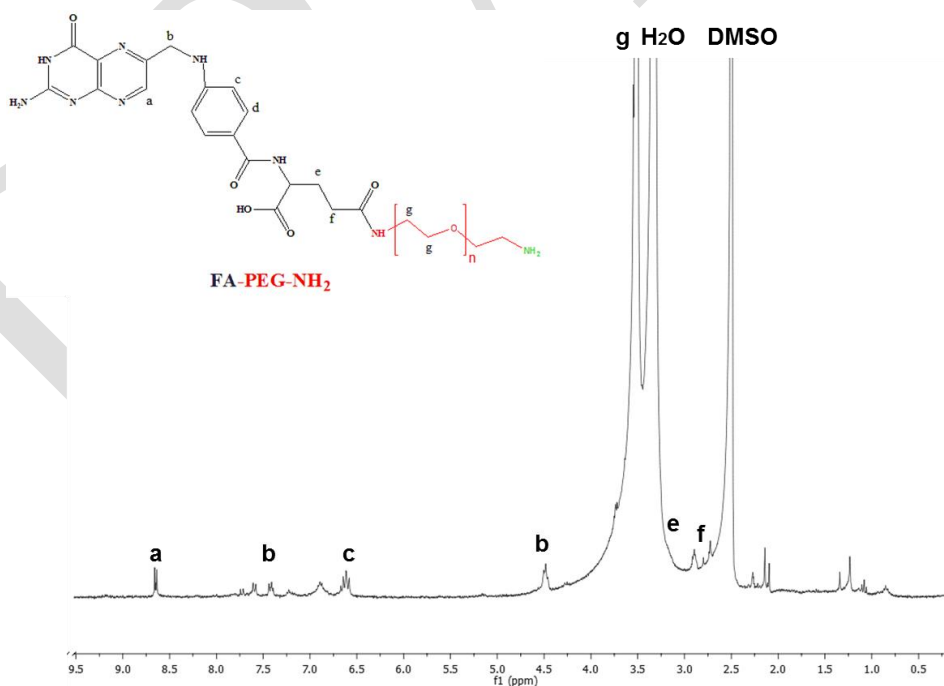




**Figure 4.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PLH-PEG-NH<sub>2</sub> polymer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

#### Synthesis and Characterization of FA-PEG-NH<sub>2</sub>

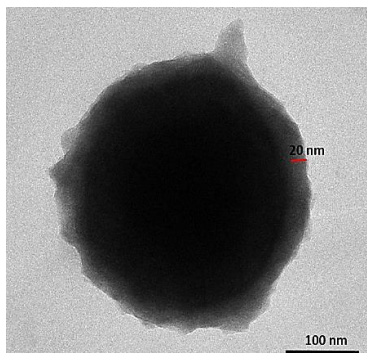
In order to design targeted and smart drug release nanocarrier system, as a second polymer FA-PEG-NH<sub>2</sub> was synthesized. For this purpose, NH<sub>2</sub>-PEG-NH<sub>2</sub> (Mw= 6000) polymer was modified with FA molecule. The synthesized FA-PEG-NH<sub>2</sub> polymer was characterized by <sup>1</sup>H NMR (Figure 5). In the <sup>1</sup>H NMR spectrum of the FA-PEG-NH<sub>2</sub> polymer, the characteristic peaks at 6.62, 7.61 and 8.63 ppm belong to the aromatic protons of folic acid and the peaks between 3.4-3.6 ppm belongs to the methylene protons of PEG units. This results demonstrated that FA-PEG-NH<sub>2</sub> polymer was successfully synthesized.



**Figure 5.** <sup>1</sup>H-NMR spectrum of FA-PEG-NH<sub>2</sub> polymer (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

## Preparation and Characterization of Polymer Coated Nanoparticles

The morphologies of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  and polymer coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles were examined by transmission electron microscopy (TEM). TEM image of polymer coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  particles was given in Figure 6. As seen in Figure 6, the presence of the organic polymer layer can be clearly visible and the polymer layer was measured as almost 20 nm of on the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles. Furthermore, the zeta-potential values of the nanoparticles before and after polymer coating were measured. When the nanoparticles were coated with polymer, zeta-potential values increased from -32 mV to 22 mV, this result indicating that polymer shell was successfully coated onto the nanoparticles.



**Figure 6.** TEM images of polymer-coated magnetic nanoparticles

## pH-Sensitive Release Profiles of Polymer Coated Magnetic Nanoparticles

Before polymer coating,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles loaded with DOX. DOX loading capacity and loading efficiency of the nanoparticles were calculated according to the equations mentioned before, using fluorescence measurements and calibration curve. DOX loading capacity and efficiency of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles were calculated as 1.84% (0.0392  $\mu\text{mol/g}$ ) and 69.69%, respectively. After that, the DOX-loaded  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@m\text{SiO}_2$  nanoparticles were coated with the polymer layer to obtain FA-targeted and pH-triggered drug carrying nanocarrier system.

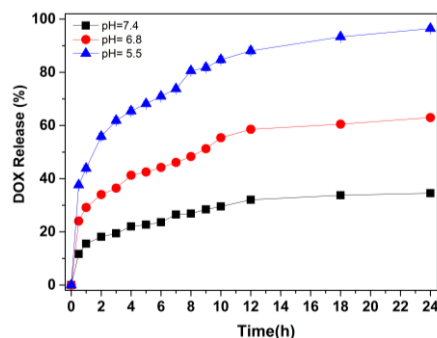
*In vitro*, drug release profiles of polymer coated nanoparticles at different were examined at different pH mediums (pH 5.5, 6.8 and 7.4 ) to reveal the pH-triggered drug release profile of the nanoparticles ( Figure 7). As seen in Figure 7, the polymer coated nanoparticles exhibited a highly effective pH-triggered release profile. This phenomenon can explain by the protonation of histidine ring units in PLH polymer at acidic pH mediums. At acidic medium, pH-triggered nanoparticle system solubility may changes from hydrophobicity to hydrophilicity. In this way, DOX molecules may be released by opening pore of nanoparticle system. On the other hand, polymer coated nanoparticles exhibited hydrophobic character at neutral pH medium pH=7.4. At neutral pH medium, polymer-coated nanoparticles released approximately 34.5% DOX within 24 hours. When the pH of the medium was changed to 6.8 and 5.5, the amount of DOX release increased to 62.9% and 96.1 % within 24 hours, respectively. These results confirmed that the pH-sensitive nanoparticles can be used in cancer therapy.

## Cytotoxicity of Hybrid Nanoparticles

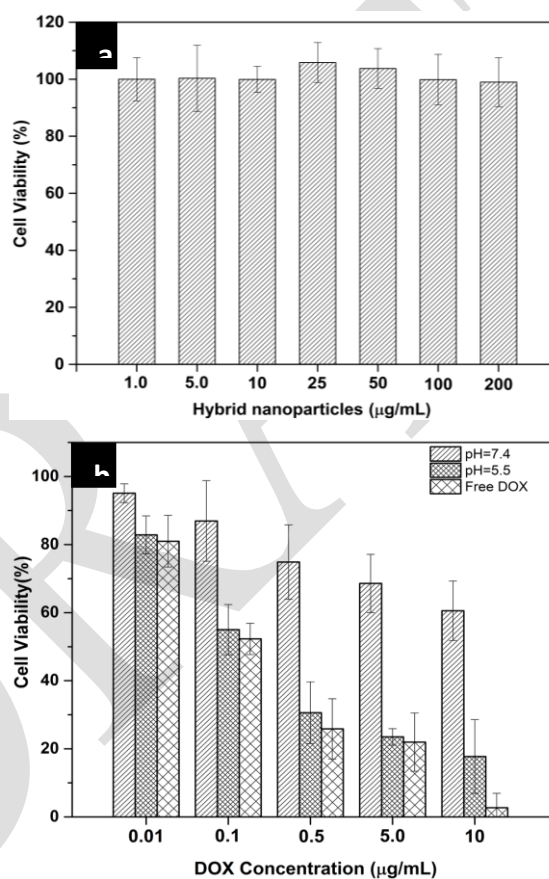
The cytotoxicity of the polymer coated nanoparticles was investigated using MCF-7 cells. First of all, the polymer coated nanoparticles (without DOX) were added to the cells at different concentrations in the range of 1.0-200  $\mu\text{g/mL}$ . After 48 h incubation, MTT assay was used to asses the cytotoxicity of the nanoparticles. The results showed that the nanoparticles did not show toxicity up to a reasonably high concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 8(a)), suggesting that polymer-coated nanoparticles are nontoxic and biocompatible for use as a drug delivery system.

Antitumor activities of free DOX and DOX-loaded polymer-coated nanoparticles were investigated for two different pH medium (pH 7.4 and 5.5) against MCF-7 cells. As shown in Figure 8(b), both free DOX and DOX-loaded polymer-coated nanoparticles demonstrated DOX dose-dependent antitumor activities to MCF-7 cells. At neutral pH=7.4 the cell viability was observed as almost 60% at the 10  $\mu\text{g/mL}$  DOX concentration.

On the other hand, at pH=5.5, the polymer coated nanoparticles showed more cytotoxicity effect and the cell viability was observed as 17% at the highest DOX concentration. According to these results, it can be clearly said that DOX-loaded polymer-coated nanoparticles exhibited very efficient cytotoxicity against MCF-7 cells.



**Figure 7.** pH-triggered release of DOX from polymer coated magnetic nanoparticles at 37°C



**Figure 8.** Cytotoxicity assay results on MCF-7 cells with (a) hybrid NPs (without DOX) concentrations, (b) different DOX concentrations and exposure for 48 h.

## CONCLUSION

In conclusion, we developed a novel FA-targeted and pH-sensitive core/shell magnetic nanocarrier system for the targeted and controlled drug delivery. This hybrid nanocarrier system demonstrated very efficient pH-triggered drug release profile. Moreover, DOX-loaded hybrid nanoparticles exhibited high cytotoxicity against MCF-7 cells. In our belief, the obtained each result indicate that this smart multifunctional core/shell nanocarrier system may provide a very big contribution to literature.

## Acknowledgments

This work was supported by Gazi University Scientific Research Projects (BAP) Grant No: 63/2017-01 and partially supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Project number: 115R280).

## REFERENCES

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018; CA: Cancer J. Clin., 68 (6):394–424.
- 2 Chen Y, Zhang H, Cai X, Ji J, He S, Zhai G. Multifunctional Mesoporous Silica Nanocarriers for Stimuli-Responsive Target Delivery of Anticancer Drugs. 2016; RSC Adv., 68(94): 92073-92091.
- 3 Moorthy MS, Kim HB, Bae JH, Kim SH, Ha CS. Design of Core-Shell Magnetic Mesoporous Silica Hybrids for pH and UV-Light Stimuli-Responsive Cargo Release. 2016; RSC Adv., 35(6):29106-29115.
- 4 Yang Y, Yu C. Advances in Silica Based Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. 2016; Nanomedicine, 12(2):317-332.
- 5 Kalitaa H, Rajputb S, Kumarb BNP, Mandalb M, Pathaka A. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Zirconium Phosphate Core-shell Nanoparticles for pH-Sensitive and Magnetically Guided Drug Delivery Application. 2016; RSC Adv., 6(25); 21285-2129
- 6 Gawande MB., Goswami A, Asefa T, Guo H, Biradar AV, Dong-Liang P, Zboril R, Varma, R. S. Core-Shell Nanoparticles: Synthesis and Applications In Catalysis and Electrocatalysis. 2015; Chem. Soc. Rev., 44(21): 7540-7590.
- 7 Zhao Z, Huang D, Yin Z, Chi X, Wang X, Gao J. Magnetite Nanoparticles as Smart Carriers to Manipulate The Cytotoxicity Of Anticancer Drugs: Magnetic Control and pH-Responsive Release. 2012; J. Mater. Chem., 22(31); 15717-15725.
- 8 Ling D, Lee N, Hyeon T. Chemical Synthesis and Assembly of Uniformly Sized Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. 2015; Acc. Chem. Res., 48(5): 1276–1285.
- 9 Yang Y, Yu C. Advances in Silica Based Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. 2016; Nanomedicine, 12(2): 317-332.
- 10 Wei S, Wang Q, Zhu J, Sun L, Line H, Guo Z. Multifunctional Composite Core-Shell Nanoparticles. 2011; Nanoscale, 3(11): 4474-4502.
- 11 Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I, Manzano M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. 2018; Molecules, 23(1): 47;
- 12 Karimi M, Eslami M, Sahandi-Zangabad P, Mirab F, Farajisafilio N, Shafaei Z, Ghosh D, Bozorgomid M, Dashkhaneh F, Hamblin MR. pH-Sensitive Stimulus-Responsive Nanocarriers for Targeted Delivery of Therapeutic Agents. 2016; Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol., 8(5):696-716.
- 13 Yang K, Luo H, Zeng M, Jiang Y, Li J, Fu X. Intracellular pH-Triggered, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells by Multifunctional Envelope-Type Mesoporous Silica Nanocontainers. 2015; ACS Appl. Mater. Interfaces, 7(31): 17399-17407.
- 14 Yang C, Guo W, Cui L, An N, Zhang T, Lin H, Qu F. pH-Responsive Magnetic Core-Shell Nanocomposites for Drug Delivery. 2014; Langmuir, 30(32): 9819–9827.
- 15 Colilla M, González B, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles for the Design of Smart Delivery Nanodevices. 2013; Biomater. Sci., 1(2):114-134.
- 16 Cheng W, Nie J, Xu L, Liang C, Peng Y, Liu G, Wang T, Mei L, Huang L, Zeng X. pH-Sensitive Delivery Vehicle Based on Folic Acid-Conjugated Polydopamine-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. 2017; ACS Appl. Mater. Interfaces, 9(22); 18462–18473.
- 17 Hai NH, Phu ND, Luong NH, Chau N. Mechanism for Sustainable Magnetic Nanoparticles Under Ambient Conditions. 2008; J. Korean Phys. Soc., 52(5):1327– 1331.
- 18 Ying A, Qiu F, Wu C, Hu H, Yang J. Ionic Tagged Amine Supported on Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Application for Versatile Catalytic Knoevenagel Condensation in Water. 2014; RSC Adv., 63(4): 33175- 33183.
- 19 Chen Y, Chen H, Zhang S, Chen F, Zhang L, Zhang J, Zhu M, Wu H, Guo L, Feng J, Sh J. Multifunctional Mesoporous Nanoellipsoids for Biological Bimodal Imaging and Magnetically Targeted Delivery of Anticancer Drugs. 2011; Adv. Funct. Mater., 21(2): 270-278.

- 20 Liu Y, Feng L, Liu T, Zhang L, Yao Y, Yu D, Wang L, Zhang N. Multifunctional pH-Sensitive Polymeric Nanoparticles for Theranostics Evaluated Experimentally in Cancer. 2014; *Nanoscale*, 6(6): 3231–3242.
- 21 Yang X, Pilla S, Grailer JJ, Steeber DA, Gong S, Chen Y. Tumor-Targeting, Superparamagnetic Polymeric Vesicles as Highly Efficient MRI Contrast Probes. 2009; *J. Mater. Chem.*, 19(32): 5812–5817.
- 22 Mossman T. Rapid Colometric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. 1983; *J. Immunol. Methods.*, 65(1-2): 55-63.
- 23 Guo W, Yang C, Lin H, Qu F. P(EO-co-LLA) Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub> Nanocomposites for Thermo/pH Responsive Drug Controlled Release and Hyperthermia. 2014; *Dalton Trans.*, 43(48):18056-18065.
- 24 Zhao W, Lang M, Li Y, Li L, Shi, J. Fabrication of Uniform Hollow Mesoporous Silica Spheres and Ellipsoids of Tunable Size Through a Facile Hard-Templating Route. 2009; *J. Mater. Chem.*, 19(18): 2778–2783.
- 25 Teng Z, Su X, Zheng Y, Sun J, Chen G, Tian C, Wang J, Li H, Zhao Y, Lu G. Mesoporous Silica Hollow Spheres with Ordered Radial Mesochannels by a Spontaneous Self-Transformation Approach. 2013; *Chem. Mater.* 25(1), 98–105.
- 26 Yin NQ, Wu P, Yang TH, Wang M. Preparation and Study of a Mesoporous Silica-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Photothermal Nanoprobe. 2017; *RSC Adv.*, 7(15): 9123–9129.

## ***In vitro* study on antioxidant, antibacterial and DNA interaction activities of extracts from *Arbutus andrachne* L.**

Ceren Baskan<sup>1\*</sup>, Dudu Duygu Kılıc<sup>2</sup>, Belgin Sırken<sup>3</sup>, Güler Tanrikulu<sup>4</sup>, Melek Gül<sup>4</sup>, Omer Ertürk<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Amasya University, Sabuncuoğlu Şerefeddin Health Services Vocational School, Amasya, Turkey.

<sup>2</sup>Amasya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Amasya, Turkey.

<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Aquatic Animal Diseases, Samsun, Turkey.

<sup>4</sup>Amasya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Amasya, Turkey.

<sup>5</sup>Ordu University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Ordu Turkey.

\*Corresponding author e-mail: [ceren.yavuz@amasya.edu.tr](mailto:ceren.yavuz@amasya.edu.tr)

### **Abstract**

Traditionally, the fruits and leaves of *Arbutus andrachne* are well known and used in for applications in antimicrobial, antioxidant and anticancer activity. This study was aimed to determine the *in vitro* antibacterial, antioxidant and DNA interaction activities of the different extracts of *Arbutus andrachne*.

*Arbutus andrachne* was collected from Amasya Province during May 2018. Dried leaves powder were mixed with of suitable solution. Then, the mixtures were extracted with the soxhlet apparatus for 4 hours. The antibacterial effects of extracts were researched on pathogens, namely *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 using disc diffusion methods. Gentamicin and cefotaxime were used as control for bacteria. To try to understand each plant extracts effect on the antioxidant methods, we studied the different methods as named radical scavenging activity (DPPH), metal chelating activity, ferric reducing antioxidant power assays. In the plant extracts, total phenolic and total flavonoid contents were determined by spectrophotometric methods due to investigating the effect of secondary metabolites on antioxidant activity. To explore the beneficial effect of the extracts on hydroxyl radical-mediated DNA damage plasmid DNA pUC18 was used.

As a result, *Arbutus andrachne* extracts had antibacterial effect when they compared with control group antibiotics. According to disc diffusion methods, the highest antibacterial effect was identified in ethanol, chloroform and hexane extract, respectively. Ethanol extracts of *Arbutus andrachne* showed the best antioxidant activity. Moreover, extracts of *Arbutus andrachne* had repair effects on plasmid DNA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condition.

The investigated *Arbutus andrachne* extract showed significant bioactivities. These extracts have been a promising candidate for the preparation of new natural products. However, future studies should be carried out to verify such actions in different matrices.

**Keywords:** *Arbutus andrachne* L. Antioxidant, Antimicrobial, DNA interaction

### **INTRODUCTION**

In recent years, the root, trunk, leaf or fruit of various plants are utilized as a natural alternative in modern medicine. Secondary metabolites (terpenes, terpenoids, flavonoids) in the content of natural plants help to protect human health against various diseases. The antioxidant content of secondary flavonoids provides inhibition of oxidative damage associated with many diseases such as cancer, coronary heart disease, and paralysis. (Özgen et al., 2009). Antioxidants are known to have a protective role against oxidative damage of reactive oxygen species on biomolecules such as DNA, lipid, and protein (Ayaz et al., 2018; Gül et al., 2017).

In addition, the unconscious and unnecessary use of antibiotics causes a rapid increase in antibiotic-resistant microorganisms day by day. Therefore, diseases caused by resistant microorganisms pose serious public health problems. The use of medicinal herbs to reduce the harmful effects of antimicrobial agents increases with each passing day (Beattie et al., 2005). In addition, the World Health Organization (WHO) has acknowledged many years ago that traditional medicine is important in health applications (WHO 2002-2005). Therefore, compounds derived from medicinal and aromatic plants with biological activity are widely investigated to treat various animal and human diseases (Kunduhoglu et al., 2011; Ünal et al., 2008).

*Arbutus andrachne* L. plant belongs to the Ericaceae family and is known to have antimicrobial, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activity (Sıcak et al., 2019; Saklani et al., 2008). The local name in Turkey is known as “Sandal” tree, “Davulga” or “Kocayemiş”. The small fruit of *Arbutus andrachne* L., which blossomed in May and localized in many different regions of Anatolia, was reported to occur in November (Baytop et al., 1999). The small fruit of *Arbutus andrachne* L., which blossomed in May and localized in many different regions of Anatolia, was reported to occur in November. Its fruits are used in a wide food product such as jam, fruit jelly, marmalade and alcoholic beverages (liquor and wine). Tannin, anthocyanin, and carotenoids containing fruits are generally sweet, although unpleasant taste. The main therapeutic effects of *Arbutus andrachne* L. are related to urinary tract infections, as well as, anticancer, antibacterial and antioxidant activities.

The main purpose of this study is to reveal the antibacterial and antioxidant effects of the *Arbutus andrachne* L. plant obtained from the province of Amasya. For this purpose, the antibacterial effects of *Arbutus andrachne* L. plant extracts were investigated by the disk diffusion method. Secondly, the antioxidant activities of *Arbutus andrachne* L. specimens were determined using radical scavenging activity (DPPH), metal chelating activity, ferric reducing antioxidant power assays methods. In addition, the protective role of *Arbutus Andrachne* L. extracts on DNA damage originating from hydroxyl radicals was investigated using plasmid DNA. In the literature search, DNA interaction experiments with *Arbutus andrachne* L. were not found. In this context, the current work differs from previous studies. These analyses were made to determine which of the three extracts (Ethanol, Dichloromethane, and n-hexane) is more effective.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample extraction

*Arbutus andrachne* L. was collected from natural population which are located in Amasya in May 2018 (Baytop, 1999). The leaves of *Arbutus andrachne* L. were then dried at room temperature. The plants (25 g) were extracted with the soxhlet tool (Isolab, Turkey) for 4 hours in ethanol, dichloromethane and n-hexane (prepared by using solvents of different polarity). The extracts were filtered by Whatman No. 1 paper. The solvents were removed under a rotary vacuum until dry (Heidolph Collegiate, LV28798826, New Jersey, USA). Then the residue dissolved in Tetrahydrofuran (THF, Sigma) for antimicrobial activity (20 mg/mL). The extracts samples were stored at 4 °C in dark bottle for investigation (Bouyahya et al., 2016).

### Test organisms and culture condition for antibacterial analysis

Extracts of *Arbutus andrachne* L. were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Before use, Bacterial strains were subcultured overnight at 37°C for 18 to 24 h in Triprik Soy Broth (TSB, Oxoid, Hampshire, UK).

### Antibacterial activity

Antibacterial activity of the *Arbutus andrachne* L. extracts were determined by the disc diffusion method (CLSI 2010). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 were used in bacterial strains. The concentrations of the microorganisms were adjusted using turbidity measurements (0.5 McFarland) using serum physiologic solution. The concentration of bacterial suspensions was adjusted to 10<sup>8</sup>cells/mL. Then, extracts (20 mg/mL) were prepared in THF and loaded 6 mm diameter sterile blank discs (Oxoid). Inhibition zones were determined after incubation at 37 °C for 24 h. As a positive control for bacteria, gentamicin (10 µg) and ceftriaxone (30 µg) were placed in Petri dishes. All tests were performed in triplicate (CLSI, 2010).

## Antioxidant activity

### Free radical scavenging activity

The free radical scavenging activity was determined with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) using methods of Brand-Williams (Brand-Williams et al., 1995). Different concentrations of plant material were prepared and 0.75 mL of this extract was added to 1.5 mL of 20 mg/L DPPH• solution in methanol. This solution was added to, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and trolox (100–500 µg/mL). The mixture was shaken vigorously, and the decrease in absorbance at 517 nm was measured for 30 min at room temperature. Water (0.75 mL) in place of the sample was used as control. The percent inhibition activity was calculated using the following equation: free radical scavenging effect % =  $[(A_0 - A_1)/A_0] \cdot 100$ . ( $A_0$  = the control absorbance and  $A_1$  = the sample solution absorbance).

### Metal chelating activity

The chelating activity of extract on ferrous ions ( $Fe^{2+}$ ) was measured according to the method of Decker and Welch (Decker et al., 1990). Aliquots of 1 mL of different concentrations (100–500 µg/mL) of extracts were mixed with 3.7 mL of deionized water. The mixture was incubated with  $FeCl_2$  (2 mM, 0.1 mL) for 30 min. After incubation, the reaction was initiated by addition of ferrozine (5 mM and 0.2 mL) for 10 min at room temperature, and then the absorbance was measured at 562 nm. A lower absorbance indicates a higher chelating power. The chelating activity of the extract on  $Fe^{2+}$  was compared with that of EDTA at the same concentrations. Metal chelating activity (%) =  $[(A_0 - A_1)/A_0] \cdot 100$ .

### Reducing activity

Measurements of reducing activity of extracted were according to the Oyaizu method (Oyaizu et al., 1986). Various concentrations of the extract (µg) in 1 mL of distilled water were mixed with 2.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide [ $K_3Fe(CN)_6$ ] (1%, w/v), and the mixture was incubated at 50°C for 30 min. Afterwards, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%, w/v) was added to the mixture and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Finally, 2.5 mL of upper-layer solution was mixed with 2.5 mL distilled water and 0.5 mL  $FeCl_3$  (0.1%, w/v), and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer.

### Estimation of total phenolic content

According to the methods of Slinkard and Singleton (Slinkard et al., 1977), using Folin–Ciocalteu reagent were determined depending on phenolic standard gallic acid. 1 mL of the plant extract was introduced into test tubes followed by 1 mL Folin–Ciocalteu's reagent. The solution was kept in the dark for 5 min and then 3 mL of sodium carbonate (2%) was added. The tubes were covered with parafilm and kept again in the dark for 1 h and were measured absorption at 765 nm with a spectrophotometer and compared to a gallic acid calibration curve. The results were expressed as mg gallic acid/g dried sample. Each assay was carried out in triplicate.

### Estimation of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined with quercetin standard solution using Park methods (Park et al., 2008). The plant extract in 0.3 mL of was introduced into test tubes followed by 3.4 mL 30% methanol, 0.15 mL of 0.5 M  $NaNO_2$  and 0.3 M  $AlCl_3$  reagent. After 5 min 1 mL of 1 M NaOH was added and measured absorption at 506 nm with a spectrophotometer and compared to a quercetin calibration curve. Each assay was carried out in triplicate. The total flavonoids were described as mg of quercetin equivalents per g of dried fraction.

### DNA interaction assay

To explore the beneficial effect of the *Arbutus andrachne* L. extracts on hydroxyl radical-mediated DNA damage plasmid DNA pUC18 (Thermo Scientific) was used. Firstly, the *Arbutus andrachne* L. extracts were dissolved Dimethyl sulfoxide (DMSO, concentration range from 12.5 to 100 mg/ml). A reaction mixture (20 µl final volume) containing 0.25 µg/µl plasmid DNA pUC18, 1 µl of 3%  $H_2O_2$ , 0.1 g/ml *Arbutus andrachne* L. extracts in Tris-EDTA (TE) buffer was prepared.  $H_2O_2$  and 0.1% tetrahydrofuran treated plasmid DNAs



were used as control groups. Secondly, the prepared mixture for each *Arbutus andrachne* L. extracts was incubated at 37°C for 24 hours. 2 µl loading dye (bromophenol blue [0.025%] and sucrose [4%] in dH<sub>2</sub>O) was added into the mixture (10 µl total volume) and loaded on to the 1% agarose gel. Electrophoresis process was for 90 min at 80 V in TBE buffer running buffer (pH 8). The Gel was imaged under UV light (Ayaz et al., 2018).

## RESULTS and DISCUSSION

The present study, the extracts from *Arbutus andrachne* L. samples collected from Amasya were assayed for antibacterial potency against four Gram-positive and four Gram-negative bacteria of clinical importance. Antioxidant activity was evaluated by measuring with different methods. At the same time, this study exhibit DNA damage inhibitory activities of *Arbutus andrachne* L.

According to analyzed antibacterial activity, the extracts of the plants indicated varying degrees of activity against bacterial strains that outlined in Table 1. Ethanolic extracts from *Arbutus andrachne* L. is the most effective on *S. aureus* (ATCC 25953), *S. aureus* (ATCC 25953) and *B. cereus*. The antimicrobial activity of Dichlorometanoic extracts against the *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *S. enteritidis* and *E. coli* was found to non-effective. N-Hexanoic extracts from *Arbutus andrachne* L is the most effective on *B. cereus* and *B. subtilis*.

**Table 1.** Antibacterial activity of the extract against wild type microorganisms (mm)

	Microorganisms							
	B.s	B.c	P.a 9027	P.a 27853	S.a 25953	S.a 25923	S.e	E.c
Ethanol	14	10	10	10	19	15	11	11
Dichloromethane	12	14	8	10	14	17	9	9
n-Hexane	11	11	8	10	9	8	8	9
CRO 30 µg	28	13	12	33	21	31	10	34
CN 10 µg	19	21	23	23	20	23	26	23

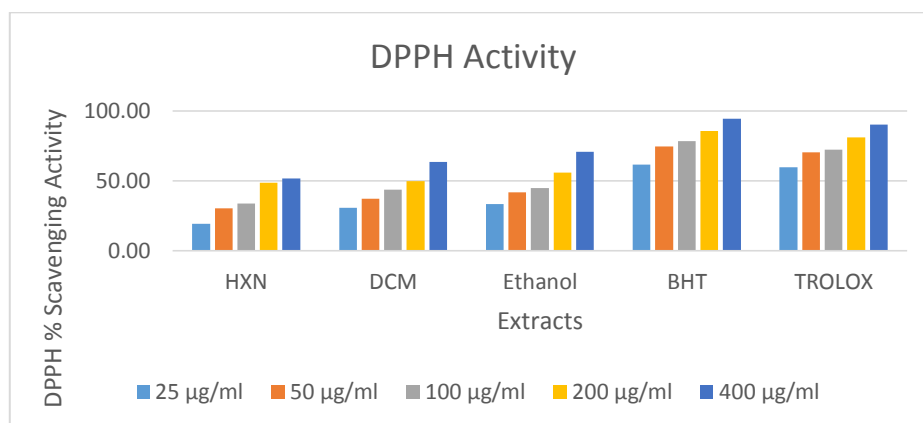
**Microorganisms:** B.s.: *Bacillus subtilis*, B.c.: *Bacillus cereus*, P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*, S.a.: *Staphylococcus aureus*, S.e.: *Salmonella enteritidis*, E.c.: *Escherichia coli*. CRO: Ceftriaxone, CN: Gentamicin

The literature investigations revealed diverse traditional uses of *Arbutus* species based on antiseptic, anti-hypertensive, anti-diabetic, anti-inflammatory, anticancer and laxative properties. However, only few of them are determined scientifically for their biological activities (Tenuta et al., 2019). The described characteristics are related to the contents of several biologically active compounds of *Arbutus andrachne* L (Morgado et al., 2018). One of them reported from one of the Turkey, In the survey, the highest antibacterial activity of *Arbutus andrachne* L. was determined against *S. aureus* (Sıcak et al., 2019). In another survey carried out again Turkey, *Arbutus andrachne* L. extracts inhibited the growth of five bacteria and the inhibition zones ranged between 8- 17 mm. The highest antibacterial activity shows on *S. aureus* (17mm) (Ergun et al., 2014). Similarly, in the present study, ethanolic extracts from *Arbutus andrachne* L. was the most effective on *S. aureus* (19 mm) (ATCC 25953). According to (Tenuta et al., 2019) from France, they reported that the most promising activity of *Arbutus* species leaves was found mainly against Gram-positive bacteria. In addition, they showed an intense antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, a moderate activity against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*.

Although there is a few information in literature about *Arbutus andrachne* L. extracts biological activity, extracts prepared from *Arbutus unedo* L., another type of *Arbutus* genus, leaves were showed antimicrobial activity against many microorganisms *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* and *S. epidermis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The biological activity of *Arbutus unedo* L. tree have been the subject of several studies (Delgado-Pelayo et al., 2016; Erkekoglou et al., 2017; Fonseca et al 2015). One of them reported from one of the Portugal, In the survey, the extracts revealed antibacterial activity against several Gram-positive bacteria, including *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (Morgado et al., 2018; Asmae et al., 2012; Ertabaklar et al., 2009; Ferreira et al., 2012). In another survey carried out again Portugal, Gram positive bacteria were more susceptible to the antimicrobial potential of the extract (Malherio et al., 2012). Similar results were also reported in different all *Arbutus* species in literature. In Gram-positive bacteria, cell wall allows the essential oil and hydrophobic constituents to be in direct contact

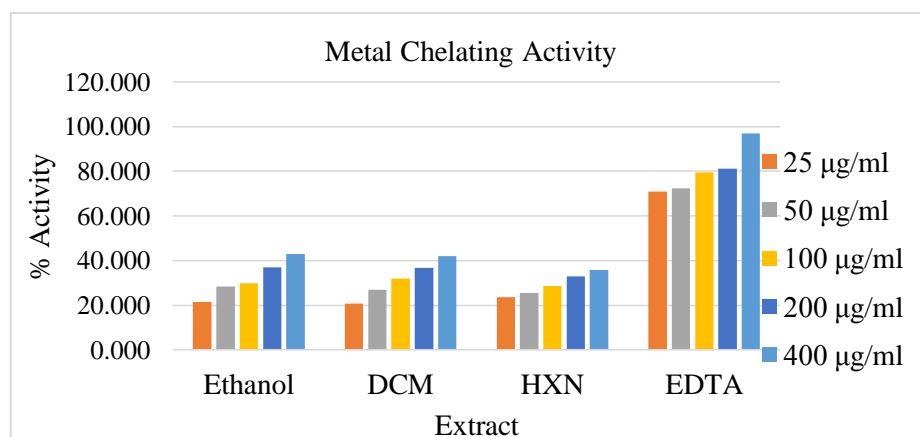
with the phospholipid bilayer of the cell membrane. Researchers reported that where they bring about their effect, causing either an increase in ion permeability and leakage of vital intracellular constituents, or impairment of the bacterial enzyme systems (Wendakoon et al., 1995; Malherio et al., 2012).

Natural or synthetic antioxidant compound capability of quenching the reactive oxygen/nitrogen, or radicals, determined two different chemical processes: electron (ET) and hydrogen atom transfer (Apak et al., 2016). The antioxidant assay performed on the ethanol, dichloromethane, n-hexane extract of *Arbutus andrachne* L. collected in the Amasya region evidenced the presence of total antioxidant capacity via electron transfer methods. To perform DPPH, metal chelating, total flavonoid, total phenolic assay on these extracts were chosen from similar family plants works literature (Pallauf et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Fortalazes et al., 2010). The level of DPPH activity was the highest at ethanolic extracts as a good solvent for the extraction of the antioxidant moiety. The hexane extracts which solvent generally was used terpenoids extraction, exhibited lowest activity. IC<sub>50</sub> value of ethanolic extracts was higher than dichloromethane and hexane; 146.6, 200.9, 333.3 respectively. In literature was found similar results of DPPH activity (Figure 1) (Bilto et al., 2015).



**Figure 1.** DPPH radical scavenging of extracts

When the metal chelating activity was compared EDTA standart, all extracts exhibited moderated metal chelating activity. Ethanol was highest activity than others (Figure 2).



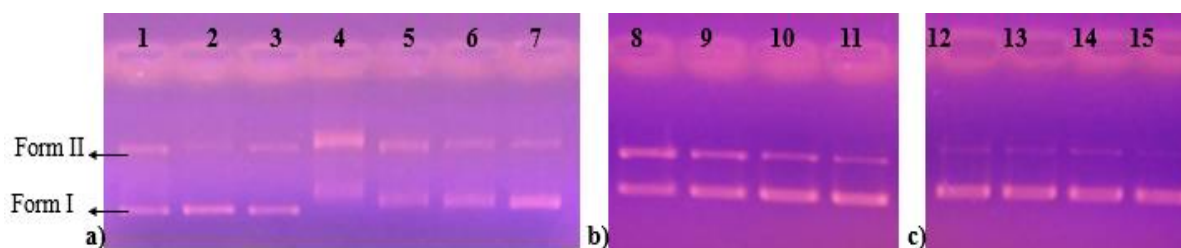
**Figure 2.** The extracts metal chelating studies.

Total flavonoid and total phenolics content were related to antioxidant capacity. Antioxidant result and these content values were shown similarities for each extract. The total phenolic ranged from 11,6 to 151,9 mg/g (gallic equivalent) and total flavonoid ranged from 65,2 to 71.6. *Arbutus andrachne* L. fruit total phenolic content was found 3.3 mg/g in 2010 (Table 2) (Serçe et al., 2010).

**Table 2.** Total phenolic and flavonoid content of extracts

	Total Phenolic Content Gallic acid equivalent mg/g	Total Flavonoid Content Quercetin equivalent mg/g
n-Hexane	11,6061	65,20905
Dichloromethane	34,2140	66,13783
Ethanol	151,8707	71,64125

Moreover, in this study, inhibitory activities of hydroxyl radical induced deoxyribonucleic acid (DNA) damage of *Arbutus andrachne* L. extracts was investigated. According to the results of agarose gel electrophoresis, extracts were dissolved in DMSO and 0.25 µg/µL plasmid DNA pUC18 was treated with 12.5, 25, 50 and 100 mg/mL extracts respectively (Figure 3).



**Figure 3.** Gel image of extracts of *Arbutus andrachne* L.

- a) Ethanol extract, Lane 1: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pUC18 plasmid DNA; Lane 2: pUC18 plasmid DNA control; Lane 3: DMSO control; Lane 4-7: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pUC18 plasmid DNA and different concentration of ethanolic extracts (12,5-100 mg/mL)
- b) Lane 8-11: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pUC18 plasmid DNA and different concentration of diclorometanoic extracts (12,5-100 mg/mL)
- c) Lane 8-11: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pUC18 plasmid DNA and different concentration of n-Hexanolic extracts (12,5-100 mg/mL)

Lane 2 and lane 3 was run with untreated pUC18 plasmid DNA as a control, while lanes 4-15 pointed out plasmid DNA interacted with increasing concentrations of the extracts in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condition. Increasing doses of *Arbutus andrachne* L. extracts had a protective effect on hydroxyl radical mediated plasmid DNA damage, but a low concentration of propolis extract had no protective effect on plasmid DNA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions. It appears that extracts of ethanol, diclorometan and n-hexane, exhibit relatively similar effects against plasmid DNA. The extracts did not cause changed in Form I DNA (supercoil) but trasferred from Form II DNA (open circular). The extracts have resulted in the cleavage of the plasmid DNA hence converting the plasmid form I to either form II and/or form III. As the concentrations of ethanol diclorometan and n-hexane extracts increased, the mobility and band density of form I DNA increased slightly.

## CONCLUSION

Several in vitro studies conducted with different extracts of parts of *Arbutus* species. Concerning the biological activity of usually *Arbutus unedo* extracts, the majority of studies reported data based on antibacterial and antioxidant activity. We determined to total phenolic, total flavonoid and antioxidant activity of each extract as prepared from the n-hexane, dichloromethane, and ethanol. The ethanol extract was important not only suitable solvent of flavonoid and phenolic content but also antioxidant activity.

This study showed that *Arbutus andrachne* L. species belonging to the Ericaceae family have *in vitro* significant biological activities. In conclusion, *Arbutus andrachne* L. might be considered as a potential source which could be developed as precursors for antimicrobial and antioxidants drugs. After additional studies should be performed to analyse cytotoxic and pharmacological properties.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

## REFERENCES

- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5): 997-1027.
- Ayvaz MÇ, Ömür B, Ertürk Ö, Kabakçı D 2018. Phenolic profiles, antioxidant, antimicrobial, and DNA damage inhibitory activities of chestnut honeys from Black Sea Region of Turkey. *Journal Food Biochemistry*, 2018: 1-10.
- Asmae E, Amina CH, Hakima S, Abdellatif H, Abdeslam E, Saad I, Mohamed L, Mohammed L, 2012. Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. *African Journal of Microbiology Research* 6: 1283–1290.
- Baytop T 1999. *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*, Nobel Medical Press, Istanbul.
- Beattie J, Crozier A, Duthie GG 2005. Potential health benefits of berries. *Current Nutrition & Food Science*. 1: 71.
- Bilto YY, Alabdallat NG, Salim M 2015. Antioxidant properties of twelve selected medicinal plants commonly used in Jordan. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2): 121-130.
- Bouyahya A, Moussaoui NE, Abrini J, Bakri Y, Dakka N 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *British Biotechnology Journal*, 14(3): 1-10.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT—Food Science Technology*, 28: 25–30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement*. M100-S20, Vol:30 No: 1.
- Decker EA, Welch B 1990. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle. *Food Journal Agriculture Food Chemistry*, 38: 674–677.
- Delgado-Pelayo R., Gallardo-Guerrero L., Hornero-Méndez D 2016. Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits *Food Chemistry*, 199: 165-175.
- Ergun N, Okmen G, Yolcu H, Cantekin Z, Ergun Y, Isik D, Sengul P 2014. The enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities of *Arbutus andrachne* L. leaf and flower and its antibacterial activities against mastitis pathogens. *European Journal of Experimental Biology*, 4(1): 227-232.
- Erkekoglou I, Nenadis N, Samara E, Mantzouridou FT 2017. Functional teas from the leaves of *Arbutus unedo*: phenolic content, antioxidant activity, and detection of efficient radical scavengers. *Plant Foods Human for Nutrition*, 72: 176-183.
- Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, Ozensoy TS 2009. In vitro activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Acta Parasitology*, 33: 263–265.
- Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC 2012. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Natural Product Research*, 26: 1558–1560.
- Fonseca DFS, Salvador ÂC, Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Silvestre AJD, Rocha SM 2015. Bioactive phytochemicals from wild *Arbutus unedo* L. Berries from different locations in Portugal: quantification of lipophilic components. *International Journal of Molecular Science*, 16: 14194-14209.
- Fortalezas S, Tavares L, Pimpão R, Tyagi M, Pontes V, Alves P, Santos C 2010. Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2): 214-229.
- Gül M, Cali İÖ, Cansaran A, İdil Ö, Kulu İ, Çelikoğlu U 2017. Evaluation of phytochemical content, antioxidant, antimicrobial activity and DNA cleavage effect of endemic *Linaria corifolia* Desf. (Plantaginaceae). *Cogent Chemistry*, 3: 1-14.
- Malheiroa R, Saa O, Pereira E, Aguiar C, Baptista P, Pereira JA 2012. *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*. 37: 473-478.
- Morgado S, Morgado M, Plácido AI, Roque F, Duarte AP 2018. *Arbutus unedo* L. From traditional medicine to potential uses in modern Pharmacotherapy. *Journal of Ethnopharmacology*, 225: 90-102.
- Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P 2009. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7): 1507-1511.
- Oyaizu M 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307–315.
- Özgen M, Torun AA, Ercişli S, Serçe S 2009. Changes in chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* fruit at different maturation stages. *Italian Journal of Food Science*, 21(1): 65-71.

- Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, Del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4): 273-281.
- Park YS, Jung ST, Kang SG, Heo BKH, Arancibia-Avila P, Toledo F, Drzewiecki J, Namiesnik J, Gorinstein S 2008. Antioxidants and Proteins in Ethylenetreated Kiwifruits. *Food Chemistry*, 107: 640–648.
- Saklani A, Kutty SK 2008. Plants-derived compounds inclinical trials. *Drug Discovery Today*, 13: 161–171.
- Serçe S, Özgen M, Torun AA, Ercişli S 2010. Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. Ericaceae) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6): 619-623.
- Sıcak Y, Eliuz AER 2019. Determination of the phytochemical profile, in vitro the antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Arbutus andrachne* L. wood growing in Turkey. *Turkish Journal of Forestry*, 20(1): 57-61.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49–55.
- Tenuta MC, Tundis R, Xiao J, Loizzo, MR, Dugay A, Deguin B 2019. *Arbutus* species (Ericaceae) as source of valuable bioactive products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6): 864-881.
- Wendakoon CN, Sakaguchi, M. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *J. Food. Prot.*, 1995, 58, 280-283.
- World Health Organization (WHO). 2002–2005. WHO medicine strategy. Geneva.

## Gemilerde korozyon ve korunma yöntemleri

Nimet Dilek Çelik

İskenderun Teknik Üniversitesi, Barbaros Hayrettin Gemi İnşaatı ve Denizcilik Fakültesi, Denizcilik İşletmeleri Yönetimi, Hatay, Türkiye

Sorumlu yazar e-mail: celiknd@outlook.com

### Özet

Korozyon, malzeme yüzeyinden başlayan ve derinliklerine doğru ilerleyen, kimyasal ve elektro-kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan dinamik bir süreçtir. Metal ve alaşımlarının ortam ile reaksiyonları sonucu fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri değişime uğramaktadır. Korozyon nedeniyle meydana gelen malzeme, enerji ve emek kaybının yıllık oranı ülkeler bazında, gayri safi milli hâsılatının yaklaşık %5'i düzeyindedir. Bu oran ABD'de 444 milyar \$ ile GSMH'nin %3,1'ne tekabül etmektedir. ABD Donanmasının, donanma korozyon önleme ve kontrol departmanı tarafından hazırlanan 2010 yılı raporunda toplam korozyon maliyeti 7,36 milyar \$ olarak açıklanmıştır. Bu miktar içerisinde ilk sırada 3,2milyar \$ (%43) ile Gemi Donanması yer almaktadır.

Korozyonun gemilerde sebep olduğu malzeme, işçilik, zaman ve bilgi kayıplarının önüne geçilerek, ülke ekonomisine katkısı önemli bir hedefdir. Yüksek onarım maliyetinin ortadan kaldırılması için korozyon hasarlarının tespit edilmesi ve bu hasarların giderilmesi gerekmektedir. Korozyona karşı katyonik koruma, boyama ve bu yöntemlerin kombine kullanımı en etkili yöntemlerdir. Ancak korozyonun yavaşlatılması veya önüne geçilebilmesini sağlayacak yeni yöntemlerin araştırılması gerekmektedir. Böylelikle kombine geliştirilecek çözümlerle korozyon kayıplarını en aza indirebilmek mümkün olacaktır. Bu çalışmanın amacı gemilerdeki korozyona karşı mevcut etkin yöntemlere ek farklı yeni bakış açıları incelemektir. Yeni geliştirilmiş yöntemlerle ülkemizde korozyondan kaynaklanan kayıpları en aza indirilmesi için kurumlar, üniversiteler ve endüstri işbirliğiyle ortak bir çalışma ortamı oluşturmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Korozyon, korozyondan korunma, katodik koruma.

### Corrosion and corrosion protection methods in ships

#### Abstract

Corrosion is a dynamic process that occurs as a result of chemical and electrochemical reaction that begins on the material surface and processes to the depth of the material. The physical, chemical and mechanical properties of metals and its alloys are changed as a result of reaction with environment. The annual rate of material, energy and labor loss due to corrosion is about 5% gross national product in countries. This figure correspond to 3.1% of the gross national product with 44 billion in US. According to the 2010 report prepared by the US Navy's navy corrosion prevention and control department, the total corrosion cost was \$ 7.36 billion. Within this amount, The Ship Navy takes the first place with \$ 3.2 billion (%43). The loss of materials, labor, time and information caused by the corrosion on ships is an important target for the country's economy. In order to eliminate the high cost of repair, it is necessary to determine the corrosion damage and these damages must be eliminated. Cationic protection and staining methods against corrosion and combined of these methods are the most effective methods. However, new methods should be investigated to inhibit or prevent corrosion. Thus, it will be possible to minimize the corrosion losses with the solutions to be developed. The aim of this study is to examine new perspectives in addition to the existing effective methods against corrosion in ships. In order to minimize the losses caused by corrosion with new developed methods, it should establish a common working environment with the cooperation of institutions, universities and industry in our country.

**Keywords:** Corrosion, corrosion prevention, cathodic prevention

#### GİRİŞ

Korozyon, malzeme yüzeyinden başlayan ve malzeme derinliklerine doğru ilerleyen, kimyasal ve elektro-kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan dinamik bir süreçtir (Akat O ve Yalçın H, 1988). Korozyon metal ve alaşımlarının fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerini değişime uğratmaktadır. Korozyon nedeniyle meydana gelen malzeme, enerji ve emek kaybının yıllık oranı ülkeler bazında, gayri safi milli hâsılatının yaklaşık %5'i düzeyindedir (Akdoğan Eker A, 2008). Bu oran ABD'de 444 milyar \$ ile GSMH'nin %3,1'ne tekabül etmektedir (Webster D, 2010). ABD Donanmasının, donanma korozyon önleme ve kontrol departmanı

tarafından hazırlanan 2010 yılı raporunda toplam korozyon maliyeti 7,36 milyar \$ olarak açıklanmıştır. Bu miktar içerisinde ilk sırada 3,2 milyar \$ (% 43) ile Gemi Donanması yer almaktadır (Thomas ED, 2010). Korozyonun fiziksel korozyon, kimyasal korozyon ve elektro-kimyasal korozyon olmak üzere üç çeşit oluşum mekanizması vardır. En sık rastlanan korozyon çeşitleri tablo 1’de gösterilmiştir (Nimmo B. ve Hinds G, 2003).

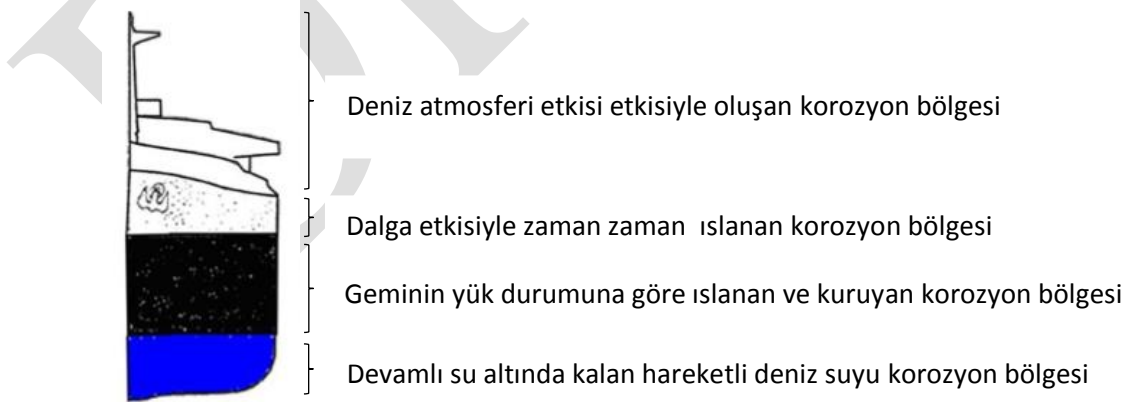
**Tablo 1. Korozyon Çeşitleri**

Korozyon Çeşidi	Açıklama
Homojen Dağılımlı Korozyon	
Galvanik Korozyon	Ayrı metallerin bir araya gelmesi ile oluşan korozyondur.
Aralıklı Korozyon Çukurcuklu Korozyon Taneler Arası Korozyon	Geometrik ya da kimyasal faktörler tarafından oluşturulan korozyon çeşitleridir.
Gerilmeli Korozyon Hidrojen Gevrekleşmesi Korozyonlu Yorulma	Mekanik faktörlerin, çatlak tipi hasarlara yol açmasıyla oluşan korozyon çeşitleridir.
Seçici Korozyon	Özel kimyasal etkiler tarafından oluşturulan korozyondur.
Erozyonlu Korozyon	Akış etkileri tarafından oluşturulan korozyondur.
Mikrobiyolojik Korozyon	

Tablonun sol sütununda korozyon çeşitleri sağ sütununda ise korozyonun açıklaması bulunmaktadır.

Denizde meydana gelen korozyon, metal atomlarının denizin çözücü ortamında elektronlarını kaybederek iyonize olmasıyla meydana gelmektedir. Bu olaya metalin çözünmesi ya da oksitlenmesi de denilmektedir. Elektron kaybeden metal anodu oluşturur. Deniz suyunun içeriğinde bulunan yüksek klor iyonları ve klor bileşikleri, çözülmüş oksijen, oldukça yüksek ve kararlı pH, yüksek elektrik iletkenliği, biyoorganizmalar, ortama bağlı yüksek nem, sıcaklık ve akış hızı metal ve alaşımlarının üzerinde korozif etki yaratan önemli bir unsurlardır (Craig BD ve ark., 2006). Denizel korozyon deniz yapılarındaki her bir mekanik etmeni farklı şekillerde etkilemektedir. Örneğin, çelik bir yapının deniz atmosferi, çarpma bölgesi, med ve cezir alanları, durgun su ve çamur hizasındaki ortalama korozyon hızları farklıdır (Kalay Üçüncü E, 2006).

**Şekil 1. Gemi gövdesinin korozyon bölgeleri (Milli Eğitim Bakanlığı, 2013)**



Denizel ortamlarda başlıca korozyon türleri taneler arası korozyon, çukurcuk, aralık korozyonu, hidrojen gevrekleşmesi, korozyonlu yorulma, seçici korozyon, erozyonlu korozyon, gerilmeli korozyon ve biyolojik korozyondur. Bunlara ek galvanik korozyon paslanmaz çelik bağlantı elemanlarında ve kavite korozyonu pervane, pompa gibi ekipmanlarında görülmektedir (Ürgen M ve Çakır AF, 1990).

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma gemi korozyonu ve korozyon koruyucu yöntemleri konusunda literatür derleme çalışmasıdır. Çalışmada Amerikan Deniz Kuvvetleri'nin düzenlediği önlem dökümanları, korozyon kriterleri, ulusal planlama ve strateji yönetim bilgileri incelenmiştir. Geçmiş ve güncel korozyonla mücadele dökümanları ve önlemlerin neler olabileceği araştırılmıştır.

### **BULGULAR ve TARTIŞMA**

Denizel ortamdaki yıkıcı korozif etkiden korumanın ilk aşaması uygun malzeme seçimi ve etkin koruyucu stratejilerin geliştirilmesidir. Ancak bunlar tek başına yeterli olmamaktadır. Malzeme kaybı, çukur derinliği ve çatlaklar dahil olmak üzere korozyonun etkisini tahmin etmek için güçlü araçlar veya modeller gerektirmektedir. Metalik yapıların korozyona karşı korunmada mevcut en önemli yöntem kaplama (coating) yöntemidir. Metal ve korozif ortam arasındaki bağlantıyı kesmek için bir ara yüz oluşturmak temel prensiptir. Korunacak yüzeyler korozyona dayanıklı metal malzemelerle (çinko, kadmiyum, kurşun, bakır, krom, kalay, nikel, altın) elektroliz yolu ile kaplanır. Alaşım yaparak kaplama yöntemi etkili olmasına rağmen ekonomik açıdan pahalı bir yöntemdir. Son yapılan çalışmalarda kullanılan alaşımların ortama maruziyeti ve kullanım ömrü ile ilgili korozyon çeşidine özgü tahmin modelleri geliştirilmiştir (Melchers RE, 2019). Bu modeller koruyucu kaplamaların ve korozyon önleyici maddelerin anlık korozyon oranının saptanmasına ve korozyon etkinliğinin ölçülmesine olanak tanıyabilmektedir.

Korozyonun kontrolü için metal yüzey ve korozif ortamın temasının önlenmesi iki ayrı yüzey kaplama yöntemi ile yapılmaktadır. Bu iki yöntem hem ayrı ayrı hem de birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan ilki boyalarla kaplama yapmaktadır. Organik boyalar korozif yüzeye metal arasında engelleyici bir tabaka oluşturarak korozyonu yavaşlatmaktadır. Bu yöntem uygulamanın kolay, düşük maliyetli, istenilen koruma derecesinin bir çok duruma uyabilmesi, tamir-bakımının kolaylığı ve dekoratif olması açısından tercih edilmektedir. Son yıllarda hem boya içeriği hem de uygulama yöntemi açısından öne çıkan çalışmalar bulunmaktadır. Hidrofobik kaplama teknolojisinin gelişmesiyle silikon akril boyalara göre korozyon direnci yüksek ve bariyer üstünlüğü olan kaplamalar geliştirilmiştir. Polisiloksan kaplamalar, silikon bazlı malzemelerin ısıya ve oksidasyona dayanıklı özelliklerinden yararlanılarak geliştirilen yüksek performanslı kaplamalardır. Polioksan küçük moleküllü aminoalkoksisisilanlarla tepkimeye sokulmuş organik-fonksiyonel epoksiler veya akrilatlar ile organosilan içeren iki komponentli hibrit kaplamalardır (Axelsen SB ve ark., 2010). Bir sikloalifatik epoksi ve bir amino-fonksiyonel polisiloksan kullanılarak iki bileşenli polisiloksan kaplama elde edilen bir çalışmada iki günlük korozyon daldırma testinin 8. saatinde alkid kaplı örneklerin paslanmaya başladığı gözlenmiştir. Tek ve iki bileşenli polisiloksan kaplı örneklerde ise paslanma belirtileri daldırma testinin 32-40. günlerinde açığa çıkmıştır (Sun X ve ark., 2017). Buna göre yüksek polisiloksan içerikli bu formülasyon paslanmaya direnç, artmış hidrofobiklik ve bastırılmış çapraz bağlantı yoğunluğu sağlamaktadır. Polisiloksan kaplamaları son yıllarda Amerikan Donanması'nın gemi yüzey kaplamalarında kullanılmaktadır (Lockwood P ve ark., 2016).

Mikrobiyolojik aktivite gemilerde çukur korozyonunun önemli bir sebebidir. Mikrobiyolojik türler ve bakterilerin oluşturduğu mikroskopik biyofilmin metal yüzeye yapışması sonucu hızlıca paslanma reaksiyonu başlamaktadır (Liengen T ve ark., 2014). Nanopartikül içeren kaplamalar çeşitli metal ve alaşımlarının korozyonunu korumada kullanılmaktadır. Ag-SiO<sub>2</sub> ve Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KH56/-SiO<sub>2</sub> nanoparçacıkları antimikrobiyal korozif etkisini araştırılmıştır. Ye L ve ark. (2014), Ag-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin akrilik kaplı çeliğin bakır biyositlerle kaplı çeliğe karşı mikrobik korozyonu üzerindeki etkilerini elektrokimyasal gürültü analizi (ENA) ile incelenmiştir. Ag-SiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin, bakır biyositleriyle karşılaştırıldığında uzun vadeli korozyon korumasını artırabildiğini göstermişlerdir. SiO<sub>2</sub> nanoparçacıkları içeren bir başka çalışmada, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KH560/SiO<sub>2</sub>-çelik modifiye metal yüzeyinin ıslanabilirlik deneyinin sonuçları su damlacıkları arasında, 158° 'nin üzerinde statik temas açılı güçlü bir itici kuvvetini olduğunu saptamışlardır. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KH56/-SiO<sub>2</sub> kompozit filminin korozyon direnci ve korozyon akımı yoğunluğunu değerlendirilmiştir. Buna göre kompozitin, metalin korozyon hızının azaltırken matrisin korozyon performansının arttığı bulunmuştur (Zahao W ve ark., 2019). Bu çalışmalar nanopartiküllerin gemi korozyonunda etkili olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Kaplama teknolojilerinde termal sprey farklı püskürtme kabiliyeti ile son yıllarda öne çıkan uygulama yöntemlerinden biridir. Termal sprey, püskürtme tabancası aracılığıyla ısı girdisi ile kaplama malzemesinin



ergitilmesi ve yüzeye ivmelendirilmesi esasında dayanmaktadır. Termal spreyleyler üzerinde su tutmayan, kolay temizlenebilen hidrofobik, süperhidrofobik ve hidrofilik kaplama araştırmaları sürdürölmektedir. Özellikle nano-TiO<sub>2</sub> kaplamalar bu anlamda yoğun ilgi görmektedir (Altuncu E ve Üstel F, 2017).

Kaplama yöntemlerin bir diğeri metalin deniz içinde çözünmesini engelleyen katodik yöntemdir. Korozyonla mücadelede en etkili yöntem katodik korunmadır. Katodik koruma uygulanması özellikle yüksek seviyedeki su akımı dolayısıyla pervane hareketinin olduğu gemi kış bölgesinde, taban yüzeylerinde, mavnalar ve iskele ayaklarında, petrol depolama tanklarında, yer altı iletişim ve güç kablolarında, ısı değiştiricilerin iç yüzeyinde, buhar kazanlarında kullanılır (Metin E, 2006). Yapılan çalışmada tankerlerde ortalama yüzey pürüzsüzlüğünün korozyon kaynaklı bozulmasının katodik koruma yapılmayanlarda katodik koruma yapılanlara göre yılda 3 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Kalay Üçüncü E, 2006). Yine aynı çalışmada yüksek performanslı boyalar ve katodik korumanın birlikte kullanılmasıyla yüzey pürüzlülüğünü 3 kattan fazla azalttığı saptanmıştır. Son yıllarda yeni katodik yöntemler uygulanmayan başlanmıştır. ICCP yöntemi gemilerin özellikle gövde kısımlarından (impressed current cathodic prevent) kullanılan katodik yöntemdir. ICCP sistemi geminin su ile temasından oluşun elektriklenmeyi nötrleştirici ters akım uygulayarak korozyonun engellenmesi esasına dayanmaktadır. ICCP, klasik katodik yöntemi göre ekonomik açıdan üstünlük taşımakla beraber yüksek tonajlı büyük gemilerde tercih edilmelidir (Elçiçek H ev ark., 2011). ICCP sisteminin geliştirilmesini sağlayacak bir çalışmada denizde çoklu faktörlere bağlı değişken korozyon potansiyeli ile ICCP potansiyel ve akım yoğunluğu analizini içeren bir algoritma önerilmiştir (Sedahmed GH ve ark., 2010). Önerilen bu algoritmayla pH, hız vs. gibi anlık değişimlerde ICCP sisteminin etkili bir şekilde kontrolü sağlanması öngörülebilir.

## SONUÇ

Korozyon tamamen engellenebilir ya da geriye döndürülebilir bir mekanizma değildir. Ancak korozyonun etkileri ve oranı çeşitli yöntemlerle azaltılabilir. Teknolojik ilerlemenin son hızla sürdüröğü bu yüzyıllarda yeni tekniklerle korozyonun sebep olduğu malzeme, işçilik, zaman ve ekonomik kayıplar engellenebilir. Özellikle süperhidrofobik teknoloji ve nanopartiküllerle yapılan çalışmalar gelecekte gemi endüstrisine uyarlandığında korozyonla mücadelede önemli avantajlar sağlayacaktır. Dünyada önde gelen üniversite ve araştırma kurumlarında bu teknolojiler üzerinde kapsamlı projeler ve bilimsel faaliyetler yürütölmektedir. Ülkemizde de üniversiteler ve endüstri işbirliğiyle bu alanda ortak bir çalışma ortamı oluşturmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Akat O, Yalçın H 1988. Katodik koruma konusundaki yeni gelişmeler, Korozyon Derneği, O.D.T.Ü., 1. Korozyon Sempozyumu Bildirileri, Ankara
- Akdoğan Eker A 2008. Korozyon seminer notları.
- Altuncu E, Üstel F 2017. Termal spreyley kaplama sektöründe son gelişmeler, Metalurji, 184; 43-47.
- Üçüncü EK 2006.
- Axelsen, SB, Johnsen, R, Knudsen, OØ, 2010. Adhesion properties of polysiloxane topcoats. Corrosion, 66
- Craig BD, Lane RA, Rose DH 2006. Corrosion prevention and control: A program management guide for selecting materials, AMMTIAC
- Elçiçek H, Karaoğlanlı AC, Demirel B 2011. Gemicilik endüstrisine korozyon problemi ve katodik koruma uygulamaları, 6th International Advanced Technologies Symposium, Elazığ.
- Gemilerde korozyonu önleme 2013, Milli Eğitim Bakanlığı. Erişim: egep.meb.gov.tr/mte\_program.pdf
- Kalay Üçüncü E 2006. Overhole Giren Gemilerde Görölen Korozyon Hasarları ve Bu Hasarların Giderilme Yöntemleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul
- Le Y, Hou P, Wang J, Chen JF 2010. Controlled release activite antimicrobial corrosion coating with Ag/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles. Material Chemistry and Physics, 351-355
- Liengen T, Feron D, Basseguy R, Beech, IB 2014. Understanding Biocorrosion. European Federation of Corrosion Publications, Number 66.
- Melchers RE 2019. Predicting long-term corrosion of metal alloys in physical infrastructure. NPJ Materials degradation 3, article number:4
- Metin E 2006. Katodik koruma sistemleri, yeni uygulamalar ve ekonomik analiz, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Nimmo B ve Hinds G 2003. Beginners guide to corrosion, life management of materials in corporating, The National Corrosion Service(LMM-NCS), U.K.
- Sedahmed GH, Farag HA, Hassan MA, Hassan I 2010. Effect of the relative velocity between ship hull and seawater on the performance of sacrificial cathodic protection, Anti-Corrosion Methods and Materials.
- Sun X, Turnage S, Iezzi EB, Yang Y, Chang B, Muthgowda NC, Balijepalli SK, Dhuyvetter N, Wang LP, Solanki NK, Rykaczewski K 2017. Water permeation and corrosion resistance of single- and twocomponent hydrophobic polysiloxane barrier coatings. J. Coat. Technol. Res.
- Thomas ED 2010. Department of the navy corrosion prevention & control, Current U.S. Navy Corrosion Concerns.
- Ürgen M, Çakır AF 1990. Denizel ortamda paslanmaz çeliklerin korozyon davranımı, Türk Loydu Vakfı Seri Konferanslar IV, İstanbul.
- Webster D 2010. Pipeline construction drivers, Corrosion Cost and Engineering Issues, Worley Parsons Resources and Energy.
- Zhao W, Zhu R, Jiang J, Wang Z 2019. Enviromentally-friendly superhydrophobic surface based on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KH56/-SiO<sub>2</sub> elektrokinetic nanoparticle for long-term anti-corrosion in sea water

DRAFT

## ***Trametes versicolor* özütünün sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitesi**

Ayfer Serindağ<sup>1</sup>, Elif Apohan<sup>1,2\*</sup>, Özfer Yeşilada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya, Türkiye

<sup>2</sup>Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Malatya, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: elif.apohan@inonu.edu.tr, elif.apohan@ozal.edu.tr

### **Özet**

Bu çalışmada Hatay ilinden izole edilen *T. versicolor* kullanılmıştır. Bu fungusdan elde edilen özütün akciğer kanser hücreleri (A549) ve akciğer sağlıklı epitelium hücreleri (BEAS-2B) üzerine sitotoksik etkisi tripan mavisi ve MTT yöntemleri ile araştırılmıştır. Özütün A549 üzerine IC<sub>50</sub> değeri 48 saatte 98,1 µg/mL olarak bulunmuştur. Diğer yandan, BEAS-2B hücreleri için bu değer 32,8 µg/mL'dir. Kaspaz-3 aktivite analizi özüt muamelesinin kaspaz-3 aktivitesinde yaklaşık 3 kat artışa neden olduğunu göstermiştir. MİK değerlerinin saptanmasında mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları fungal özütün *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerine antimikrobiyal etki yaptığını göstermiştir. Özütün *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerine MİK değerleri sırasıyla 12.5, 12.5, 12.5, 6.25 ve 6.25 mg/mL olarak saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal, A549, BEAS-2B, kaspaz, sitotoksik, *Trametes versicolor*

### **Cytotoxic and antimicrobial activity of the extract of *Trametes versicolor***

#### **Abstract**

In this study, *T. versicolor* isolated from Hatay was used. The cytotoxic effect of the extract from this fungus against human lung cancer cells (A549) and human lung epithelial cells (BEAS-2B) was investigated using trypan blue and MTT methods. The IC<sub>50</sub> of the extract was 98.1 µg/mL for A549 cells at 48 h. On the other hand, this value was 32.8 for BEAS-2B. Caspase-3 activity analysis showed that extract treatment resulted in an approximately 3-fold increase in caspase-3 activity. Microdilution method was used to determine the MİK values. Antimicrobial activity studies showed that fungal extract had antimicrobial activity on *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *C. albicans* and *C. tropicalis*. The MIC values of the extract were determined as 12.5 mg/mL, 12.5 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL and 6.25 mg/mL on *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhi*, *C. albicans* and *C. tropicalis*, respectively.

**Keywords:** Antimicrobial, A549, BEAS-2B, caspase, cytotoxic, *Trametes versicolor*

#### **GİRİŞ**

Uzakdoğu'da funguslar uzun yıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Son yıllarda Avrupa, Amerika gibi batılı ülkelerde de funguslar; besin olarak kullanımının yanı sıra tedavi için kullanılmaya başlanmıştır (Chatterjee ve ark., 2011; Roupas ve ark., 2012). Dünyanın birçok yerinde fungusların ve metabolitlerinin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımı araştırılmaktadır. Fungusların ve metabolitlerinin en önemli özelliği olarak anti-neoplastik etkisi son yıllarda bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Fungus metabolitleri genellikle adaptojen ve immünoestimulan olarak kullanılmaktadır ve şimdilerde klinik kullanımlarda en yararlı antitümör ajan olduğu düşünülmektedir (Jose ve Janardhanan, 2000). *T. versicolor* polisakkaritlerinin antioksidan etkileri oldukça fazladır. Kan şekerini düşürürler; akciğer, meme, mide kanseri gibi tümör hastalıklarının ve hepatit B, bazı immün yetmezlik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılabilirler (Li ve Xu, 1987; Qian, 1997; Ren ve ark., 1993). *T. versicolor* PSK'sının (protein bağlı polisakkarit) çeşitli hücre hatlarının hücre döngüsünde durmasını sağlayarak, proliferasyonunu inhibe ederek ve apoptozun indüklenmesini sağlayarak direkt olarak antitümör etki yaptığı gösterilmiştir (Hirahara ve ark., 2011, Jiménez-Medina ve ark., 2008). Antibakteriyel bileşikler çok çeşitli olmasına rağmen, ilk seçenek olan antibiyotiklere bakteriyel direnç gün geçtikçe artmaktadır (Sharma ve ark., 2014). Antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanılması sonucunda, çoklu ilaç direncinin de görüldüğü antibiyotiklere karşı dirençli suşlar gelişmiştir (Kumar ve Schweizer, 2005). Önceden kolaylıkla tedavi edilebilen hastalıklar, günümüzde gelişen antibiyotik direncinden dolayı ciddi bir problem olmuştur (Bota ve ark., 2003). Antimikrobiyal tedavinin etkinliğinin artması için yeni antimikrobiyal

özelliikli maddelerin geliştirilmesi gereklidir (van der Waaij ve Nord, 2000). Fungusların tıbbi özelliklerinden dolayı bu çalışmada doğadan izole edilen *T. versicolor*'un katı faz fermentasyonu sürecinde elde edilen özütünün kanser hücreleri üzerine sitotoksik ve mikroorganizmalar üzerine de antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır.

## **MATERYAL VE METOT**

### **Çalışmada Kullanılan Fungus**

Çalışmada Hatay'dan izole edilmiş *Basidiomycetes* sınıfına dahil bir beyaz çürükçül fungus olan *Trametes versicolor* kullanıldı. Bu fungus İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında daha önceden izole edilmiştir ve saf kültür olarak muhafaza edilmektedir.

### **Çalışmada Kullanılan Özütlerin hazırlanması**

Katı besiyeri, 3.5 g buğday kepeği+ 1.5 g soya unu/250 mL erlenlerde olacak şekilde hazırlandı ve 15 mL distile su ile nemlendirildi. Steril edilen besiyerlerine 2 mL fungus ekildi ve örnekler 30°C'de statik olarak 5 gün inkübe edildi. İnkübasyonun 5. gününde her bir erlene 40 mL distile su eklenerek, kültür öze yardımıyla parçalandı ve 30°C'de 2 saat çalkalandı. Çalkalandıktan sonra kültür filtre edildi. Filtrat 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak liyofilize edildi. Liyofilize edilmiş örnekler 1g/20 mL RPMI 1640 olacak şekilde çözüldü. Çözülen örnekler steril filtrelerden geçirildikten sonra sitotoksikite ve antimikrobiyal etki çalışmalarında kullanıldı.

### **Kullanılan Hücre Hatları ve Kültürü**

Çalışmada akciğer kanser hücresi (A549) ve akciğer sağlıklı epitelium hücresi (BEAS-2B) kullanıldı. A549 hücreleri Dr. Fikretin Sahin tarafından (Yeditepe Üniversitesi, Gneetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul) sağlandı. Hücreler RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C etüvde inkübe edildi. Hücreler tripsin enzimi yardımıyla kültür flasklarından alındı ve steril santrifüj tüplerinde 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra dipte kalan hücreler PBS ile yıkandı ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pelet 15 mL besiyeri içeren 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flaskına alındı.

### **Hücre Canlılığının Saptanması**

Hücre canlılığı tripan mavisi yöntemiyle saptandı. Bu amaçla hücre ekilmiş hücre kültür plakları %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra A549 ve BEAS-2B hücreleri fungus özütleri ile 24 saat muamele edildi. Daha sonra 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler falkonlara toplandı ve santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. PBS ve Tripan mavisi boyası eklendikten sonra 5 dakika beklendi ve hemositometrede canlı ve ölü hücreler sayıldı.

### **MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Saptanması ve Kaspaz-3 Aktivitesinin Ölçümü**

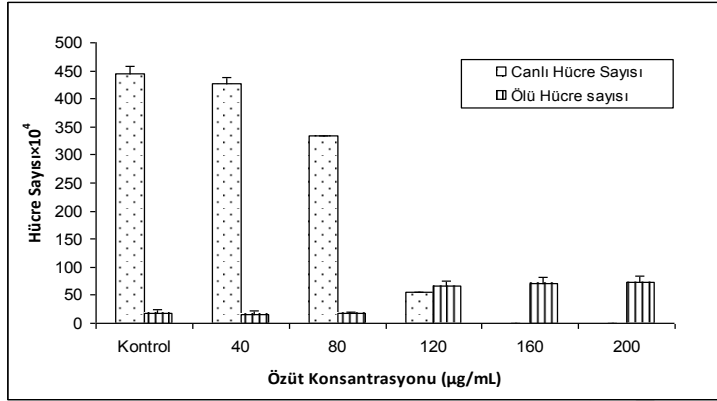
Çalışmalar 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına yapıldı. A549 ve BEAS-2B hücreleri 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde 24 saat inkübasyondan sonra fungus özütleri ile muamele edilerek inkübasyona bırakıldı. Fungus özütleri uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72. saatlerde sonuçlar alındı. Her kuyucuğa 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) solüsyonundan (5mg/mL) eklenip ışık almayacak şekilde 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklardaki sıvı döküldü, 100 µL DMSO eklendi ve 5 dk 100 rpm'de çalkalanıp 570 nm'de absorbanları ölçülerek değerlendirildi (Apohan ve ark., 2017). Hücrelerdeki kaspaz-3 aktivitesindeki değişiklikler kaspaz-3 kolorimetrik yöntem kiti (BioVision Araştırma Ürünleri, ABD) kullanılarak saptandı.

### **Kullanılan Test Mikroorganizmaları ve Antimikrobiyal Etkisinin Saptanması**

Antimikrobiyal etki testinde *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Salmonella typhi* NCTC 8394, bakterileri ve ayrıca *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* maya türleri kullanıldı. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin izlemesi mikrodilüsyon yöntemiyle minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) saptanarak gerçekleştirildi ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlendi (Apohan ve ark., 2017).

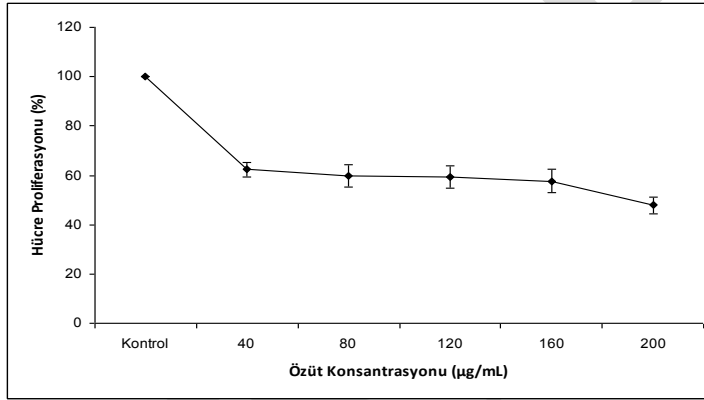
## BULGULAR VE TARTIŞMA

*T. versicolor* özütünün A549 hücreleri ve BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda özütün A549 hücreleri üzerine proliferasyonu baskılayıcı ve sitotoksik etkisinin olduğu, canlı hücrelerin azalması ve ölü hücrelerin varlığıyla saptanmıştır (Şekil 1).

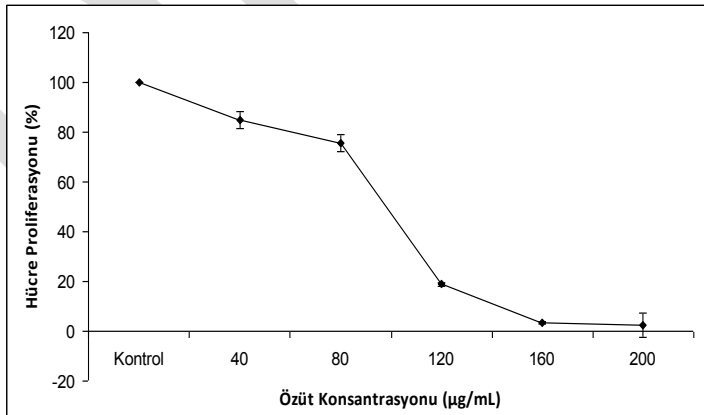


Şekil 1. *T. versicolor* özütünün A549 hücrelerine etkisi

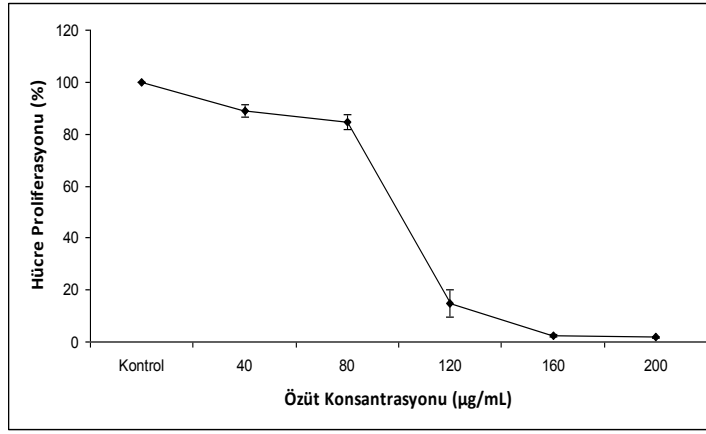
Özütün A549 hücreleriyle muamelesiyle sonucunda IC<sub>50</sub> değerleri 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 191,2 µg/mL, 98,1 µg/mL ve 99,8 µg/mL olduğu belirlendi (Şekil 2-Şekil 4).



Şekil 2. *T. versicolor* özütünün A549 hücrelerine etkisi (24. Saat)

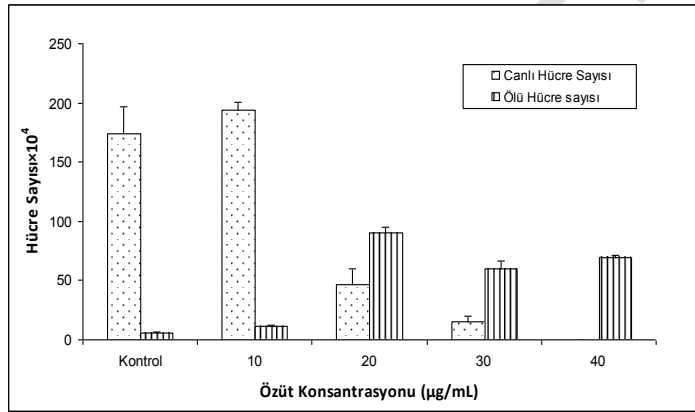


Şekil 3. *T. versicolor* özütünün A549 hücrelerine etkisi (48. Saat)



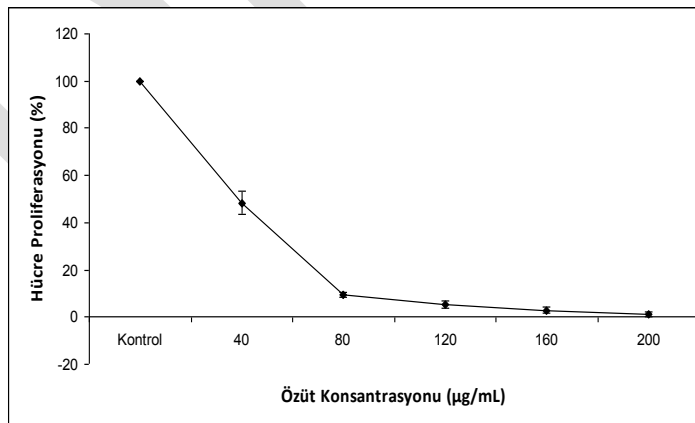
Şekil 4. *T. versicolor* özütünün A549 hücrelerine etkisi (72. Saat)

Çalışmada *T. versicolor* özütünün BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olup olmadığı da araştırılmış ve özütün BEAS-2B hücreleri üzerine de proliferasyonu baskılayıcı ve sitotoksik etkisinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 5).

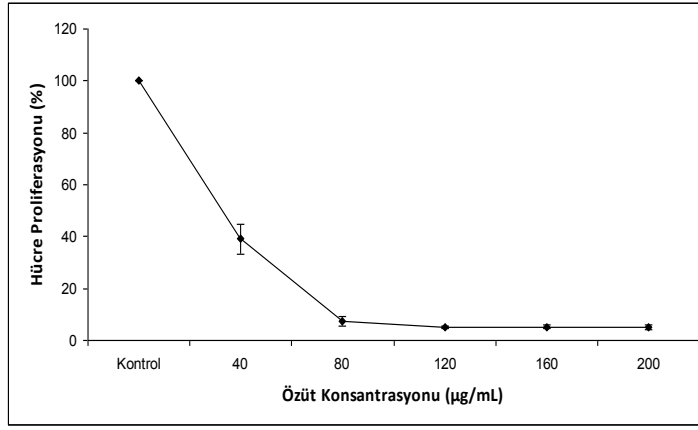


Şekil 5. *T. versicolor* (H) özütünün BEAS-2B hücrelerine etkisi

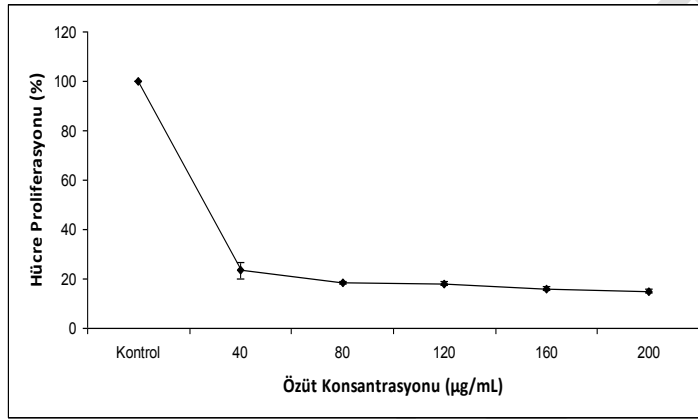
Özütün BEAS-2B hücreleriyle muamelesinden 24, 48 ve 72 saat sonra IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmış ve 24. saatte 38,7 µg/mL (Şekil 6), 48. saatte 32,8 µg/mL (Şekil 7) ve 72. saatte 26,1 µg/mL (Şekil 8) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 6. *T. versicolor* özütünün BEAS-2B hücrelerine etkisi (24. Saat)



Şekil 7. *T. versicolor* özütünün BEAS-2B hücrelerine etkisi (48. Saat)

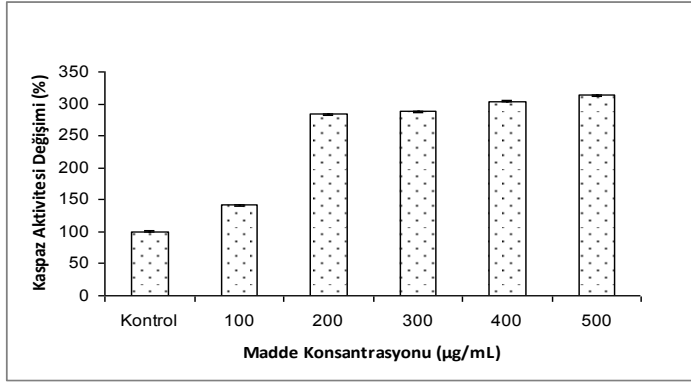


Şekil 8. *T. versicolor* özütünün BEAS-2B hücrelerine etkisi (72. Saat)

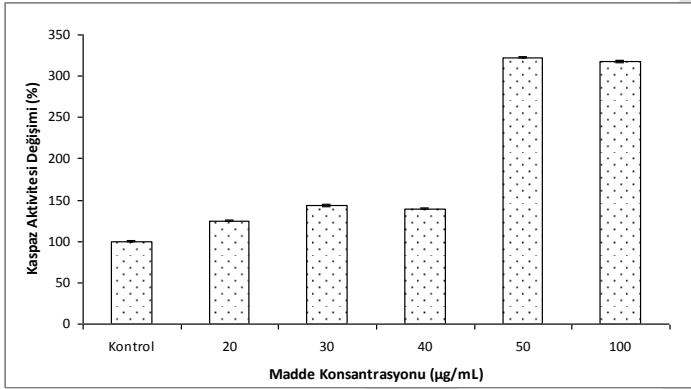
Tripan mavisi yönteminde, *T. versicolor* özütünün A549 hücrelerinde konsantrasyonla ilişkili olarak 48. saatte proliferasyonu yaklaşık %90 oranında baskıladığı belirlenmiştir. Çalışılan yüksek konsantrasyonlarda (160, 200 µg/mL) ise proliferasyonu %100 baskıladığı görülmüştür (Şekil 1). Aynı fungus özütünün MTT yönteminde 24, 48. ve 72. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır (Şekil 2-4). *T. versicolor* suşunun BEAS-2B hücreleri üzerinde de antiproliferatif ve sitotoksik etkisi gözlenmiştir (Şekil 5-8). *T. versicolor* özütünün, B hücreli lenfoma (Raji) ve iki tip promyelositik lösemi (HL-60, NB-4) hücrelerinin proliferasyonlarını doza bağımlı olarak, %90 oranında inhibe ettiği normal karaciğer hücrelerine (WRL) ise herhangi önemli bir sitotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Lau ve ark., 2004). Jiménez-Medina ve arkadaşları; *T. versicolor*'un CM-101 suşundan elde edilen protein bağlı polisakkaritin; lösemi, melanom, fibrosarkom, serviks, akciğer, pankreas ve gastrik kanserlerde tümör hücre proliferasyonuna etkisini araştırdıkları bir çalışmada; polisakkaritin, tümör hücreleri üzerine antiproliferatif etkisinin olduğu, ancak periferik kan hücrelerinin proliferasyonunu artıran IL-2 ile sinerjistik etki yaptığını tespit etmişlerdir (Jiménez-Medina ve ark., 2008).

### ***T. versicolor* Özütünün Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

*T. versicolor* özütünün sitotoksik aktivitesinin apoptotik yolla olup olmadığını tespit etmek için kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler de izlenmiştir. Bu amaçla, fungus özütünün etkin konsantrasyonlarında araştırma yapılmış ve A549 ve BEAS-2B hücrelerinde, konsantrasyonlar ile doğru orantılı bir şekilde kaspaz aktivitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 9-10).



Şekil 9. *T. versicolor* özütü uygulanmış A549 hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi



Şekil 10. *T. versicolor* özütü uygulanmış BEAS-2B hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi

Fungal özüt muamelesi sonucunda BEAS-2B hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesinin, A549 hücrelerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada, *T. versicolor*'un CM-101 şuşundan elde edilen protein bağlı polisakkaritin; lösemi, melanom, fibrosarkom, serviks, akciğer, pankreas ve gastrik kanserlerin bir kısmında apoptotik aktiviteyi arttırdığı rapor edilmiştir. Kontrol olarak PSK ile muamele etmedikleri tümör hücrelerini kullandıkları bu çalışmada, AGS (gastrik kanser hücreleri), A549, B16 (fare melanom hücreleri) ve Ando-2 (insan melanom hücreleri)'nde apoptozda belli bir oranda artış gözlemlerken, JURKAT (T lenfosit lösemisi hücreleri), HeLa (Servikal adenokarsinom hücreleri) ve B9 ( fare melanom hücreleri)'nde anlamlı bir artış gözlemlenmemişlerdir (Jiménez-Medina ve ark., 2008).

#### ***T. versicolor* Özütünün Antimikrobiyal Etkileri**

Çalışmanın bu kısmında, fungal özütlerin bakteri ve mayalar üzerine antimikrobiyal etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinliğin tespiti için minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) saptanmıştır.

*T. versicolor* özütünün MİK değerleri *S. typhi* NCTC 8394, *B. cereus* ve *B. subtilis*'te 12,5 mg/mL; *C. albicans* ve *C. tropicalis* için 6.25 mg/mL olarak saptanmıştır. *T. versicolor* özütünün *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada *T. versicolor*'un *P. aeruginosa*'ya zayıf etkisinin olduğunu ve diğer bakterilere etkinliğinin olmadığını bildirmişlerdir (Janeş ve ark., 2007). *Basidiomycetes* sınıfına ait çeşitli fungusların ekzopolisakkarit presipitatları, bazidiyokarp özütleri ve derin kültürle üretilen misellerinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *E. faecium*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *C. albicans*, *C. glabrata* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlar ve elde ettikleri 94 farklı özütün antimikrobiyal etkisi olduğunu saptamışlardır. Ancak antimikrobiyal etkinliğin zayıf olduğunu bildirmişlerdir (Demir ve Yamaç, 2008).



**Tablo 1.** *T. versicolor* özütünün MİK değerleri (mg/mL)

Organizma	<i>T. versicolor</i> (H)	Ciprofloksasin	Flukonazol
<i>S. typhi</i> NCTC 8394	12,5	<0,03	
<i>S. typhi</i> ATCC 14028	-	<0,03	
<i>B. cereus</i>	12,5	-	
<i>B. subtilis</i>	12,5	-	
<i>C. albicans</i>	6,25		<0,024
<i>C. tropicalis</i>	6,25		<0,024

## SONUÇ

Sonuç olarak kullandığımız fungus özütü A59 hücreleri ve BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik ve proliferasyonu baskılayıcı etki göstermiştir. Çalışmamızda katı faz sürecinden elde edilen özütlerin zayıf bir antimikrobiyal etkinliğinin olduğu da belirlenmiştir. Günümüzde ticari olarak kullanılan kemoteröpatik ilaçlara alternatif olabilecek doğal bileşiklerin araştırılması ve bulunması yeni ve etkili ilaç ham maddelerinin geliştirilmesini sağlayabilecektir. Farklı fungal suşlardan elde edilebilecek özüt ve bileşenlerin sitotoksik ve antimikrobiyal etkilerinin çalışılması bu açıdan önemlidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: 2011/138

## KAYNAKLAR

- Apohan E, Yılmaz U, Yılmaz O, Serindag A, Kucukbay A, Yesilada O, Baran Y 2017. Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, 828: 52-58.
- Chatterjee S, Biswas G, Basu SK and Acharya K 2011. Antineoplastic effect of mushrooms: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 5(7): 904-911.
- Demir MS, Yamaç M 2008. Antimicrobial activities of basidiocarp, submerged mycelium and exopolysaccharide of some native basidiomycetes strains. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2 (3): 89-93.
- Hirahara N, Fujioka M, Edamatsu T, Fujieda A, Sekine F, Wada T . 2011. Protein-bound polysaccharide-K (PSK) induces apoptosis and inhibits proliferation of promyelomonocytic leukemia HL-60 cells. *Anticancer Research*, 31: 2733–2738.
- Janeš D, Kreft S, Jurc M, Seme K, Strukelj B 2007. Antibacterial activity in higher fungi (mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia. *Pharmaceutical Biology*, 45(9): 700–706.
- Jiménez-Medina E, Berruguilla E, Romero I, Algarra I, Collado A, Garrido F. 2008. The immunomodulator PSK induces in vitro cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*, 8: 78.
- Jose N, Janardhanan KK 2000. Antioxidant and antitumor activity of *Pleurotus florida*. *Current Science*, 79(7): 941-943.
- Kumar A, Schweizer HP 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advance Drug Delivery Reviews*, 57: 1486–1513.
- Lau CB, Ho CY, Kim CF, Leung KN, Fung KP, Tse TF, Chan HH, Chow MS 2004. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. *Life Sciences*, 75: 797–808.

- Li XM, Xu LZ 1987. Comparison of anti-cancer effect of two polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* in vitro. *Acta Academiae Medicinae Shanghai*, 14(5): 326–329.
- Peres-Bota D, Rodriguez H, Dimopoulos G, DaRos A, Mélot C, Struelens MJ, Vincent JL 2003. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *Journal of Infection*, 47: 307-316.
- Qian ZI, 1997. Polysaccharide peptide (PSP) restores immunosuppression induced by cyclophosphamide in rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 25(1): 27.
- Ren BZ, Dai RZ, Li BB 1993. Influence of PSP on immune function of tumor patients. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 20(5), 348– 349.
- Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Food*, 4: 687-709.
- Sharma AK, Jana Dr. AM, Srivasta Dr.A, Gupta Dr. Madhu Sharma S, Gill SS 2014. Antimicrobial properties of some edible mushrooms: A review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(5): 1009-1023.
- Van der Waaij D, Nord CE 2000. Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; An analysis and a new approach to this urgent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16: 191–197.

DRAFT

## Antibacterial, antioxidant and dna interaction properties of *Cistus creticus* L. extracts

<sup>1</sup>Dudu Duygu Kılıc, <sup>2</sup>Belgin Sırıken, <sup>3</sup>Omer Ertürk, <sup>4</sup>Güler Tanrıku, <sup>4</sup>Melek Gül, <sup>5\*</sup>Ceren Başkan

<sup>1</sup>Amasya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Amasya, Turkey.

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Aquatic Animal Diseases, Samsun, Turkey.

<sup>3</sup>Ordu University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Ordu Turkey.

<sup>4</sup>Amasya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Amasya, Turkey.

<sup>5</sup>Amasya University, Sabuncuoğlu Şerefeddin Health Services Vocational School, Amasya, Turkey

\*Corresponding author e-mail: [ceren.yavuz@amasya.edu.tr](mailto:ceren.yavuz@amasya.edu.tr)

### Abstract

Medicinal plants are a natural source that possesses significant biological functions. *Cistus* species which are medical plant are of antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. The present study was carried out to investigate the antibacterial, antioxidant and DNA interaction properties of *Cistus creticus* L. extracts.

Samples of *Cistus creticus* L. were collected in May 2018 in the region of Amasya. The different extract of *Cistus creticus* L. leaves was obtained by using soxhlet apparatus for 4 hours. Antibacterial activity of extracts was tested against four Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC) and four Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) by the disc method. Antioxidant activities of extracts were determined with DPPH radical scavenging, ferric reducing and metal chelating methods. Moreover, total phenolic and total flavonoid contents of extracts were investigated by using spectrophotometric methods. The ability to repair the plasmid DNA breaks created by hydroxyl radicals was also determine using pUC18 plasmid DNA.

As a result, *Cistus creticus* L. extracts has strong inhibitory activity against all tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. The chloroform extract was also very effective against Gram-positive bacteria especially *Bacillus cereus* (14 mm). Among the Gram-negative bacteria, the most susceptible bacterium was identified as *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, ethanol extracts had repair effects on plasmid DNA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> condition. Among the different extracts of *Cistus creticus* L. chloroform extract showed the highest in vitro antioxidant activity.

In this study, *Cistus creticus* L. collected from Amasya has shown significant antibacterial, antioxidant and DNA interaction activity and could be therefore a useful source in the discovery of new antibacterial and antioxidant compounds. However, the use of extracts as a complement to the treatment requires further research to thoroughly understand the activities and interactions with recommended medicines.

**Keywords:** *Cistus creticus* L. Antioxidant, Antimicrobial, DNA interaction.

### INTRODUCTION

*Cistus* species are found in the Cistaceae family, which is a large family. They are in the form of perennial shrubs with pink or white flowers (Stepień et al., 2018; Menor et al., 2013). *Cistus* species are colloquially known as "rock roses" (Hocking, 1997; Bouamama et al., 2006). There are 20 *Cistus* species in the world and they are mostly distributed in the Mediterranean region, Middle East Europe, West Africa and Asian countries. There are five different types of *Cistus* in Turkey, which are *Cistus creticus* L., *Cistus laurifolius* L., *Cistus monspeliensis* L., *Cistus parviflorus* Lam, *Cistus salviifolius* L. (Szeremeta et al., 2018; Caton et al., 2012; Comander et al., 2006; Guvench et al., 2005).

Some species are used in the parfum industry, while some have been used in traditional folk medicine since ancient times. Chemical studies on different genera have basically shown that their antioxidant properties, which are considered to have therapeutic potential, originate from profenolic compounds and terpenoids (Kupeli et al., 2007; Menor et al., 2013; Stepień, 2017). Oxygen reactive forms such as peroxide, superoxide and hydroxyl radicals cause many oxidative stress-related diseases, including diabetes and Alzheimer's disease. The ability of antioxidants to sweep toxic oxygen radicals is very important in this sense.

Thanks to its rich chemical compounds, it has anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-allergic effects and is used as a therapeutic agent against various diseases, strengthening the body resistance. In addition, various ethnobotanical studies have shown that *Cistus* species are a good remedy for infections (Bassole et al., 2012; Salin et al., 2011). Furthermore, the studies have shown that extracts obtained from *Cistus* species have antiulcer, wound healing, vasodilator and cytotoxic effects (Güvenç et al., 2005; Stepień, 2017). The aim of this study is to determine the antibacterial effect of extracts obtained from the

leaves of *Cistus creticus* L. plant found in Amasya province by using disk diffusion test, and to determine the antioxidant activities with the methods of radical scavenging activity (DPPH), metal chelating activity and ferric reducing antioxidant power assays. Additionally, the protective role of *Cistus creticus* L. extracts on hydroxyl radical-induced DNA damage has been investigated through plasmid DNA.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample extraction

*Cistus creticus* L. was collected from natural population which are located in Amasya in May 2018 (Baytop, 1999). The leaves of *Cistus creticus* L. were then dried at room temperature. The plants (25 g) were extracted with the soxhlet tool (Isolab, Turkey) for 4 hours in ethanol, dichloromethane and n-hexane (prepared by using solvents of different polarity). The extracts were filtered by Whatman No. 1 paper. The solvents were removed under a rotary vacuum until dry (Heidolph Collegiate, LV28798826, New Jersey, USA). Then the residue dissolved in Tetrahydrofuran (THF, Sigma) for antimicrobial activity (20 mg/mL). The extracts samples were stored at 4 °C in dark bottle for investigation (Bouyahya et al., 2016).

### Test organisms and culture condition for antibacterial analysis

Extracts of *Cistus creticus* L. were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Before use, Bacterial strains were subcultured overnight at 37°C for 18 to 24 h in Triprik Soy Broth (TSB, Oxoid, Hampshire, UK).

### Antibacterial activity

Antibacterial activity of the *Cistus creticus* L. extracts were determined by the disc diffusion method (CLSI 2010). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 were used in bacterial strains. The concentrations of the microorganisms were adjusted using turbidity measurements (0.5 McFarland) using serum physiologic solution. The concentration of bacterial suspensions was adjusted to 10<sup>8</sup>cells/mL. Then, extracts (20 mg/mL) were prepared in THF and loaded 6 mm diameter sterile blank discs (Oxoid). Inhibition zones were determined after incubation at 37 °C for 24 h. As a positive control for bacteria, gentamicin (10 µg) and ceftriaxone (30 µg) were placed in Petri dishes. All tests were performed in triplicate (CLSI, 2010).

### Antioxidant activity

#### Free radical scavenging activity

The free radical scavenging activity was determined with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH•) using methods of Brand-Williams (Brand-Williams et al., 1995). Different concentrations of plant material were prepared and 0.75 mL of this extract was added the 1.5 mL of 20 mg/L DPPH• solution in methanol. This solution was added to, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), and trolox (100–500 µg/mL). The mixture was shaken vigorously, and the decrease in absorbance at 517 nm was measured for 30 min at room temperature. Water (0.75 mL) in place of the sample was used as control. The percent inhibition activity was calculated using the following equation: free radical scavenging effect % = [(A<sub>0</sub> - A<sub>I</sub>)/A<sub>0</sub>] · 100. (A<sub>0</sub> = the control absorbance and A<sub>I</sub> = the sample solution absorbance).

#### Metal chelating activity

The chelating activity of extract on ferrous ions (Fe<sup>2+</sup>) was measured according to the method of Decker and Welch (Decker et al., 1990). Aliquots of 1 mL of different concentrations (100–500 µg/mL) of extracts were mixed with 3.7 mL of deionized water. The mixture was incubated with FeCl<sub>2</sub> (2 mM, 0.1 mL) for 30 min. After incubation, the reaction was initiated by addition of ferrozine (5 mM and 0.2 mL) for 10 min at room temperature, and then the absorbance was measured at 562 nm. A lower absorbance indicates a higher chelating power. The chelating activity of the extract on Fe<sup>2+</sup> was compared with that of EDTA at the same concentrations. Metal chelating activity (%) = [(A<sub>0</sub> - A<sub>1</sub>)/A<sub>0</sub>] · 100.

### Reducing activity

Measurements of reducing activity of extracted were according to the Oyaizu method (Oyaizu et al., 1986). Various concentrations of the extract ( $\mu\text{g}$ ) in 1 mL of distilled water were mixed with 2.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 mL potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (1%, w/v), and the mixture was incubated at 50°C for 30 min. Afterwards, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%, w/v) was added to the mixture and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. Finally, 2.5 mL of upper-layer solution was mixed with 2.5 mL distilled water and 0.5 mL  $\text{FeCl}_3$  (0.1%, w/v), and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer.

### Estimation of total phenolic content

According to the methods of Slinkard and Singleton (Slinkard et al., 1977), using Folin–Ciocalteu reagent were determined depending on phenolic standard gallic acid. 1 mL of the plant extract was introduced into test tubes followed by 1 mL Folin–Ciocalteu's reagent. The solution was kept in the dark for 5 min and then 3 mL of sodium carbonate (2%) was added. The tubes were covered with parafilm and kept again in the dark for 1 h and were measured absorption at 765 nm with a spectrophotometer and compared to a gallic acid calibration curve. The results were expressed as mg gallic acid/g dried sample. Each assay was carried out in triplicate.

### Estimation of total flavonoid content

Total flavonoid content was determined with quercetin standard solution using Park methods (Park et al., 2008). The plant extract in 0.3 mL of was introduced into test tubes followed by 3.4 mL 30% methanol, 0.15 mL of 0.5 M  $\text{NaNO}_2$  and 0.3 M  $\text{AlCl}_3$  reagent. After 5 min 1 mL of 1 M NaOH was added and measured absorption at 506 nm with a spectrophotometer and compared to a quercetin calibration curve. Each assay was carried out in triplicate. The total flavonoids were described as mg of quercetin equivalents per g of dried fraction.

### DNA interaction assay

To explore the beneficial effect of the *Cistus creticus* L. extracts on hydroxyl radical-mediated DNA damage plasmid DNA pUC18 (Thermo Scientific) was used. Firstly, the *Cistus creticus* L. extracts were dissolved Dimethyl sulfoxide (DMSO, concentration range from 12.5 to 100 mg/ml). A reaction mixture (20  $\mu\text{l}$  final volume) containing 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  plasmid DNA pUC18, 1  $\mu\text{l}$  of 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1 g/ml *Cistus creticus* L. extracts in Tris-EDTA (TE) buffer was prepared.  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 0.1% tetrahydrofuran treated plasmid DNAs were used as control groups. Secondly, the prepared mixture for each *Cistus creticus* L. extracts was incubated at 37°C for 24 hours. 2  $\mu\text{l}$  loading dye (bromophenol blue [0.025%] and sucrose [4%] in  $\text{dH}_2\text{O}$ ) was added into the mixture (10  $\mu\text{l}$  total volume) and loaded on to the 1% agarose gel. Electrophoresis process was for 90 min at 80 V in TBE buffer running buffer (pH 8). The Gel was imaged under UV light (Attaguile et al., 2000; Ayvaz et al., 2018).

## RESULTS AND DISCUSSION

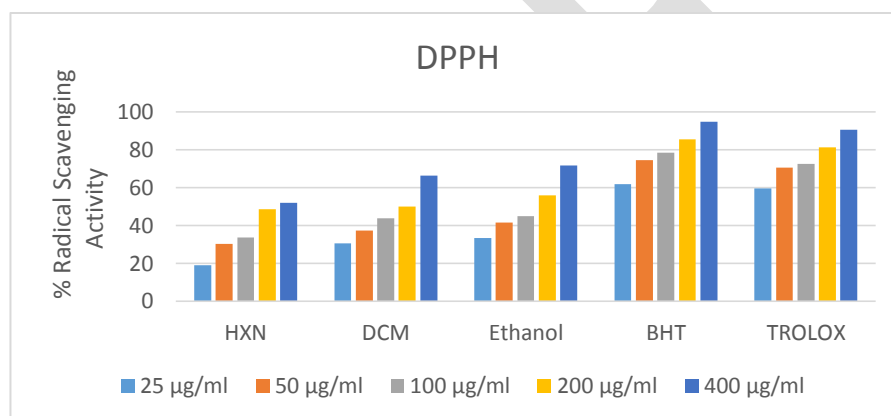
In this work, results indicate that ethanol, dichloromethane and n-hexane extracts showed antibacterial activity with specific differences according to the test microbial strain. Gram-negative bacteria are more sensitive than Gram-positive bacteria. Infact, the disc diffusion tests ranged from 9-18 mm for the *Cistus creticus* L. ethanol extract, 8-11 mm for the *Cistus creticus* L. dichloromethane extract and 8-14 mm for the *Cistus creticus* L. n-hexane extract. Extracts revealed an improved antibacterial activity against aureus compared with that of antibiotics ceftriaxone and gentamicin. The highest diameter of inhibition is found with ethanolic extract against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 strains. Thus, *Pseudomonas aeruginosa* shows extreme sensitivity, and the six other bacteria espond very positively to its antibacterial effect. Furthermore, the extracts of *Cistus creticus* L. were effective against *Escherichia coli* except for the dichloromethane extracts. Especially ethanol of *Cistus creticus* L. were found to be active against all bacteria. The results are showed in Table 1.

**Table 20.** Antibacterial activity of the extract against wild type microorganisms (mm)

	Microorganisms							
	B.s	B.c	P.a 9027	P.a 27853	S.a 25953	S.a 25923	S.e	E.c
Ethanol	11	10	14	18	10	10	9	10
Dichloromethane	9	14	10	9	8	8	8	-
n-Hexane	10	11	14	9	9	8	10	8
CRO 30 µg	27	13	14	30	24	32	14	30
CN 10 µg	20	21	21	21	21	20	23	21

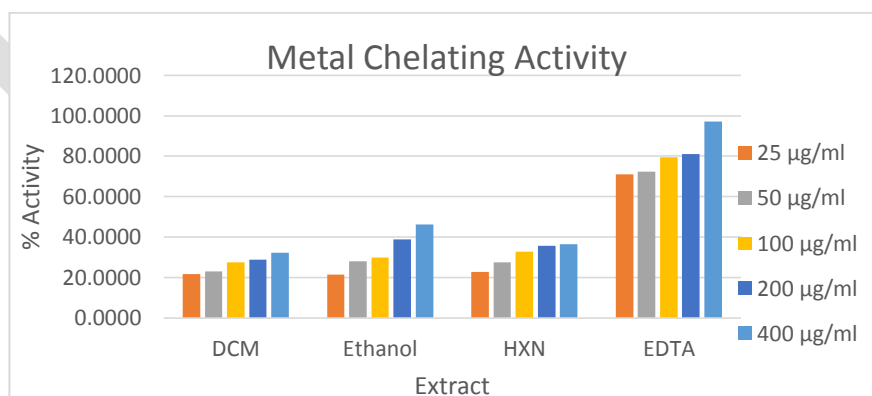
Overall, Gram-negative bacteria exhibited higher sensitivity to the extract antimicrobial properties than the Gram-positive ones. These results are consistent with those found in literature.

These results could be partially related to the phenolic composition of the extract, Additionally, the antioxidant capacities of those extracts showing high polyphenolic content were determined via a panel of antioxidant measurements. The DPPH assay of the extracts showed potent antioxidant activity, which was comparable to that of the synthetic antioxidant BHT and TROLOX. High DPPH activity was found at the ethanol extracts. Also, calculated IC<sub>50</sub> value of the ethanol, dichloromethane, n-hexane; 165.10, 189.71, 397.29 respectively. One recent study reported that *Cistus creticus* L. subsp. eriocephalus plant possess highest activity (Bullitta et al., 2013). Antioxidant properties of *Cistus creticus* using metal chelating assay are shown in Figure 1.



**Figure 1.** DPPH radical scavenging of extracts

Among extracts, antioxidant activity in terms of metal chelating activity, ranged between 43 and 32%, whereas it ranged between 95 and 75 % in the EDTA standard.



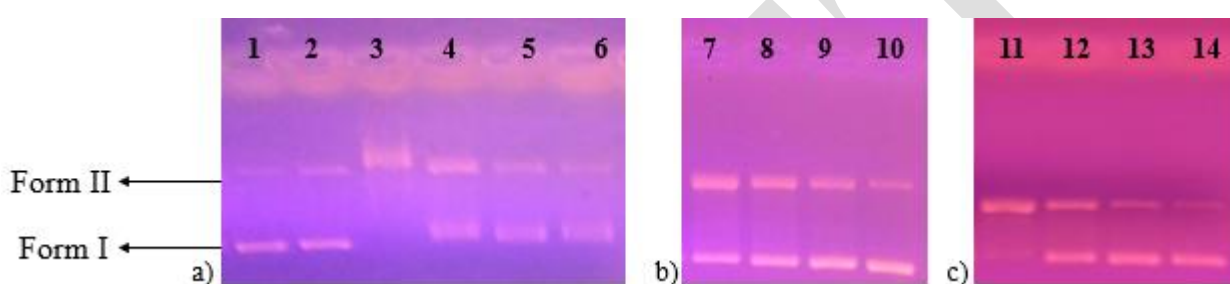
**Figure 2.** The extracts metal chelating studies

Table 2 shows the total phenolic and total flavonoids content in the different solvent extracts of *Citrus creticus* in Amasya. Among the extracts, the highest phenolic content was found in ethanol (130.32 mg GAE/g dry wt.) followed by dichloromethane and hexane. The flavonoid content was the highest in ethanol extracts. The differences in flavonoid content in extracts DCM and HXN were observed to be the insignificant however total phenolic content amount were very different in extracts.

**Table 2.** Total phenolic and flavonoid content and IC<sub>50</sub> value of extracts

	Total Phenolic Content Gallic acid equivalent mg/g	Total Flavonoid Content Quercetin equivalent mg/g	[IC] <sub>50</sub> value of the DPPH activity (µg/mL)
n-Hexane	68.3163	60.71	397.29
Dichloromethane	112.1473	63.98	189.71
Ethanol		130.3205 83.94	165.10

Reactive oxygen species, from both endogenous and exogenous sources, may be involved in the etiology of diverse human diseases, such as coronary heart disease, inflammation, neuro-degenerative diseases. According to agarose gel electrophoresis, extracts were dissolved in DMSO and 0.25 µg/µl pUC18 plasmid DNA was treated with 12.5, 25, 50 and 100 mg/mL extracts respectively (Figure 1).



**Figure 3.** Gel image of extracts of *Cistus creticus* L.

Figure 1 shows the gel image of DNA after UV-photolysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence and presence of different extracts of leaves of *Cistus creticus*. DNA derived from pUC18 plasmid showed two bands on agarose gel electrophoresis (lane 1), the faster-moving band corresponding to the native form of supercoiled circular DNA and the slower-moving band being the open circular form (Attaguile et al., 2000). Increasing doses of *Cistus creticus* extracts had a protective effect on hydroxyl radical-mediated plasmid DNA damage, but a low concentration of these extracts had no protective effect on plasmid DNA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conditions. It appears that extracts, ethanol, dichloromethane and n-hexane, exhibit relatively similar effects against plasmid DNA.

## CONCLUSION

The findings highlighted that *Cistus creticus* extracts were able to inhibit the growth of a wide spectrum of bacterial strains, known for their implications in infections. Moreover, the results of this study suggest that their antioxidant and DNA interaction activities. Hence, this extracts of *Cistus creticus* can be a promising agent to control microbial growth, even if more detailed reports on its toxicity and mechanisms of action are requested to overcome the impediment of its application in several industries.

## REFERENCES

- Attaguile G, Russo A, Campisi A, Savoca F, Acquaviva R, Ragusa N, Vanella A 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. Cell Biology and Toxicology, 16: 83-90.
- Ayvaz MÇ, Ömür B, Ertürk Ö, Kabakçı D 2018. Phenolic profiles, antioxidant, antimicrobial, and DNA damage inhibitory activities of chestnut honeys from Black Sea Region of Turkey. Journal Food Biochemistry, 2018: 1-10.
- Bassole IHN, Juliani HR 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules, 17: 3989-4006.
- Baytop T 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present), Nobel Medical Press, Istanbul.
- Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana M 2006. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. Journal of Ethnopharmacology, 104: 104-107.

- Bouyahya A, Moussaoui NE, Abrini J, Bakri Y, Dakka N 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *British Biotechnology Journal*, 14(3): 1-10.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT—Food Science Technology*, 28: 25–30.
- Catoni R, Gratani L, Varone L 2012. Physiological, morphological and anatomical trait variations between winter and summer leaves of *Cistus* species. *Flora –Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207: 442-449.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20, Vol:30 No: 1.
- Comandini O, Contu M, Rinaldi AC 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16: 381-395.
- Decker EA, Welch B 1990. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle. *Food Journal Agriculture Food Chemistry*, 38: 674–677.
- Güvenç A, Yıldız S, Özkan AM, Erdurak CS, Coşkun M, Yılmaz G, Okuyama T, Okada Y 2005. Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharmaceutical Biology*, 43(2): 178-183.
- Hocking GMD 1997. *A Dictionary of Natural Products*, 2nd Ed., Plexus Publishing, Medford, N.J. 190-191.
- Kupeli E, Yesilada E 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 524-530.
- Menor TL, Soto MA, Catalan BE, Segura RC, Carretero SA, Micol V 2013. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 313-322.
- Oyaizu M 1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307–315.
- Park YS, Jung ST, Kang SG, Heo BKH, Arancibia-Avila P, Toledo F, Drzewiecki J, Namiesnik J, Gorinstein S 2008. Antioxidants and Proteins in Ethylenetreated Kiwifruits. *Food Chemistry*, 107: 640–648.
- Salin OP, Pohjala LL, Saikku P, Vuorela HJ, Leinonen M, Vuorela PM 2011. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro. *The Journal of Antibiotics*, 64: 747-752.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 49–55.
- Stępień, AE 2017. Cytotoxic and anti-cancer activity of the *Cistus* species of herbal plants.
- Stępień A, Aebischer D, Aebischer BD 2018. Biological properties of *Cistus* species. *European Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 16(2): 127-132.
- Szeremeta D, Knaś M, Długosz E, Krzykała K, Mrozek-Wilczkiewicz A, Musioł R, Kowalska T, Ott PG, Sajewicz M, Móricz AM 2018. Investigation of antibacterial and cytotoxic potential of phenolics derived from *Cistus incanus* L. by means of thin-layer chromatography-direct bioautography and cytotoxicity assay. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(6): 349-357.



## The antibiofilm activity of juglone loaded nanoparticles against *Fusarium* spp.

Busra Gumus<sup>1\*</sup>, Tugba Atabey<sup>1</sup>, Tayfun Acar<sup>2</sup>, Serap Derman<sup>2</sup>, Tulin Arasoglu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Yildiz Technical University, Faculty of Arts and Sciences, Molecular Biology and Genetics Department, Istanbul, Turkey.

<sup>2</sup>Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Bioengineering Department, Istanbul, Turkey.

\*Corresponding author e-mail: ozbehtulin@gmail.com

### Abstract

*Fusarium* is one of the major agents causing fungal keratitis which is an important eye disease in developing countries. The diagnosis and the treatment of fungal keratitis is one of the most difficult problems encountered by ophthalmologists due to the biofilm formation and the poor response to antifungal drugs.

In this study, the antibiofilm activity of juglone loaded PLGA nanoparticles, which were produced by single emulsion solvent evaporation method, against *Fusarium* spp. was evaluated by standard plate count assay comparatively with the free juglone and Fluconazole, a commercially available drug. The effect of the three test substances were investigated both on the formation and the elimination of the biofilm structure. Results showed that Fluconazole inhibited the biofilm formation by 90% and the pre-established (6 hour) biofilms by 93%, when administered at a dose of 2.5 mg/ml. Free juglone and juglone nanoparticles, on the other hand, achieved more successful and outstanding results and entirely inhibited (100%) the biofilm formation and the pre-established biofilms of *Fusarium* spp. at 0.3 mg/ml (or equivalent dose for the nanoparticles). It should be noted that this dose is approximately 8 times lower than 2.5 mg/ml Fluconazole administration. Considering that the PLGA nanoparticulate system provides controlled release and also reduces toxicity; it is very important for juglone nanoparticles to have a similar effect with the free juglone. This is because the amount released when juglone nanoparticles were applied, i.e., the effective amount, was significantly lower than 0.3 mg/ml. In conclusion, we think that our work may be a useful model for the upcoming antibiofilm activity researches and that juglone nanoparticles will be an important warrior against *Fusarium* keratitis and similar resistant infections.

**Keywords:** juglone, PLGA, nanoparticle, biofilm, antibiofilm activity.

### INTRODUCTION

*Fusarium* is a filamentous fungus that lives mostly in soil and on crops such as cucumber, rice, beans and soybeans (Chen et al., 2010; Zhao et al., 2012). *Fusarium* species can cause harm as plant, human and animal pathogen (Margolis and Whitcher, 2006; Lamprecht et al., 2011; Bouhet and Oswald, 2005). Fungal keratitis is a common human disease, particularly in tropical areas, caused by filamentous fungi (such as *Fusarium* and *Aspergillus*) and by yeast-like fungi (especially *Candida albicans*) (Margolis and Whitcher, 2006). In a retrospective review of fungal keratitis cases, it has been shown that *Fusarium* was responsible for 41% of the cases. Furthermore, due to the use of a contact lens solution, an outbreak of *Fusarium* keratitis began in March 2006 (Chang et al., 2006). Bacterial biofilms have been demonstrated on the contact lenses obtained from patients with keratitis. In this regard, the formation of biofilms may be a mechanism by which *Fusarium* exhibits resistance against antimicrobial drugs (Iyer et al., 2006). Many organisms from *Fusarium* genus are capable of growing as biofilms, which is a surface-associated microbial community. This community and thick fungal cell wall structure enhance the drug resistance and make it difficult to treat infection (Shimizu et al., 2006). It is estimated that 60-80% of infections in developing countries are caused by microbial biofilm structure and that biofilms contribute to the antimicrobial drug resistance (Saviuc et al., 2009). For the treatment of resistant fungal biofilm infections, a dose higher than the maximum therapeutically administrable amount may be required (Ramage et al., 2012). For this reason; new, affordable and efficacious antifungal agents need to be developed.

Polymers have been widely used in the development of nanotechnological drug formulations and medical applications over recent years (Saltzman, 2001). Polymeric nanoparticles are often preferred due to their biocompatible and biodegradable structures and their ability to provide controlled release of the active ingredient they contain (Abdollahi et al., 2012; Singh and Lillard, 2009). Nanoparticulate drug delivery systems provide advantages in drug delivery studies such as targeting the drug to the potentially active site, reducing side-effects, controlling the physicochemical behavior of drugs (e.g. solubility and release) (Zhang et al., 2008; Peer et al., 2007; Cheng et al., 1998). The use of nanoparticulate systems allows for the use of less

active ingredient due to the controlled release, and especially the polymeric nanoparticles prepared with PLGA (poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)) increase the antimicrobial activity of the active substance (Esmaeli et al., 2007; Cheow et al., 2010). The most important reason why nanoparticles are preferred over microparticles is that they do not cause aggregation and hence vascular occlusion in the circulatory system (Singh and Lillard, 2009). The abilities of nanoparticles to enter the cell through endocytosis and to sustain drug release are important to combat microbe-induced intracellular infections (Ranghar, 2012). Biodegradable polymeric nanoparticles are suitable for the delivery of drugs, peptides and nucleic acids due to their nonimmunogenic, noninflammatory and nonthrombogenic properties (Kumari et al., 2010).

Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) is a seconder metabolite of walnut which has antimicrobial (Clark et al., 1990; Jeon et al., 2009), anticancer (Xu et al., 2013), cytotoxic and genotoxic (Aithal et al., 2009) and antioxidant (Zakavi et al., 2013) activities. However, its low solubility and toxic effect limit the use of juglone in biological systems (Kocacaliskan and Terzi, 2015). In our previous studies, we have shown that the encapsulation into PLGA nanoparticulate system increases the antibacterial (against *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*) (Arasoglu et al., 2017) and antifungal (against *C. albicans*, *A. flavus* and *Fusarium* spp.) (Arasoglu et al., 2016) activities of juglone. Also, in another study conducted based on these successful results, we have been determined that juglone loaded PLGA nanoparticles exhibit better antibiofilm activity against *C. albicans* than the free juglone (Gumus et al., 2019). In this regard, we hypothesized that the juglone nanoparticles may also be strongly effective for the elimination and the control of *Fusarium* spp. biofilms.

## MATERIALS AND METHODS

The antibiofilm activity of free juglone and juglone loaded PLGA nanoparticles against *Fusarium* spp. (ATCC 20883) (provided by Department of Biology, Ataturk University, Turkey) was investigated by standard plate count assay. Juglone nanoparticles used were produced by single emulsion solvent evaporation method within the scope of the YTU-BAP project (project no: FBA-2018-3101). Detailed information about the production and the characterization of nanoparticles was given in our previous study (Gumus et al., 2019).

*Fusarium* spp. cells were harvested from a 40 h culture at 37°C in Sabouraud dextrose broth and adjusted to be 10<sup>7</sup> cells/ml in RPMI 1640 medium. Free juglone, Fluconazole and juglone nanoparticles solutions were prepared in sterile water. Free juglone and Fluconazole were administered in four different doses of 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.6 mg/ml and 0.3 mg/ml; while juglone nanoparticles were used as equivalent to these doses (in accordance with the drug loading of nanoparticles).

In order to investigate the effect on biofilm formation, 1 ml of *Fusarium* spp. cell culture was transferred into each 10 ml glass culture tube and the solutions of free juglone, juglone nanoparticles and Fluconazole were added into the related tubes. Control tubes were also prepared using the sterile water, the solvent used for preparing all the test solutions. Following the incubation at 37°C for 6 hours, all liquids were withdrawn carefully and the tubes were washed 2 times with PBS.

On the other hand, to examine of the antibiofilm effect of test substances against pre-established biofilms, the tubes containing only the cell culture were incubated at 37°C for 6 hours. After washing with PBS, the test solutions and also 1 ml of RPMI 1640 medium were added into the tubes. The tubes were incubated for 24 hours at 37°C and washed again.

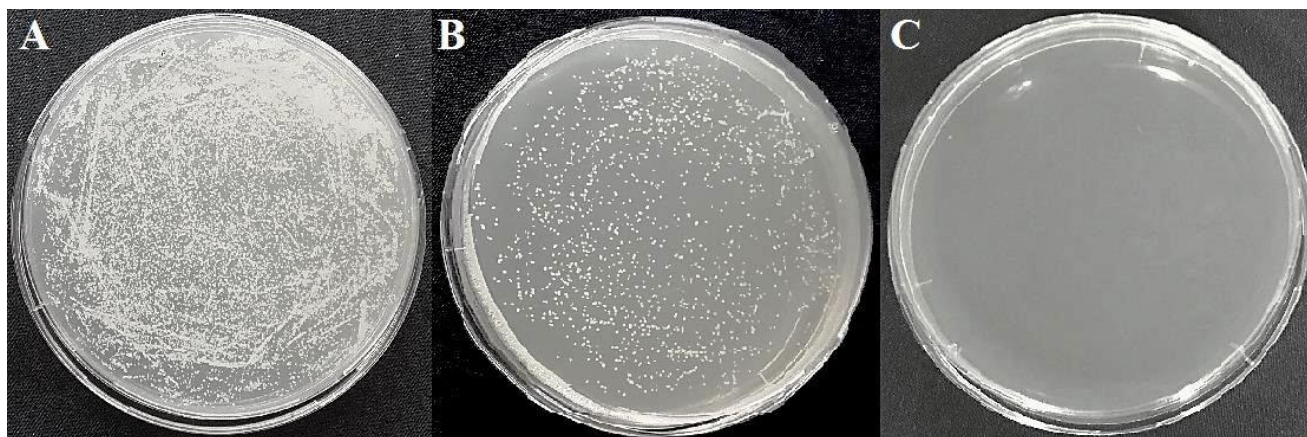
To perform the standard plate count assay, the method published by Hetrick et al. (2009) was modified and applied. Subsequent to the washing steps, 2 ml of PBS was added into each tube and sonication was performed for 30 min in a 120 W ultrasonic bath. Serial dilutions were prepared from the resulting suspensions and spread over Sabouraud dextrose agar. Colonies were counted after overnight incubation at 37°C.

## RESULTS and DISCUSSION

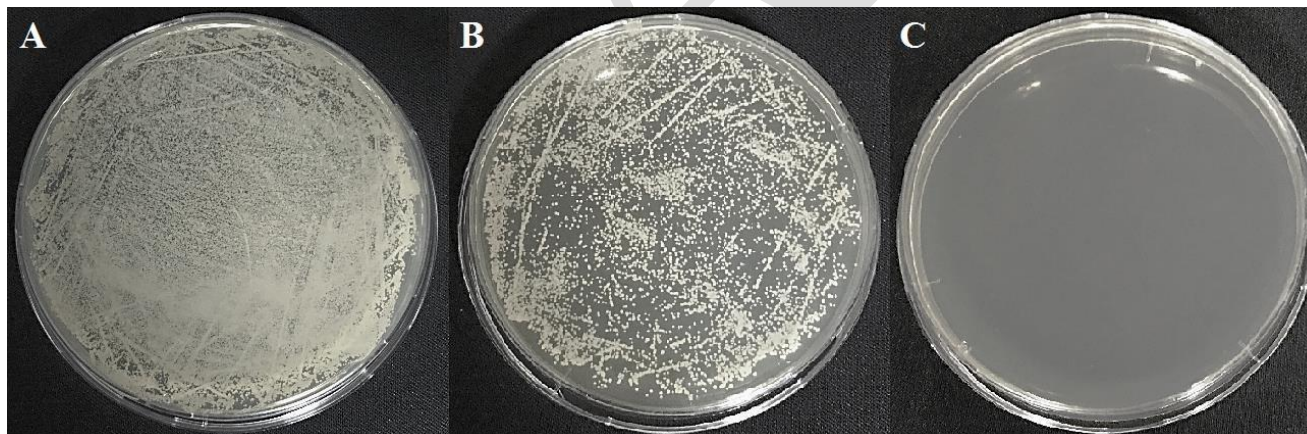
In this study, juglone nanoparticles which were previously produced by the single emulsion solvent evaporation method were used. The size and the zeta potential values of these nanoparticles were 207.60 ± 1.99 nm and -25.7 ± 1.2 mV, respectively. Additionally, the release study of the nanoparticles was also performed and the release rate was measured to be 42.17% at 60 days. It is very important and accurate to consider the release rate when evaluating the antimicrobial effect of a nanoparticulate formulation comparatively with the free form of the drug which was encapsulated into the particles.

In the standard plate count assay; *Fusarium* spp. cells were treated with juglone, juglone nanoparticles or Fluconazole for 6 hours to evaluate the effect on biofilm formation, whereas it was 24 hours to detect the effect on pre-established biofilms.

Both in the studies of biofilm formation and pre-established biofilms, it was observed that many colonies formed on the control plates, as expected (Figure 1A and 2A). Fluconazole treatments resulted in fewer but significant amount of colonies than the controls (Figure 1B and 2B); when calculated for the highest dose of 2.5 mg/ml, it was found to inhibit biofilm formation by 90% and pre-established biofilms by 93%. In contradistinction to Fluconazole, free juglone and juglone loaded nanoparticles led to complete inhibition (no colony formation) of *Fusarium* spp. biofilms at all doses applied (even at the lowest dose of 0.3 mg/ml or equivalent for nanoparticles) in both studies (Figure 1C and 2C).



**Figure 1.** The effect against the formation of *Fusarium* spp. biofilm. (A) Control, (B) 2.5 mg/ml Fluconazole, (C) 0.3 mg/ml free juglone and equivalent dose of juglone nanoparticles. (A representative petri image was used for those without colony formation.)



**Figure 2.** The antibiofilm effect against pre-established *Fusarium* spp. biofilms. (A) Control, (B) 2.5 mg/ml Fluconazole, (C) 0.3 mg/ml free juglone and equivalent dose of juglone nanoparticles. (A representative petri image was used for those without colony formation.)

As stated above, the drug release rate should be considered for seeing clearly the antibiofilm activity of juglone nanoparticles. In the study of biofilm formation; the exposure time of cells to juglone nanoparticles was 6 hours and the corresponding release rate for this time was 8%. According to this, juglone nanoparticles showed the same effect as the free juglone by releasing just 0.024 mg/ml of the drug (8% release rate) for the lowest dose administered (the lowest dose is equivalent to 0.3 mg/ml free juglone). In the latter study of pre-established biofilms; the release rate for 24 hours and the associated juglone amount released was 14% and 0.042 mg/ml respectively, and the concentration of nanoparticle equivalent to 0.3 mg / mL free juglone.

Fluconazole acts by inhibiting the lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase and so the ergosterol production, thus causes effects such as the instability of fungal cell membrane and the accumulation of toxic compounds. However, it is reported that Fluconazole has a limited antifungal effect against filamentous fungi such as *Aspergillus* spp.

and *Fusarium* spp. (Sabatelli et al., 2006; Li et al., 2000; McGinnis et al., 2001, Meletiadiis et al., 2002). Although 90% and above inhibition values obtained by Fluconazole treatment in the prevention of biofilm formation and in the elimination of pre-formed biofilms appear to be high, these values are insufficient in the case of a resistant biofilm infection. Indeed, one of the biggest challenges of biofilm infections is that it becomes chronic as a result of the infection not being completely cured. Persister cells in the biofilm structure known to have high tolerance to antimicrobial drugs are known to survive post-treatment and to be able to regenerate biofilm structure. Therefore, it seems that Fluconazole treatment is not sufficient for a complete recovery.

Although the mechanism of action of juglone molecule is not yet fully understood, our previous research has shown that free juglone and juglone nanoparticles cause membrane depolarization of *C. albicans*. In this study, it was found that Fluconazole was not effective enough (Gumus et al., 2019). In the case of *Fusarium* spp., we think that juglone has a similar effect as in *C. albicans*. Encapsulation of juglone to nanoparticles, by the way, greatly increased the antibiofilm activity of free juglone mainly due to the controlled release. In addition, this strong effect of juglone nanoparticles could be due to the negative charge on the surface of nanoparticles, which interact with the fungal cell walls. The electrostatic interaction results in accumulation at polycationic microbial cell surfaces that contain  $\beta$ -1,4- linked N-acetylglucosamine unites which provide a strong positive charge to fungal cells. This situation facilitates the access of the nanoparticles to the cell surfaces and the entrance of the released active substances into the cells (Patel et al., 2011).

In light of all these results, it can easily be said that nanoparticulate formulation of juglone is much more effective than its free form and also Fluconazole in the prevention and elimination of *Fusarium* spp. biofilms.

## CONCLUSION

In recent years, studies on the development of new and effective antimicrobial agents have gained importance and speed due to increased antibiotic resistance and related deaths. In our study; the juglone molecule, one of the remarkable molecules in the field, has been shown to have an antibiofilm effect against *Fusarium* spp. Taking into account the toxicity of the juglone, the PLGA nanoparticulate system was used, thereby reducing the dose to be administered significantly. Our promising results pave the way for different studies (e.g. antibiofilm activity researches against different pathogens or multi-species biofilms) with drug carrier nanoparticulate systems to be prepared using the juglone molecule. Through upcoming studies, we anticipate that the juglone and especially its nanoparticulate formulation will be presented as a new and effective antimicrobial agent in the coming years.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by YTU-BAP (Yildiz Technical University, Office of Scientific Research Project Coordination) (project no: FBA-2018-3101).

## REFERENCES

- Abdollahi S, Lotfipour F 2012. PLGA- and PLA-Based Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Biomedicine International*, 3: 1-11.
- Aithal BK, Kumar MR, Rao BN, Udupa N, Rao BS 2009. Juglone, a naphthoquinone from walnut, exerts cytotoxic and genotoxic effects against cultured melanoma tumor cells. *Cell Biology International*, 33, 1039-49.
- Arasoglu T, Derman S, Mansuroglu B, Yelkenci G, Kocyigit B, Gumus B, Acar T, Kocacaliskan I 2017. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Juglone Encapsulated PLGA Nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*, Dec; 123(6):1407-1419.
- Arasoglu T, Mansuroglu B, Derman S, Gumus B, Kocyigit B, Acar T, Kocacaliskan I 2016. Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone) Using PLGA Nanoparticles System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 7087–7094.
- Bouhet S, Oswald IP 2005. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108:199-209
- Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, Jacobson LM, Crowell CS, Sneed RS, Lewis FM, Schaffzin JK, Kainer MA, Genese CA, Alfonso EC, Jones DB, Srinivasan A, Fridkin SK, Park BJ 2006. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *The Journal of the American Medical Association*, Aug 23; 296(8):953-63.

- Chen X, Liu D, Zhang J, Qin W, Zhou Y 2010. Isolation and identification of *Fusarium* from cucumber wilt plants. *Journal of Northeast Agricultural University*, 41(7): 37-44.
- Cheng Y, Illuma L, Davis SS 1998. A poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol. *Journal of Controlled Release*, Nov 13;55(2-3):203-12.
- Cheow WS, Chang MW, Hadinoto K 2010. Antibacterial Efficacy of Inhalable Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles against *E. coli* Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile. *Pharmaceutical Research*, 27: 1597-1609.
- Clark AM, Jurgens TM, Hufford CD 1990. Antimicrobial Activity of Juglone. *Phytotherapy Research*, 4, 11-14.
- Esmaeili F, Hosseini-Nasr M, Rad-Malekshahi M, Samadi N, Atyabi F, Dinarvand R 2007. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine*, 3: 161-167.
- Gumus B, Acar T, Atabey T, Derman S, Sahin F, Arasoglu T 2019. The battle against biofilm infections: juglone loaded nanoparticles as an anticandidal agent. Manuscript submitted for publication.
- Hetrick EM, Shin JH, Paul HS, Schoenfisch MH 2009. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials*, 30(14): 2782-2789.
- Iyer SA, Tuli SS, Wagoner RC 2006. Fungal keratitis: emerging trends and treatment outcomes. *Eye Contact Lens*, Dec; 32(6):267-71.
- Jeon JH, Lee CH, Kim MK, Lee HS 2009. Antibacterial Effects of Juglone and Its Derivatives against Oral Pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, 720-725.
- Kocacaliskan I, Terzi I 2015. Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76, 436-440.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18.
- Lamprecht SC, Tewoldemedhin YT, Botha WJ, Calitz FJ 2011. *Fusarium graminearum* species complex associated with maize crowns and roots in the KwaZulu-Natal Province of South Africa. *Plant disease*, Sep; 95(9):1153-1158.
- Li RK, Ciblak MA, Nordoff N, Pasarell L, Warnock DW, McGinnis MR 2000. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6):1734-6.
- Margolis TP, Whitcher JP 2006. *Fusarium*--A new culprit in the contact lens case. *The Journal of the American Medical Association*, Aug 23, 296(8):985-7.
- McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW 2001. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Medical Mycology*, 39(4):369-71.
- Meletiadiis J, Meis JF, Mouton JW, Rodriquez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE, EUROFUNG Network 2002. In vitro activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1):62-8.
- Patel NR, Damann K, Leonardi C, Sabliov CM 2011. Size dependency of PLGA nanoparticle uptake and antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Nanomedicine*, 6, 1381-1395.
- Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2:751-760.
- Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C 2012. Fungal biofilm resistance. *International journal of microbiology*, 528521.
- Ranghar S 2012. Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57:209-222.
- Sabatelli F, Patel R, Mann PA, Mendrick CA, Norris CC, Hare R, Loebenberg D, Black TA, McNicholas PM 2006. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(6):2009-15.
- Saltzman WM 2001. *Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy*. Oxford University Press, USA.
- Saviuc C, Dascălu L, Chifiriuc CM, Rădulescu V, Oprea E, Popa M, Hristu R, Stanciu G, Lazăr V 2009. The inhibitory activity of pomelo essential oil on the bacterial biofilms development on soft contact lenses. *Roumanian Archives of Microbiology and Immunology*, 69, 145-152.

- Shimizu K, Kobayakawa S, Tsuji A, Tochikubo T 2006. Biofilm formation on hydrophilic intraocular lens material. *Current Eye Research*, Dec; 31(12):989-97.
- Singh R, Lillard JW Jr 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, 86: 215-223
- Xu H, Yu X, Qu S, Sui D 2013. Juglone, isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, induces apoptosis via down-regulation of AR expression in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23, 3631-4.
- Zakavi F, Golpasand Hagh L, Daraeighadikolaei A, Farajzadeh Sheikh A, Daraeighadikolaei A, Leilavi Shoostari Z 2013. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria. *International Journal of Dentistry*, 854765.
- Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC 2008. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83:761-779.
- Zhao JT, Fu YJ, Luo M, Zu YG, Wang W, Zhao CJ, Gu CB 2012. Endophytic Fungi from Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L) Millsp.] Produce Antioxidant Cajaninstilbene Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4314-4319.

DRAFT

## Likenlerden elde edilen biyosorbentlerin tekstil atık sularının arıtımında kullanım potansiyelinin belirlenmesi

Şule Aybüke Yavuz<sup>1</sup>, Ülküye Dudu Gül<sup>2\*</sup>, Zeynep Mine Şenol<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji, Bilecik, Türkiye

<sup>2\*</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bilecik, Türkiye

<sup>3</sup> Cumhuriyet Üniversitesi, Ziraat MYO, Sivas, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: [ulkuyedudu.gul@bilecik.edu.tr](mailto:ulkuyedudu.gul@bilecik.edu.tr)

### Özet

Tekstil endüstrisi atık suları önemli derecede su kirliliğine neden olan faktörler arasında yer almaktadır. Özellikle tekstil ürünlerinin boyanmasında kullanılan sentetik boyalar su kirliliğine neden olan birincil kirleticilerdir. Bu nedenle tekstil fabrikası atık sularının doğaya salınmadan önce arıtılması gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı ucuz ve kullanışlı bir arıtım yöntemi olan biyosorpsiyonla tekstil boyası gideriminde likenlerden elde edilen biyosorbentlerin kullanım potansiyelini belirlemektir. Çalışmada Bilecik Kent ormanından toplanan liken örneklerinden elde edilen biyosorbentler kullanılmıştır. Kurutulmuş liken örnekleri ve bu örneklerle hazırlanan kompozitlerin tekstil boyası giderimine pH, boya derişimi ve temas süresi etkisi belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre likenler kullanılarak yapılan kompozitin boya gideriminin kurutulmuş liken örneklerinin boya gideriminden daha fazladır. Bu çalışmada üretilen kompozitin ucuz ve etkin bir biyosorbent olarak kullanılması önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Atıksu arıtımı, tekstil boya, kompozit, liken

### GİRİŞ

Tekstil endüstrisinde gerek oluşum miktarı gerekse içerdiği kirleticiler bakımından önemli olan atık suların çoğunluğu boyama işlemlerinden kaynaklanmaktadır (Gül ve Dönmez, 2014). Boyama işlemleri sonucu oluşan atık suların en belirgin kirletici özelliklerinden biri renk olup; bu tür atık sularda çözünmüş ve koloidal yapıda olabilen rengin başlıca kaynağı boyar maddelerdir (San, 2007). Literatüre göre yıllık 250.000 ton boya atık sularla sucul ortamlara boşatılmaktadır (Pazdzior ve ark., 2016). Örneğin boya içeren atık suların bırakıldığı ortamlarda yüksek boya derişimleri sucul ortamdaki ışık geçirgenliğini etkilemekte ve bunun sonucu olarak da fotosentez yapan canlılar ışığı kullanamamaktadır (Namal, 2017). Sonuç olarak besin zinciri olumsuz etkilenmektedir. Boyalı atık suların çevreye olumsuz etkilerinin yanısıra sağlık açısından da olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Namasivayam and Sumithra, 2005). Endüstriyel boyama işlemlerinde kullanılan boyaların özellikle toksik, mutajenik ve kanserojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Diwaniyan ve ark., 2010). Atık sularda bulunan boyaların çok düşük derişimleri bile gözle görülür şekilde suları kirletmektedir. Biyolojik atık su arıtım yöntemleri ile boya içeren atıksuların arıtımı oldukça zordur (Khan ve ark., 2013). Katı çevresel ve yönetimsel düzenlemelerle takip edilen etkin boya giderimi yapan yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Pandey ve ark., 2007). Bu çalışmanın amacı ucuz ve kullanışlı bir arıtım yöntemi olan biyosorpsiyonla ülkemizde yaygın olarak kullanılan Remazol Black B isimli boyanın sulu ortamdan gideriminde likenlerden elde edilen biyosorbentlerin kullanım potansiyelini belirlemektir. Çalışmada Bilecik Kent ormanından toplanan liken örneklerinden elde edilen biyosorbentler kullanılmıştır. Kurutulmuş liken örnekleri ve bu örneklerle hazırlanan kompozitlerin tekstil boyası giderimine pH, boya derişimi ve temas süresi etkisi belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre likenler kullanılarak yapılan kompozitin boya gideriminin kurutulmuş liken örneklerinin boya gideriminden daha fazladır. Bu çalışmada üretilen kompozitin ucuz ve etkin bir biyosorbent olarak kullanılması önerilmektedir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

Remazol Black B isimli boyanın sulu ortamdan gideriminde kurutulmuş likenlerden elde edilen biyosorbentler kullanılmıştır. Boya gideriminde pH, boya konsantrasyonu ve liken miktarı etkisi incelenmiştir.

## Biyosorbent Hazırlanışı

Biyosorpsiyon kapasitesini araştırmak için Bilecik ili Kent Ormanı'ndan (N 400 11.5262', E 0290 57.962') toplanan likenler (*Evernia sp.*) etüvde 37°C' de 1 gün boyunca kurutulduktan (Şekil 1) sonra deneylerde kullanılmıştır.



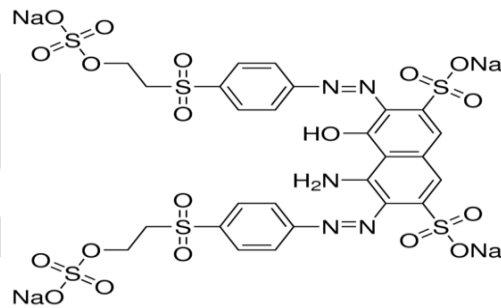
Şekil 1. Deneysel ortamda kullanılan liken türü; *Evernia sp.*

## Kompozit Biyosorbent Hazırlanışı

Poliakrilamid-Liken kompoziti sentezlemek için, 1 g Likenin 20 mL'lik süspansiyonuna 2 g Akrlamid içeren 10 mL sulu çözeltisi eklenmiş ve homojen bir karışım elde edinceye dek karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışıma 0.2 g N,N'-metilenbisakrilamid eklenmiş ve karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra 1 g Amonyumpersülfat ve 400 µL N,N,N',N'-tetrametilendiamin eklenip hızlı devirde karıştırılmış, polimerizasyon tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompozit yıkama suyunun iletkenliği yaklaşık saf su iletkenliğine ulaşana kadar saf su ile yıkanmıştır. 40 °C'de etüvde kurutulan Poliakrilamid-Liken kompoziti tanecik boyutu 50 mesh olacak şekilde öğütülmüş ve daha sonra kullanılmak üzere kapalı kaplarda saklanmıştır.

## Çalışmada kullanılan Boyanın Özellikleri

Bu çalışmada kullanılan Remazol Black B isimli boya Bilecik ilinde bulunan Sibel Tekstil firmasından temin edilmiştir. Bu boyaya ait molekül formülü Şekil 2'de verilmiş olup, bu boyanın bazı fiziksel özellikleri ise Çizelge 1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Remazol Black B 'in molekül yapısı

Remazol Black B boyası anyonik özellikte olup, azo boyalar grubunda yer almaktadır.

## Stok Boya Çözeltisi Hazırlanışı

Boyalı su içeren deney çözeltilerini hazırlamak için, öncelikle 20.000 ppm'lik stok boya çözeltisi hazırlandı. Daha sonra istenen derişimlerdeki boya çözeltileri, stok çözeltilerden alınarak seyreltme yapıldı.

## Biyosorpsiyon Deneylerinin Yapılışı

Deneyler 100 ml boyalı deney çözeltisi içeren 250 ml'lik erlenlerde s zaman ve hız kontrollü karıştırıcı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Daha sonra belirlenen zaman aralıklarında 2 'şer mililitrelik numuneler alınmış ve 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Deneyler ikili seriler halinde yapılmış olup,



ortalama değerler kullanılmıştır. Sadece boya ve distile su içeren erlenler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Boya giderimine pH (2, 4 ve 6), boya derişimi (50, 100 ve 150 mg/L) ve liken miktarı (1 ve 2 g/L) etkisi incelenmiştir.

**Çizelge 1.** RBB'nin fiziksel zellikleri (Aldrich, 1975)

Renk Yapısı	Siyah-Lacivert Toz
Kızılötesi Spektrum Dalga Boyu	593-600 nm
Sınıfı	Azo boya
Sudaki znrlk	İyi
Renk İndeks Numarası	306452
Molekül Ağırlığı	991,82
Molekül Formülü	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> Na <sub>4</sub> O <sub>19</sub> S <sub>6</sub>

### Boya Analizi

Belirli zaman aralıklarla alınan 2 ml sıvı örneklerde bulunan boya miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrede Remazol Black B için en yüksek değerin ölçüldüğü dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) 600 nm olarak belirlenmiştir.

Biyosorpsiyon verimi için kullanılan eşitlik;

- % Boya giderimi (BG) =  $((A_0 - A_f) / A_0) \times 100$

Bu eşitikte;  $A_0$ : başlangıç boya derişimi (mg/L) ve  $A_f$ : son boya derişimi (mg/L) şeklinde-dir.

### BULGULAR VE TARTIşMA

Likenlerden elde edilen biyosorbentlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçlarının hesaplanması sonucu boya giderim yüzdeleri hesaplanmıştır. Deneylerde kontrol grupları yapılmıştır ancak belirgin bir değişiklik bulunmamıştır.

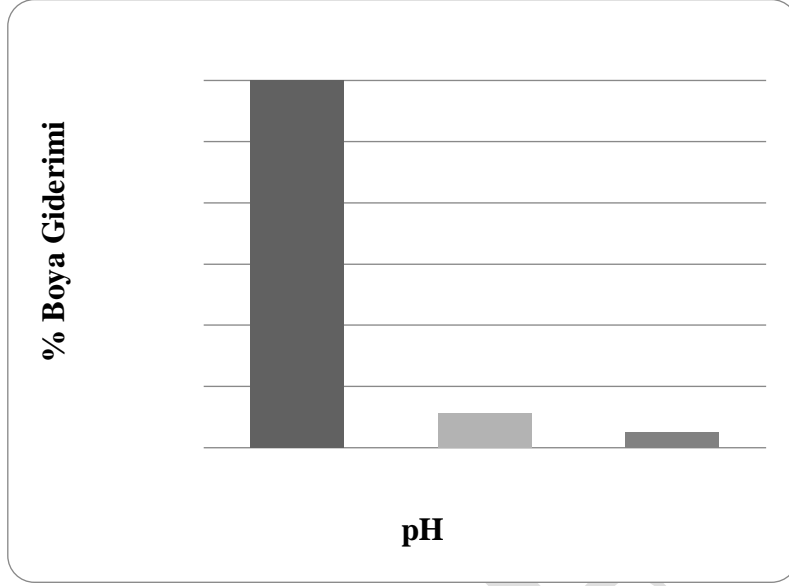
### pH Etkisi

Remazol Black B boyası biyosorpsiyonunda pH'nın etkisi pH 2, 4 ve 6 olan deney zlteleri kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular şekil 3'de verilmiş olup, şekil incelendiğinde pH değeri 2'den 6'ya doğru arttığında boya gideriminin belirgin bir şekilde düştüğü saptanmıştır. Benzer şekilde, literatürde bir siyanobakteri olan *Nostoc linckia* HA 46 ile reaktif boya biyosorpsiyonu deneylerinde pH 2'den 6'ya doğru yükseldikçe boya gideriminde keskin bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Mona ve ark. 2011). Asidik solüsyonlarda reaktif boyaların azo grupları negatif yükle yüklü iken biyosorbentın yüzeyi ise pozitif yüklenmiştir, bunun sonucu olarak boya molekülleri ile biyosorbent yüzeyi arasında elektrostatik etkileşimler oluşmaktadır (zer ve ark. 2005). Bu çalışmada yürütülen pH etkisi deneyleri sonuçlarına göre likenden elde edilen biyosorbentın yüzeyi de asidik koşullarda pozitif yüklendiği için en iyi giderimin gerçekleştiği koşullar asidik koşullar olarak belirlenmiştir. pH etkisi deneylerine göre en iyi giderim pH 2 'de gerçekleşmiştir (şekil 3).

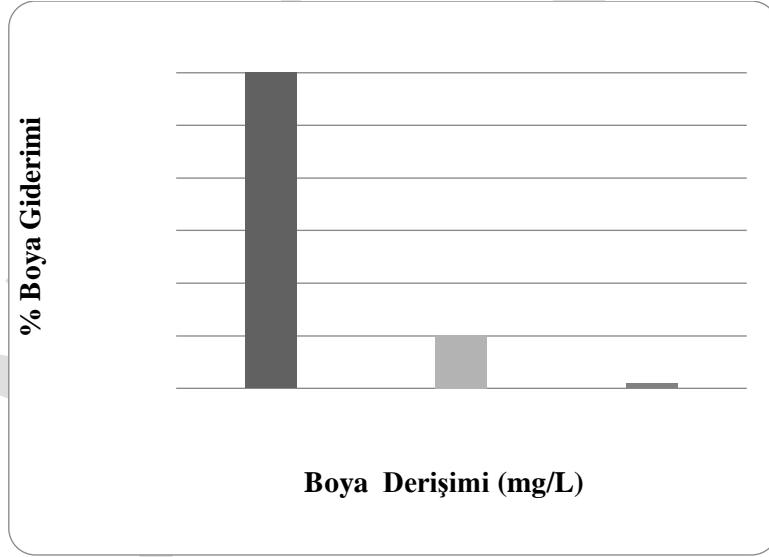
### Boya derişimi etkisi

Boya derişimi etkisi deneyleri pH 2'de faklı boya derişimlerinde yürütülmüş olup, artan boya derişimlerinde boya giderim veriminin düştüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada başlangıç boya derişimi etkisi deneylerinin sonucuna göre artan boya derişiminin verimi olumsuz etkilediği saptanmıştır (şekil 4). Daha önceden yamlanan bir çalışmada Kulkarni ve ark. (2014) başka bir liken türü olan *P. perlata*'nın boya gideriminin artan boya derişimi ile azaldığını göstermiştir. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışmada ise Bilal ve ark. (2018) bir alg türünün boya gideriminde boya derişimindeki artışın olumsuz etkilediğini göstermiştir. De Castro ve ark. 2017'de basılan bir çalışmalarında bir mantar türünün boya gideriminde artan boya derişimi ile azalma

olduğunu rapor etmiştir. Likenler algler ile mantarların birlikte yaşamından oluştukları için likenlerin algler ve mantarlara benzer özellikler göstermektedir. Bu çalışmada likenler kullanılarak yapılan deneylerin sonuçlarıyla liken türlerinin boya gideriminde alg ve mantar türlerine benzerlik gösterdiği desteklenmiştir. Boya derişimi etkisi deneylerine göre en iyi giderim 50 ppm'lik derişimde gerçekleşmiştir (Şekil 4).



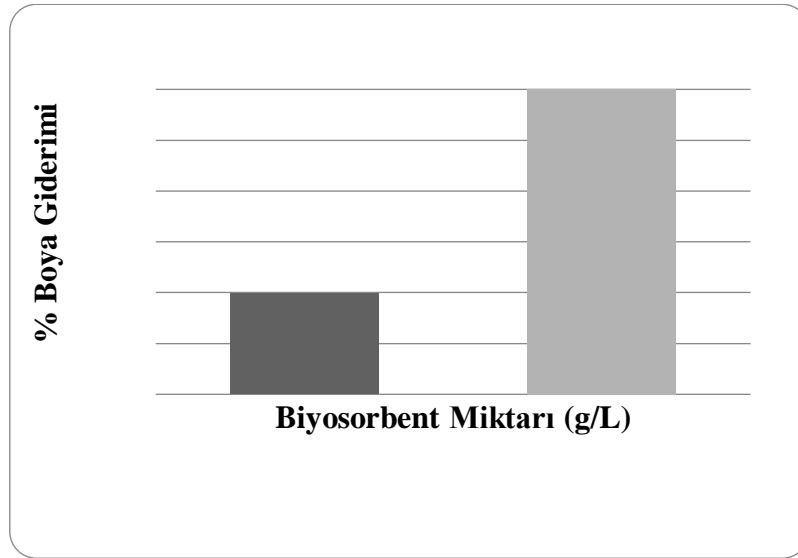
Şekil 3. pH'ın boya giderimine etkisi



Şekil 4. Boya konsantrasyonunun boya giderimine etkisi

#### Biyosorbent miktarı etkisi

Biyosorbent miktarının etkisini araştırıldığı deneylerde farklı biyosorbent dozları (1 ve 2 g/L) kullanılmıştır. Şekil 5'de görüldüğü üzere, artan biyosorbent miktarı ile birlikte boya giderimi de artmıştır. Kousha ve ark. (2012) artan adsorban miktarının adsorpsiyon oranını arttırdığını göstermiştir. Son zamanlarda yayımlana bir çalışmada algal biyokütle miktarının artışının boya biyosorpsiyon oranlarının artışına neden olduğu rapor edilmiştir (Omar ve ark. 2018). Liken miktarı etkisi deneylerine göre en iyi giderim 2g/L'de gerçekleşmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Biyosorbent miktarının boya giderimine etkisi

## SONUÇ

Sonuç olarak likenlerden elde edilen biyosorbentlerin Remazol Black B boyası biyosorpsiyonu için en uygun pH 2, başlangıç boya derişimi 50 ppm, liken miktarı ise 2g/L olarak belirlenmiştir. pH değeri ve başlangıç boya derişimin artması biyosorpsiyon verimini düşürürken liken miktarının artması biyosorpsiyon verimini arttırmaktadır. pH 2'de, 50 ppm başlangıç derişimli sulu ortama 2g/L liken eklenmesi sonucu ortamın boya konsantrasyonunda %64 giderim sağlanmıştır. Likenlerin alg ve mantarların simbiyotik birlikteliği sonucu oluşmasından dolayı toksik kirleticilere karşı toleranslarının daha yüksek olması nedeniyle biyolojik arıtmada daha avantajlı olabilecekleri düşünülmüştür.

## KAYNAKÇA

- Bilal M, Rasheed T, Sosa-Hernandez JE, Raza A, Nabeel F, Iqbal MN 2018. Biosorption: An Interplay Between Marine Algae and Potentially Toxic Elements-A Review, *Mar. Drugs*, 16:65.
- De Castro KC, Cossolin AS, Dos Reis HCO, De Morais EB 2017. Biosorption of anionic textile dyes from aqueous solution by yeast slurry from brewery, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60: 1-13.
- Diwaniyan S, Kharb D, Raghukumar C 2010. Decolorization of synthetic dyes and textile effluents by basidiomycetous fungi. *Water Air Soil Pollut* 210:409-419.
- Gül ÜD, DÖNMEZ G 2014. Influence of Surfactants on Dye Removal and Growth of *Aspergillus versicolor* – an Effective Way to Decolorize Textile Dye. *Clean Soil Air Water*, 42: 917- 922.
- Khan R, Bhawana P, Fulekar MH 2013 Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:75-97.
- Kousha M, Daneshvar E, Sohrabi MS, Koutahzadeh N, Khataee AR 2012. Optimization of C.I. Acid Black 1 biosorption by *Cystoseira indica* and *Gracilaria persica* biomasses from aqueous solutions. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 67, 56-63
- Kulkarni AN, Kadam AA, Kachole MS, Govindwar SP 2014. Lichen *Permelia perlata*: A novel system for biodegradation and detoxification of disperse dye Solvent Red 24", *Elsevier*, 461-468.
- Mona S, Kaushik A, Kaushik CP 2011. Biosorption of Reactive Dye by Waste Biomass of *Nostoc Linkia*, *Ecological Engineering*, 37: 1589-1594.
- Namal OÖ, 2017. Tekstil Endüstrisi Atıksularının Arıtımında Kullanılan Proseslerin Araştırılması'. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6: 388-390.
- Namasivayam C, Sumithra S 2005. Removal of direct red 12B and methylene blue from water by adsorption onto Fe(III)/Cr(III) hydroxide, an industrial solid waste. *J Environ Manage* 74:207-215.

- Omar H, El-Gendy A, Al-Ahmary K 2018. Bioremoval of Toxic Dye by Using Different Marine Macroalga, Turkish Journal of Botany, 42: 15-27.
- Özer A, Akkaya G, Turabik M 2005. Biosorption of Acid Red 274 on *Enteromorpha Prolifera* in a Batch System, *J. Hazard. Mater.*, 126: 119-127.
- Pandey A, Singh P, Iyengar L 2007. Review bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeter Biodegr* 59:73-84.
- Pazdzior K, Wre J, Klepacz-Smolk A, Gmureka M, Bilinska L, Kos L, Sojka-Ledakowicz J, Ledakowicz S 2016. Influence of ozonation and biodegradation on toxicity of industrial textile wastewater. *Journal of Environmental Management* 1-8
- San NO, 2007. Ağır Metal ve Boyar Madde İçeren Atıksuların *Rhodotorula sp.* ile Arıtımı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara.

DRAFT

## Yenilenebilir enerji kaynakları

Huriye Zeynep Kakacak, Derya Peker, Arzu Kırak\*

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Eskişehir, Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: a\_kirak2001@yahoo.com

### Özet

Bilim ve teknolojinin hızla gelişmesi enerji ihtiyacını her geçen gün arttırmaktadır. Son yıllarda, kömür, petrol ve doğalgaz gibi fosil yakıtların çevresel ve ekonomik olumsuz etkileri nedeniyle alternatif enerji kaynakları aranmaya başlanmıştır. Bu durum insanları, hidroelektrik enerji, jeotermal enerji, güneş enerjisi ve rüzgar enerjisi gibi doğal süreçlerde var olan ve durmaksızın devam eden enerji akışından sağlanan enerji kaynaklarına, yani yenilenebilir enerjiye yöneltmiştir. Yenilenebilir enerji kaynağı; enerji kaynağından alınan enerjiye eşit oranda veya kaynağın tükenme hızından daha çabuk bir şekilde kendini yenileyebilmesi ile tanımlanır. Güneş enerjisi, yenilenebilir enerji kaynakları arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Elektrik üretimindeki payı gün geçtikçe arttığından, bu alanda yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmış ve giderek yoğunlaşmıştır. Bu yoğun çalışmaların başında güneş panelleri üretimi gelmektedir. Güneş panelleri, güneş enerjisinden elektrik elde etmek için kullanılan en önemli malzemelerden biridir ve çalışma prensibi olarak, üzerine gelen ışığı doğrudan elektrik enerjisine dönüştüren araçtır. İnce Film Güneş Paneli'nin ortaya çıkmasının en büyük amacı, maliyeti düşürmesidir ve alışageldik panellerden değişik şekilde diğer hücrelerle bağlantı gerektirmeyen bir şekilde dizayn edilmesidir. Güneş panellerinde, ucuz imal edilen panellerin kullanımı için daha geniş bir alana ihtiyaç duyulur. Bu alana daha fazla panel yerleştirilerek istenilen enerji üretiminin gerçekleşmesi planlanır. Günümüzde sıkça kullanılan ince film güneş panelleri, Amorf Silisyum olarak küçük cihazların çalıştırılmasında ve binaların dış cephelerinde tercih edilirler. Milimetrenin binde biri ya da milyonda birinden elde edilen incelikte olan bu ürünler oldukça ekonomiktir.

**Anahtar Kelimeler:** Enerji, Yenilenebilir Enerji, Güneş Panelleri, İnce Film.

Yenilenebilir enerji kaynağı; enerji kaynağından alınan enerjiye eşit oranda veya kaynağın tükenme hızından daha çabuk bir şekilde kendini yenileyebilmesi ile tanımlanır. Örneğin, güneşten elde edilen enerji ile çalışan bir teknoloji bu enerjiyi tüketir, fakat tüketilen enerji toplam güneş enerjisinin yanında çok küçük kalır. En genel yenilenebilir enerji şekli güneşten gelendir. Bazı formlar güneş enerjisini ve rüzgar gücünü depolar. (Şekil 1)

Yenilenebilir enerjinin; tesisler, hayvanlar ve insanlar tarafından kalıcı olarak tüketilmesi mümkün değildir. Fosil yakıtlar, çok uzun bir zaman çizelgesi göz önüne alındığında teorik olarak yenilenebilir iken, istismar edilerek kullanılması sonucu yakın gelecekte tamamen tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Enerji üretimi için doğal süreçlerden yararlanılan, kullanılan kaynakların tükenme hızından çok daha hızlı bir sürede kendini yenileyebilen enerji kaynakları karşımıza çıkıyor [1].

Yenilenebilir enerji, özetlemek gerekirse; enerji üretimi için doğal süreçlerden yararlanılan, kullanılan kaynakların tükenme hızından çok daha hızlı bir sürede kendini yenileyebilen enerji kaynakları karşımıza çıkıyor [2].

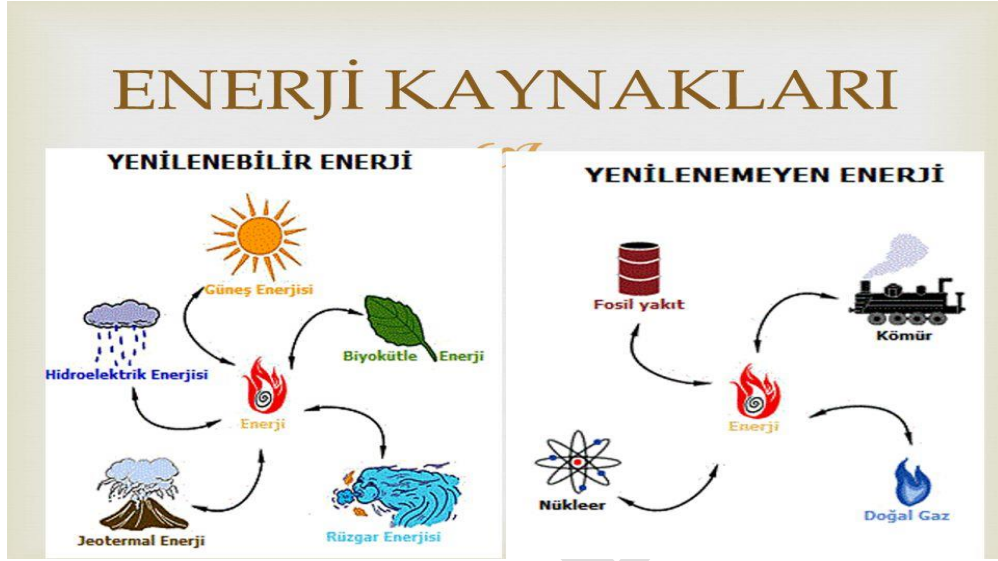
Yenilenebilir Enerji Kaynaklarının Önemi; Gelecek nesillerin enerji ihtiyacını karşılamak ve çevreye verilen zararı en aza indirgeyebilmek için sürdürülebilir enerji kaynaklarına yönelmemiz gerekiyor.

Sürdürülebilir enerji kaynakları, enerji kaynaklarını riske atmadan gerekli olan ihtiyacı karşılamak için üretilen enerjiye deniyor. Yenilenebilir enerji kaynakları da devamlılığı ve ihtiyacı karşılama konusunda en önemli rolü oynuyor [3].

Yenilenebilir enerji;

- Bir ülkenin kalkınması için en önemli madde enerjidir. Bu yüzden yenilenebilir enerji kaynakları önemlidir,
- Fosil yakıt kullanımını azalttığı için çevresel açıdan önemlidir,
- Yerli kaynakların geliştirilmesinde büyük öneme sahiptir,
- Dışa bağımlılığı azalttığı için önemlidir,

- Uluslararası anlaşmalara uyum sağladığı için önemlidir,
- Yeni iş istihdamı sağlar ve işsizliği azaltır,
- Elektrik götürmenin zor olduğu coğrafi bölgelere elektriğin kullanılmasını sağladığı için önemlidir [4].



Şekil-1. Enerji kaynakları [5]

### Güneş Enerjisi:

Güneş enerjisi, dünyaya gelen güneş ışınlarının güneş panelleri yardımı ile ısı ve elektriğe dönüştürülmesi sonucu oluşur. Doğal enerji kaynakları arasında yer alan güneş enerjisi, çevreye hiçbir zararı olmadan elde edilebilir. Önceleri çok daha maliyeti yüksek olan bu enerji türü şimdilerde daha uygun maliyetler sayesinde hızla artmaktadır. Ayrıca güneş enerjisinin kullanım alanları da çok fazladır ve her geçen gün artmaktadır.

### Rüzgar Enerjisi:

Solar Panel teknolojisi, 1839 yılından bugüne çok fazla ilerleme gerçekleştirdi. Gerek verimlilik, gerekse ucuz güneş paneli maliyetleri açısından güzel bir ilerleme kaydetti. Güneş ışınlarının dünyaya gelişindeki farklılıklar sayesinde oluşan basınç ve dünyanın dönüşü ile ortaya çıkan rüzgarlar sayesinde elde edilen enerji türüdür. Yoğun rüzgar olan yerlerde kurulan rüzgar türbinleri sayesinde elde edilen rüzgar enerjisi, yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer alır. Teknolojik gelişmeler sayesinde rüzgarın tahmin edilebilir olması rüzgar enerjisini daha etkili kullanabilmemize yardımcı olmaktadır.

### Hidrolik (hidroelektrik) Enerjisi:

Hidroelektrik enerjisi, suyun akış gücü kullanılarak elde edilen ve sera gazı salınımı yapmaması sayesinde dünyaya hiçbir zararı olmayan enerji çeşididir. Hidroelektrik enerjisi, suyun akışının yarattığı kinetik enerjinin kanallar vasıtası ile türbinlere iletilmesi ile üretilir. Özellikle yüksekliğin ve su akış hızının fazla olduğu yerlerde hidroelektrik üretimi yapılması büyük avantaj sağlayacaktır.

### Jeotermal Enerjisi:

Jeotermal enerji, jeotermal kaynakların bulunduğu yerlerde direkt ya da dolaylı yollardan elde edilen enerji türüdür. Isıtma, soğutma, elektrik üretimi ve mineral üretimi gibi farklı amaçlara hizmet eden bu enerji türü aynı zamanda kaplıcalar yardımı ile turizm sektörüne de yardımcı olmaktadır.

### Hidrojen Enerjisi:

Hidrojen enerjisi, doğada bileşikler halinde bulunan hidrojen gazının işlenmesi ve dönüştürülmesi ile oluşan enerji kaynağıdır. Doğal enerji kaynağı olmamasına rağmen, sürdürülebilir ve alternatif enerji kaynakları arasında yer alır.

### **Dalga Enerjisi:**

Dalga enerjisi, denizlerde oluşan dalgalanma hareketinden ve dalgaların oluşturduğu basınçtan elde edilen enerji türüdür. Dalga enerjisinden, dalga jeneratörleri yardımı ile doğal ve sürdürülebilir enerji üretimi sağlanmaktadır.

### **Gelgit Enerjisi:**

Bunların dışında, henüz yeterli miktarda enerji üretmese de, piezoelektrik enerjisi de yenilenebilir enerji kaynakları arasında görülebilir. Piezoelektrik enerjisi mekanik enerjiyi elektrik enerjisine çevirir [6].

### **Güneş Enerjisi ve Güneş Panelleri:**

Güneş panelleri, güneşten gelen ışıkları elektrik enerjisine çevirir. Kullanıcılar ise, güneş enerjisinden elde ettikleri elektrik enerjisini inverter (evirici) ile alternatif akıma çevirerek kullanır. İşte bu güneş enerjisinden elektrik üretmek isteyenler için tercih edilecek solar panel burada büyük rol oynamakta. Eğer yanlış bir photovoltaic module (solar panel) seçimi yapılırsa, belki de güneş enerjisi sistemi çöp durumuna düşebilir. (Şekil 2)



Şekil-2. Güneş paneli [6].

Solar Panel teknolojisi, 1839 yılından bugüne çok fazla ilerleme gerçekleştirdi. Gerek verimlilik, gerekse ucuz güneş paneli maliyetleri açısından güzel bir ilerleme kaydetti.

Güneş paneli çeşitleri başlıca şunlardır ;

- monokristal güneş paneli (Monocrystalline Silicon Solar Module)
- polikristal güneş paneli (Polycrystalline Silicon Solar Module)
- ince film güneş paneli (Thin Film Solar Module)
- esnek güneş paneli
- saydam güneş paneli

Güneş enerji paneli çeşitleri arasındaki en verimli güneş paneli monokristal'dir. Bu güneş paneli türü , küçük alanda büyük enerji üretir. Ancak monokristal enerji panellerinin fiyatı diğer güneş panellerine göre daha pahalıdır. Monokristal güneş hücrelerinin verimlilikleri yaklaşık %24 oranındadır. Bu oran piyasada bulunan diğer güneş enerji panellerine göre çok fazladır. Ama watt başına birim fiyatı da aynı şekilde diğer enerji panellerine göre neredeyse 2 katını bulabilmektedir. Bu güneş panellerinin kullanım ve elektrik üretim ömrü daha uzundur. Ek olarak, monokristal solar paneller sıcak iklimlerde daha verimli çalışabilmektedir.

İnce film güneş paneli; güneş enerjisinden elektrik üretimi piyasasında en küçük oranda paya sahiptir. İnce film güneş pilleri pek tercih edilmez. Bu solar panel türünün tercih edilmemesinin en büyük sebebi ise verimleri az olmasıdır. Bu ince film güneş pilleri, çok fazla yer kaplamaktadır. Ama bu kadar alan kaplamasına rağmen, alan-verim ilişkisi açısından çok kötü bir performansa sahiptir. Bu solar panel çeşidinin yaklaşık

verimliliği %7 civarındadır. Bu gerçekten düşük bir verimliliğdir. Ancak bu solar paneller çok şık bir görüntüye sahiptir. Daha çok tasarım için tercih sebebidir diyebiliriz [7].

## KAYNAKLAR

YEGM- Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü.

Hüseyin Öztürk, Yenilenebilir Enerji Kaynakları, Birsen Yayınevi, İstanbul, 2013.

TEİAŞ, Türkiye’de Elektrik Enerjisi Kurulu Gücü, 2018.

Yenilenebilir Enerji Kaynakları Nelerdir, Available at: <https://www.enerjiportali.com/yenilenebilir-enerji-kaynaklari-nelerdir/> [Erişim 20.06.2019]

Available at: <https://slideplayer.biz.tr/slide/5583024/17/images/2/ENERJ%C4%B0+KAYNAKLARI.jpg> [Erişim 20.06.2019]

Available at: <http://www.yapi.com.tr/h> [Erişim 20.06.2019]

Solar Panel Çeşitleri nelerdir, Available at: <https://www.enerjibes.com/solar-panel-cesitleri-nelerdir/> [Erişim 20.06.2019]

DRAFT



## Biyoaktif bileşiklerin oleojel dağıtım sistemleriyle hazırlanması ve uygulamaları

Emin Yılmaz\*, Eda Keskin Uslu

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çanakkale,  
Türkiye

\*Sorumlu yazar e-mail: eyilmaz@comu.edu.tr

### Özet

Oleojel, yemeklik likit yağların uygun organojelatörlerle karıştırılması ve işlenmesiyle hazırlanmış, oda sıcaklığında yarı katı/katı kıvamda olan, çoğunlukla termo geri dönüşümlü, üç boyutlu ağ yapıdaki jellerdir. Gıda sektöründe katı yağ ihtiyacını karşılamak için kullanılmaktadır. Ancak ilgi çekici yapısal özellikleri (kolay hazırlanma, yenilebilir ve güvenli olma, ucuz olma, uzun raf ömür, termo geri dönüşümlülük vb.) nedeniyle birçok biyo-aktif bileşenin enkapsülasyonunda ve dağıtım sistemlerinin hazırlanmasında da büyük bir potansiyel bulunmaktadır. Özellikle biyo-aktif ve farmakolojik maddelerin oral ve dermal dağıtım ve kontrollü salım sistemleri için araştırmalar yapılmaktadır. Bileşenlerin çözünürlük sorununun giderilmesi, korunması, kontrollü salınım, kolay erişilebilirlik, kolay hazırlanma, ucuz olma gibi avantajlar sunmaktadır. Bu derlemede konu ana hatlarıyla incelenmiş ve gelecek için araştırma ihtiyaçları tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** oleojel, biyo-aktif, ilaç, enkapsülasyon, dağıtım, kontrollü salınım

### Abstract

Oleogel is the three dimensional network gel constructed with special organogelators and edible liquid oils, and pose semi-solid/solid consistency at room temperature with therno-reversibility property. They are used to satisfy the structured fat need in the food industry. But they have great potential to encapsulate and deliver bio-active compounds due to their interesting strcutural properties (ease of preparation, edible and safe, cheap, long shelf life, thermo-reversibility etc.). Especially researches have been continuing for oral and dermal delivery of bio-active and drug compounds. It has advantages of resolving solubility problems, providing preservation, controlled delivery, bioavailability, easiness of preparation and being cheaper. In this review, the topic is mainly discussed and future research demands are defined.

**Keywords:** oleogel, bio-active, drug, encapsulation, delivery, controlled release

### GİRİŞ

Gıda maddelerinden biyoaktif maddelerinin salınım hızı ve biyoyararlanımı, hem katma değerli gıda ürünlerinin hem de nutrasötiklerin geliştirilmesinde çok önemli hususlardır. Özellikle biyoaktif bileşiklerin oral yoldan alındıktan sonra çözünmesi ve biyoyararlanımının yüksek olması için, bu bileşiklerin kan dolaşımındaki salınım hızının kontrol edilmesi gerekmektedir (Felt ve ark., 1998; Turner ve ark., 2004; Hughes ve ark., 2009). Biyoaktif bileşiklerin insan vücudundaki olası etkinliği, bu moleküllerin biyoyararlanımı ile büyük ölçüde belirlenmektedir (Kulkarni ve ark., 2007; Swieca, 2016).

Biyoaktif bir bileşiğin terapötik aralığın üstünde veya altında konsantrasyonlarda bulunması, olumsuz yan etkilere ve orijinal semptomların yeniden ortaya çıkmasına neden olabilir (Turner ve ark., 2004). Bununla birlikte biyoaktif bileşik, sabit veya kontrollü bir hızda kan dolaşımına salınırsa, konsantrasyonu emilim süreci boyunca terapötik aralığın üstünde veya altında sapmayacak ve böylelikle negatif belirtileri ve yan etkileri önleyecektir. Ayrıca, kontrollü salınım teknolojisi, hasta uyumu ve dolayısıyla artan ilaç güvenliği ve verimliliği ile ilişkili daha az sıklıkta dozlama yapılmasına olanak tanımaktadır. Kontrollü salınım teknolojisi artık, ilaçlar ya maddelerle kapsüllenene ya da oral yoldan verildikten sonra kan dolaşımına ilaç salınım hızını geciktirmek ya da kontrol etmek üzere tasarlanan tabletlere dahil edilen ilaç sanayiinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Hughes ve ark., 2009).

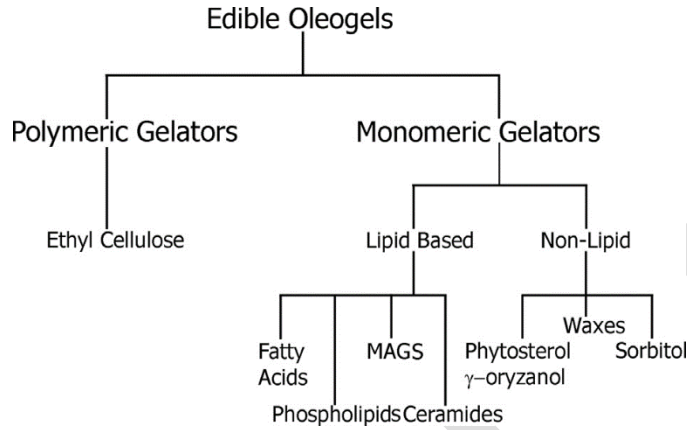
### ORGANOJELLER

Organojeller, "organojelator" moleküllerinin bir araya getirilmesiyle kovalent olmayan etkileşimler yoluyla kendiliğinden gelişen 3 boyutlu bir ağ içinde sıkışan organik çözücülerle karakterize edilen katı-benzeri sistemlerdir (Şekil 1) (Co ve Marangoni 2012; Lupi ve ark., 2012; Ögütücü ve Yılmaz, 2015).

Bir organojel, termo-tersinir, susuz ve viskoz elastik yapıda olup organik faz yenilebilir yağ olduğunda oleojel olarak adlandırılmaktadır (Hughes ve ark., 2009; Dassanayake ve ark., 2011; Marangoni ve Garti 2011).

Bir oleojel yapmak için düşük konsantrasyonda jelatör molekül yağa eklenir. Uygun işlemle (örneğin ısıtma, karıştırma ve soğutma), moleküller yağ fazına dağıtılır ve sıvı yağın yapılandırılmasıyla 3-boyutlu ağlar oluşturmak için kendilerini toplarlar. Ağ yapısı, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağlama, stearik etkileşimler, iyonik etkileşimler veya kovalent bağlanma ile gerçekleştirilir (Marangoni ve Garti 2011).

Organojeller yaygın olarak polimerik (PO) ve LMW (düşük molekül ağırlıklı) organojeller olarak ayrılırlar (Şekil 1). PO'nun yapısı çoğunlukla çapraz bağlı polimer moleküllerinden oluşan bir ağa dayanmaktadır (Marangoni, 2013), LMW organojelatör molekülleri ise (jel oluşumunun destekleyicisi) hem kristallerin içine kendiliğinden yerleşebilir hem de çözücü kristalleşmesini teşvik edebilir. Sonuç olarak, elde edilen kristal agregatlar, aralarında ve solventle etkileşime girebilir, sistemi dengede tutabilir ve tipik bir ağ yapısını oluşturabilirler (Tang ve Marangoni 2007).



Şekil 1. Oleogel oluşturmak için kullanılan farklı teknikler.

## BIYOAKTİF BİLEŞİKLER

Günümüzde, Gıda Bilimi ve Teknolojisinde yapılan önemli araştırma alanlarından biri biyolojik aktiviteye sahip yeni doğal bileşenlerin çıkartılması ve karakterizasyonudur (Silva ve ark., 2016).

Biyoaktif bileşikler, gıdalardaki küçük miktarlarda tipik olarak ortaya çıkan ekstra beslenme bileşenleridir (Kris-Etherton ve ark., 2002). Birçok biyoaktif bileşik keşfedilmiştir. Bu bileşikler kimyasal yapı ve işlev bakımından çok çeşitlidir ve buna göre gruplandırılmıştır. Karotenoidler, uçucu yağlar ve antioksidanlar da dahil olmak üzere biyoaktif bileşikler, duyuusal özelliklerini geliştirmek veya beslenme ve sağlık özelliklerini geliştirmek için gıda ürünlerinde yaygın şekilde kullanılırlar (Mahfoudhi ve ark., 2016). Biyoaktif bileşik içeren fonksiyonel gıdalar, temel beslenmenin ötesinde arzu edilen sağlık yararları sağlayabilir ve yaşam tarzı ile ilgili hastalıkların önlenmesinde önemli roller oynayabilirler (Wang ve ark., 2012). Biyoaktif bileşikler, anti-mikrobik, anti-kanser, anti-obeze, anti-diyabetik, anti-ülserojenik ve anti-hipertansif ve anti- mutajenik özellikler olmak üzere potansiyel terapötik faydalarla birlikte diyet antioksidanlarının iyi bir kaynağıdır (Zhu ve Liu 2013).

Biyoaktif bileşikler genellikle nem, ışık, sıcaklık, pH, enzimatik faaliyetler, gıda matrisi, tüketim ve sindirim gibi faktörlerden etkilenirler ve bu nedenle gıda işleme veya depolama periyodu sırasında bozunmaya meyilli olduklarından, (Wang ve ark., 2012) gıdaların renk, lezzet ve doku gibi duyuusal özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilirler (Vélez ve ark., 2017). Söz konusu etmenler, besin matrisindeki biyoaktif maddelerin biyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin azalmasına, sulu sistemlerde düşük çözünürlüğe ve biyolojik mevcudiyetini, salınım süreçlerini ve antioksidan etkilerini etkilemektedir (Mahfoudhi ve ark., 2016; Silva ve ark., 2016).

Gıdaların özellikleri ve biyoaktif madde adsorpsiyonu arasındaki ilişkilerin daha derin anlaşılması ile birlikte, gıdaları koruyucu ve gastrointestinal sistemdeki belirli noktalarda kontrollü salınımını sağlayan gıda maddelerinin ve kapsülleme yöntemlerinin tasarımı gerçekleştirilmiştir (Hejazi ve Amiji, 2003; McClements ve ark., 2009b).

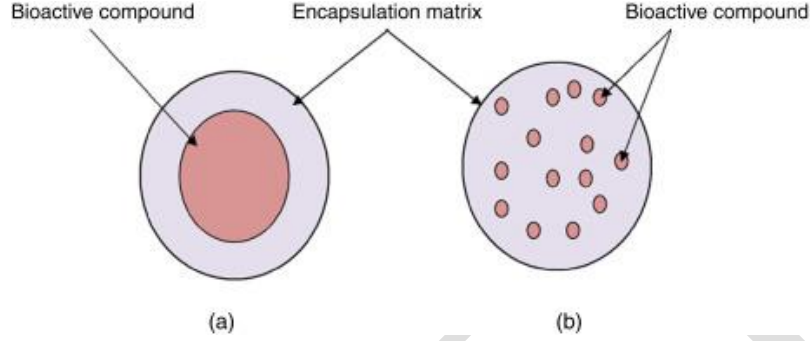
Biyoaktif bileşiklerin kapsüllemesi, biyoaktiflerin stabilize edilmesi ve serbest bırakılmalarının kontrol edilmesi, biyoyararlanımının artırılması, çözünürlüklerinin etkin bir şekilde korunması ve iyileştirilmesi için yenilebilir dağıtım sistemlerinin kullanılması potansiyel olarak önerilmiştir (Mahfoudhi ve ark., 2016). Bu bileşenlerin kapsüllemesinin en yaygın nedeni, onları bozucu faktörlere karşı koruyarak veya buldukları gıdalardaki bileşenlerle reaksiyonları önleyerek raf ömrünü uzatmaktır (Schrooyen ve ark., 2001).

Biyoaktif bileşiklerin kapsüllemesinin amaçları;

- fonksiyonel özellikleri korumak,

- ilgili (çoğunlukla sulu) ortamda düşük çözünürlüklü bileşiklerin stabilitesini arttırmak,
- istenmeyen lezzetleri maskeleyerek,
- gıda ürünlerinin sağlık yararlarını arttırmak (fonksiyonel gıdaların geliştirilmesi),
- biyoaktif bileşiklerin istenen zamanda ve spesifik hedefte serbest bırakılmasını kontrol etmek ve
- biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımı arttırmaktır (Gunasekaran ve ark., 2007).

Biyoaktif bileşiklerin enkapsülasyonu, partiküllerin veya damlacıkların bir kaplama ile çevrildiği veya aktif özelliklere sahip küçük kapsüllerin, homojen veya heterojen bir matriste gömülü olduğu bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2) (Mahfoudhi ve ark., 2016).



Şekil 2. Biyoaktif bileşenlerin kapsülasyonu.

### Biyoyararlanım

Biyoyararlanım, gıdalardan emilen besinlerin, bağırsakta metabolize edilerek absorbe edilmesi sonrasında metabolik süreç ve depolamada elde edilebilecek fraksiyonu olarak tanımlanır (Hedren ve ark., 2002; Cardoso ve ark., 2015). Biyoyararlanım, biyoaktif bileşiklerin veya oral ilaçların biyo-etkinliğini sağlamada önemli bir adımdır. Serbest kalma, emilim, dağılım, metabolizma ve eliminasyon safhaları olmak üzere çok sayıda aşamadan oluşan karmaşık bir süreçtir. Bu nedenle, yapısal değişiklikler, nanoteknoloji ve koloidal sistemler de dahil olmak üzere biyoyararlanımın iyileştirilmesi için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Gıdalardaki biyoaktif bileşiklerinin karmaşık yapısından ve ayrıca hidrofilik/lipofilik biyoaktif bileşiklerin farklı emilme mekanizmalarına bağlı olarak, gıda bileşenlerinin biyoyararlanımının sağlanması oldukça zordur. Biyoaktif gıda bileşenlerinin biyoyararlanımı ve biyo-etkinliği hakkında birçok çalışma olmasına rağmen, etkileşimleri, metabolizmaları ve etki mekanizmalarının anlaşılması hala kapsamlı çalışmalar gerektirmektedir (Rein ve ark., 2013).

Biyoyararlanım, biyo-erişilebilirlik, gıda matris etkisi, taşıyıcılar, moleküler yapılar ve metabolize edici enzimler gibi birçok farklı faktörden etkilenmektedir (Rein ve ark., 2013). Biyoyararlanımı belirleyen en önemli faktörlerden biri, gıda matrisinden salınan ve sindirim sırasında çözündürülen bir bileşiğin fraksiyonu olarak tanımlanan biyolojik olarak erişilebilirliktir; yani potansiyel olarak emilim için elde edilebilen bir bileşiğin fraksiyonudur (Alminger ve ark., 2014). Emilim için tüketilen molekülün fraksiyonuna biyolojik olarak erişilebilirlik, biyoyararlanıma önemli katkıda bulunur. Biyolojik olarak erişilebilir olabilmesi için, yağda çözünür moleküller matrislerinden salınmalı, sindirim ürünleri ve safra tuzlarından oluşan karışık miseller içine dahil edilmelidir. Misellerde çözüldükten sonra lipofilik moleküller ince bağırsağın epitel hücrelerine absorbe edilebilir ve vücut içinde taşınabilir (McClements ve Li, 2010).

Farmasötik alanında araştırma yapan bilim adamlarının karşı karşıya olduğu zorluk, bu molekülleri yeterli biyoyararlanıma sahip ilaçlarla oral yoldan verilir hale getirmektir. Bu moleküllerin oral biyoyararlanımını arttırmak için en popüler yaklaşımlardan biri de lipid esaslı bir ilaç dağıtım sistemlerinin kullanılmasıdır (Dahan ve Hoffman 2008).

Genel olarak, lipid bazlı sistemlerde lipofilik moleküllerin biyolojik olarak erişilebilirliği, matrisin doğasına ve kompozisyonuna, lipid damlacık yüzey alanı ve lipofilik molekülün durumu ve diğer faktörlere bağlı olarak değişebilir (McClements ve ark., 2008). Bununla birlikte, farklı lipofilik moleküllerin, farklı kimyasal ve fiziksel bileşimlerinden dolayı, aynı sistemden farklı sindirim davranışları ve biyoyararlanım düzeyleri gösterebilmektedir (Nik ve ark., 2011). Sindirilebilir lipidlerin, lipid ile çözünen moleküllerle birlikte tüketilmesi, bu lipofilik moleküllerin biyolojik olarak erişilebilirliğini, dolayısıyla da biyoyararlanımını arttırdığı tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Lipofilik moleküllerin, lipid tabanlı sistemle birlikte verilmesi ile biyolojik olarak erişilebilirliği çeşitli şekillerde optimize edilebilir (Nik ve ark., 2011). Lipid sistemlerinde, lipoliz seviyeleri, modifiye edilebilir salınım profilleri ve lipid çözünür moleküllerin biyolojik olarak erişilebilirliğinin artırılmasıyla yeni materyal hazırlanabilir (O'Sullivan 2016).

## Dağıtım sistemleri

Dağıtım sistemleri, aktif maddelerin uygulanması, dahil edilmesi ve hedeflenen bölgelere uygulanması için kullanılan çeşitli yöntem ve yaklaşımları ifade etmektedir (Singh 2011). Dağıtım sistemleri ayrıca, obezite ile mücadele etmek üzere tasarlanmış fonksiyonel gıdaları geliştirmek, biyoaktif besin maddelerinin salınımı ve biyoyararlanımı için kullanılmalarının yanı sıra, (Maljaars ve ark., 2008) oksidasyona, enzimatik hidrolize karşı koruma sağlar ve lipofilik ilaçların çözünürlüğünü geliştirir ve dolayısıyla biyoyararlanımını artırır (Talegaonkar ve ark., 2008).

İdeal olarak, bir dağıtım sistemi, gıda ve diğer endüstrilerde uygulanması için bir takım fonksiyonel niteliklere ve teknik özelliklere sahip olmalıdır. En önemli kriterlerden bazıları aşağıda listelenmiştir.

• **Yükleme kapasitesi:** Yükleme kapasitesi, kütlenin bir ölçüsüdür. İdeal olarak, bir teslimat sistemi yüksek bir yükleme kapasitesine sahip olmalıdır.

• **Yükleme etkinliği:** İdeal olarak, hazırlama, saklama ve taşıma boyunca yükleme etkinliğinin yüksek (% 100) olmasını ister.

• **Dağıtım etkinliği:** Dağıtım etkinliği (DE), dağıtım sisteminin, kapsüllenmiş materyali gerekli faaliyet yerinde verme kabiliyetinin bir ölçüsüdür. İdeal olarak, belirlenen eylem yerinde dağıtımın etkinliği yüksek (% 100) olmasını istemektedir.

• **Dağıtım mekanizması:** Dağıtım sistemi, fonksiyonel bileşeni belirli bir eylem alanına taşıyacak ve daha sonra oradan serbest bırakacak şekilde tasarlanmalıdır. Salınım, kontrollü bir oranda veya belirli bir çevresel faktöre (örn., pH, iyonik güç, enzim aktivitesi veya sıcaklık) tepki vermek zorunda kalabilir.

• **Kimyasal bozulmaya karşı koruma:** Dağıtım sistemi, kapsüllenmiş materyali oksidasyon, hidroliz vb. kimyasal bozunma mekanizmasına karşı koruyacak şekilde tasarlanmalıdır. Bu kimyasal bozunma reaksiyonlarının oranı, ısı, ışık, oksijen veya spesifik kimyasallar gibi kontrol edilmesi gereken bazı faktörler tarafından teşvik edilebilir.

• **Biyoyararlanım:** Bir dağıtım sistemi, kapsüllenmiş biyoaktif bileşenin biyoyararlanımı iyileştirmeli veya en azından olumsuz bir şekilde etkilememelidir (McClements ve Li, 2010).

• **Gıda sınıfı:** Eğer dağıtım sistemi gıda ürünlerine dahil edilecekse, tamamen gıda sınıfı (GRAS) maddelerden imal edilmelidir.

• **Gıda matrisiyle uyumlu:** Dağıtım sistemi, kullanılacağı gıda matrisi ile uyumlu olmalıdır, diğer bir deyişle son ürünün görünümünü, dokusunu, akışını ve stabilitesini olumsuz yönde etkilememelidir.

• **Gıda ile uyumlu proses:** Dağıtım sistemi, gıda ürününün pH değişimleri, yüksek iyonik kuvvet, ısı işlem, soğutma, dondurma, dehidrasyon, üretim, depolama koşullarında stabil olmalıdır.

• **Ekonomik üretim:** Dağıtım sistemi, ucuz malzemeler kullanılarak ekonomik olarak üretilebilir olmalıdır (McClements ve Li, 2010).

Gıdalar ve içeceklerle dahil olabilecek biyoaktif lipofilik bileşenlerin her biri, suda düşük çözünürlük, zayıf kimyasal stabilite, yüksek erime noktası ve / veya düşük biyoyararlanım gibi doğrudan gıda matrislerine dahil edilmesi gibi çeşitli zorluklara sahiptir. Bu zorlukların üstesinden gelmek için etkin dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine yönelik aktif araştırmalar bulunmaktadır (McClements ve Li, 2010).

Gastrointestinal (GI) sistem içindeki lipofilik bileşenlerin sindirim, salınım ve emilimini kontrol etmek için özel olarak tasarlanmış dağıtım sistemleri, gıda ve ilaç endüstrilerinde çeşitli uygulamalar için geliştirilmiştir (Singh ve ark., 2009). Bu matrisler, spesifik lipidlerin biyoyararlanımı arttırmak veya azaltmak için veya biyoaktif bileşenleri gastrointestinal sistem içindeki spesifik yerlerde salmak için kullanılabilir. Bu iletim sistemleri, GI yolu içindeki belirli yerlerde, örneğin ağız, mide, ince bağırsak veya kolondaki lipofilik ilaçların ve diğer biyoaktif bileşenlerin salınmasını kontrol etmek için kullanılabilir. Söz konusu sistemler ile arzu edilen bileşik, insan vücudundaki belirli noktaya, örneğin ağız, karın, ince bağırsak veya kolonda verilebilme imkanı sağlanmaktadır (Wang ve ark., 2012).

Lipid bazlı jeller, sistemdeki yağ varlığına bağlı olarak çözünürlük ve biyoyararlanımı artırmak açısından diğer lipid iletim sistemleri ile aynı avantajlara sahiptir. Buna ek olarak, jeller, biyoaktif bileşikler için kararlılığı artırır, sıvı veya katı lipit sistemlerinde oluşabilen yeniden kristalleşmeyi veya çökelmeyi önleyebilir (O'Sullivan ve ark., 2016). Oleojeller, özellikle polimer esaslı jeller, katı lipit sistemlerine alternatif olarak daha yüksek kararlılıkla katı-benzeri bir matris sunabilirler. Oleojellerin bir alt grubu olan polimer oleojelleri, hidrojellere ilginç bir alternatiftir çünkü aynı kompleks matrisi paylaşır, ayrıca hidrofobik bir ortama sahiptir (Davidovich-Pinhas, 2015). Polimer organojelasyonu, jel matrisine bağlı olarak lipid fazındaki biyoaktif maddenin hareketliliğini yavaşlatabilir (O'Sullivan ve ark., 2016).

Salınım kontrolü için jel matrislerini manipüle etme yeteneği, oleojellerin bir diğer benzersiz avantajıdır. Kontrollü salınım, biyoaktif maddenin düzenli plazma konsantrasyonuna kademeli olarak bırakılmasına izin verilen ilaç dağıtımında özellikle önemli bir kalitedir. Oleojeller, içerisinde biyoaktif madde bulunan molekülün, vücut içinde daha uzun bir süre boyunca salınmasını sağlar (Turner ve ark., 2004).

### **İlaç ve biyoaktif maddelerin organojeller ile dağıtım sistemleri**

İlaç dağıtımını kontrol etmek, lokalize etmek ve iyileştirmek amacıyla uygun ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek için artan bir talep vardır. Bundan dolayı, pek çok doğal ve sentetik lipidlerin, suda çözünür olmayan ilaçların oral biyoyararlılığını geliştirmesi amaçlanmaktadır. Hidrofilik formdaki katı formülasyonlarda uygulandıklarında, bu bileşikler düşük çözünürlük göstermesi nedeniyle düşük biyoyararlanımı gösterirler, zira çözünürlük zayıf oldukları için absorpsiyon kapasiteleri de sınırlı olabilir (Nanjwade ve ark., 2011).

Sıvı ilaçların transdermal, rektal ve parenteral olarak verilmesi de dahil olmak üzere oral olmayan uygulamalarda organojel (sulu olmayan çözücülerle yapılan jeller) dağıtım amaçlı kullanılmaktadır (Sagiri ve ark., 2014). Oral verilme için organojeller daha az yaygındır ve literatürde sadece birkaç örnek vardır (Murdan ve ark., 2005).

Mevcut ilaç verme yöntemlerinde, birçok ilacın terapötik etkileri, istenen hedef bölgeye ulaşmadan önce meydana gelen vücuttaki biyokimyasal bozulmaya bağlı olarak ilacın kısmen kaybedilmesi nedeniyle sınırlanmakta veya azalmaktadır (Singh, 2011).

Farmasötik uygulamalarda, sıvıların jelleşmesi, sürekli ve kontrollü ilaç salınımı için önemlidir. Bu formülasyonlardan bazıları, tüm bileşenlerin kontrollü salınım karakteristiği için 'jelleşmeyi' gerektirir. Bu formülasyonlar, ilacın kapsüle edilmesi, emülsifikasyonu veya çözünürlüğü için farklı surfaktanlar ve çözüdürücüler gibi çok çeşitli organik çözücüler içermektedir (Murdan, 2005).

Organojeller, farmasötik alanda farklı uygulama yolları vasıtasıyla transdermal, rektal, oftalmik ilaç ve aşı dağıtımını için kullanılabilir, ancak nispeten az sayıda olan bu formülasyonlar incelendiğinde, araştırılan organojellerin çokluğuna rağmen ilaç dağıtımında sadece birkaç organojel kullanılmıştır. Temel kısıtlama, organojel uygulamalarında kullanılan jelatör ve organik çözücüler hakkındaki toksikoloji bilgisinin azlığı, farmasötik olarak kabul edilen organik çözücülerin sınırlı sayıda olması ayrıca çoğu organojelin, ilaç dağıtımının bir araştırma odağı olmayabileceği kimya veya fizik bölümlerinde araştırılmasıdır (Anand ve ark., 2001).

Farmasötikteki organojellerin çoğu lesitin, jelatin veya sorbitan ester esaslı sistemlerdir. Bunlar, termodönüşüm, her tür ilaç molekülünü dahil etme kabiliyeti, geliştirilmiş ve kontrollü ilaç salınımı, mikrobik kontaminasyona direncin artması ve tahriş riski azalması gibi farmasötik açıdan yararlı özellikler sergilemektedirler (Anand ve ark., 2001).

Organojellerin termodönüşüm özelliği, ilaç dağıtım sistemi olarak organojellerin potansiyel kullanımında büyük ilgiye sebep olmuştur. Organojellerin termodinamik istikrarlı doğası, organojellerin düşük enerji seviyesinde bulunduğu, lifli yapının spontan oluşumuna atfedilmiştir. Sıcaklık duyarlılığının yanı sıra, organojeller aynı zamanda kontrollü dağıtım sistemleri geliştirmek için araştırılan nemin varlığına duyarlıdır (Anand ve ark., 2001; Tarun ve ark., 2011).

Organojeller düşük hidratlara sahiptir, ilaç polimerini çözer ve zincirler arasında taşınırlar. Çapraz bağlar organojellerin hidrofobikliğini artırır ve ilacın difüzyon hızını azaltır. Dolayısıyla oluşan üç boyutlu ağ yapısı, dış apolar fazın akışını engeller (Anand ve ark., 2001; Tarun ve ark., 2011).

Willmann ve ark., (1992)'nin yapmış oldukları çalışmada, lesitin organojelleri (LO) ile elde edilen skopolamin nakil oranının, aynı konsantrasyonda ilacın sulu bir solüsyonuyla elde edilenden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Birkaç terapötik ajan, topikal yolla (dermal veya transdermal etki için) nakil için LO olarak formüle edilmiştir. Termodinamik olarak kararlı olması nedeniyle, LO kendiliğinden emülsiyonlaştırma ile hazırlanır ve bu nedenle raf ömrü uzar. Bu yeni matrisin topikal bir araç olarak kullanımı cilt iritasyon potansiyelinin çok düşük olması nedeniyle daha da artmıştır (Kumar ve Katare, 2005).

Organojel sistemleriyle dağıtımını yapılan bazı ilaç aktif maddeleri aşağıda Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Organojel sistemleri ile dağıtımı yapılan ilaç aktif maddeleri.

Organogel Türleri	Biyoaktif maddeler	Kaynak
Lesitin organojelleri	Broxaterol, skopolamin, nicardipine	Willimann ve ark., 1992; Aboofazeli ve ark., 2002
PLO organojelleri	Methimazole, dexamethasone	Willis-Goulet ve ark., 2003
Birinci sınıf lesitin organojelleri	Methimazole	Mayer ve ark., 2010
MBG organojelleri	Propranolol hydrochloride, Ketorolac tromethamine	Hadidi ve ark., 2009; Sinha ve ark., 2009
Sorbitan organojelleri	Antigen, sumatriptan, doxorubicin	Murdan ve ark., 1999; Uchegbu ve Vyas, 1998
Poli (etilen)organojelleri	Leuprolide	Plourde ve ark., 2005

**Tablo 2.** Organojel sistemleri ile dağıtımı yapılan biyo aktif maddeler.

Jelatör		Jel bileşimi ve formu	Dağıtılan Molekül	Yapılan analizler	Kaynak
Grup	Tip				
Monogliserit	Monostearin	MCT Span 20 çözücüsü; % 20 MAG; Oleojel.	Kürküminoid	İn vitro lipoliz, biyo-erişilebilirlik	Yu ve ark., 2012
Yağ asidi	Polikosanol (% 60 oktakosanol)	Zeytin yağı; % 1-10 polikosanol; Oleojel küre şeklinde parçacıklar	Ferulik asit	İn vitro salınım	Lupi ve ark., 2013
Sorbitan esterleri	Sorbitan monostearat(SMS)	Sorbitan monooleat ve polisorbate 20; % 18 SMS; Oleojel içeren jelatin kapsüller	Siklosporin	İn vitro biyoyararlanım, in vivo-köpeklerde biyoyararlanım	Murdan ve ark., 2005
	Sorbitan monopalmitate (SMP)	İki sistem: hint yağı,% 25 SMP; Ve hint yağı-su,% 13 SMP; Oleojel tabletleri.	Metronidazole	In-vitro salım, jel parçalanma çalışmaları.	Singh ve ark., 2013
Şeker ester	Sukroz stearat	MCT; % 20 şeker ester; Su içinde jel-nanoemülsiyon.	Quersetin	İn vitro biyo-erişilebilirlik	Xuechen 2014
Hidroksi yağ asit	12-hidroksistearik asit (12-HSA)	Kanola yağı; % 2 12-HSA; Oleojel.	β-karoten	İn vitro biyo-erişilebilirlik	Hughes ve ark., 2011

### Biyoaktif bileşiklerin organojeller ile dağıtım sistemleri

Organojel esaslı dağıtım sistemleri, suda çözünmeyen nutrasötikler için yüksek kararlılık ve yüksek kapsülleme verimi nedeniyle gıda alanında nispeten yeni bir uygulamadır (Zahi ve ark., 2014).

Birçok önemli biyoaktif bileşik hidrofobik olduğundan, çözünürlüğü arttırmak ve polar olmayan farmasötik ürünlerin ve nutrasötiklerin salınımını kontrol etmek, biyoaktif moleküllerin biyoyararlanımını ve biyolojik olarak erişilebilirliğini arttırmak için doğal bir yol olarak organojellerin kullanılmaları önerilmiştir (Hughes ve ark., 2009; Davidovich-Pinhas 2015).

Dağıtım sistemi olarak organojel bazlı emülsiyonlarının kullanımı, hazırlanmasının kolaylığı veya yüksek kontrol edilebilirliği nedeniyle son zamanlarda katlanarak artmıştır (Yu ve Huang, 2012; Zahi ve ark.,

2014). Uygun formülasyon ve işleme koşullarıyla hazırlanmış olan organojel emülsiyonları, hem hidrofilik hem de hidrofobik biyoaktif bileşiklerin salımını kontrol etmek için kullanılabilir (Hughes ve ark., 2009). Örneğin, fitosterollerin organojel emülsiyonlarının konvansiyonel emülsiyonlara göre, serbest bırakma faktörlerine yeni bir bakış açısı getirdikleri ve gelişmiş lezzet profiline sahip, yağdan arındırılmış ve sterol-zenginleştirilmiş fonksiyonel ürünler sunma vaadinde bulunduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2017).

Tablo 2’de çeşitli organojellerde başarıyla dahil edilen çeşitli biyoaktif maddeleri gösterilmiştir (Sahoo ve ark., 2011).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Olejellerin biyoaktif madde ve ilaç dağıtım sistemleri için en önemli avantajları, birçok bileşen ile uyumlu ve çok farklı dağıtım hızlarıyla yararlanabilmesidir. Hazırladıkları organojelator maddeler de güvenli olduğu için, kapsülün kendisi oldukça güvenli ve ucuz bir dağıtım sistemi sağlayabilmektedir. Hem lipid-çözünür hemde su-çözünür maddeleri bu yöntemle enkapsüle etmek mümkündür. Oleojeller henüz hidrojel kadar yaygın olarak kullanılmalarında, bu alanda büyük bir potansiyel taşıdıkları ortadadır. Oleojellerin ilaç endüstrisinde kullanılması için, güvenlik, biyo-uyum ve etkenlik açısından geliştirilmesi gerekmektedir. Bu konularda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Felt, O., Buri, P., & Gurny, R. (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24, 979-993.
- Turner S., Federici C., Hite M., Fasshihi R., 2004. Formulation, development and human in vitro-in vivo correlation for a novel, monolithic controlled-release matrix system of high load and highly water-soluble drug niacin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30, 797-807.
- Hughes, N.E., Marangoni A.G., Wright A.J., Rogers M.A., Rush J.W.E., 2009. Potential food applications of edible oil organogels. *Trends in Food Science & Technology* 20: 470-480.
- Kulkarni S.D., Acharya R., Rajurkar N.S., Reddy A.V.R., 2007. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. *Food Chemistry*, 103 (2), pp. 681-688.
- Swieca M., 2016. Potentially bioaccessible phenolics, antioxidant activity and nutritional quality of young buckwheat sprouts affected by elicitation and elicitation supported by phenylpropanoid pathway precursor feeding. *Food Chemistry*, 192, pp. 625-632.
- Co D.E ve Marangoni AG., 2012. Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 749-780
- Lupi FR., Gabriele D., Facciolo D., Baldino N., Seta L., De Cindio B., 2012. Effect of organogelator and fat source on rheological properties of olive oil-based organogels. *Food Res. Int.*, 46, 177-184.
- Yılmaz E., Ögütçü M. 2015. Oleogels as spreadable fat and butter alternatives: sensory description and consumer perception. *RSC Adv.*, 5: 50259- 50267.
- Dassanayake LSK., Kodal DR., Ueno S., 2011. Formation of oleogels based on edible lipid materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 432-439.
- Marangoni AG ve Garti N., 2011. *Edible oleogels: Structure and health implications* (1st ed.). Champaign: AOCS Press.
- Marangoni, A.G., 2013. Polymer Gelation of Oil. EP 2 440 066 B1, 09.10.2013.
- Tang D ve Marangoni AG., 2007. Corrigendum to “Modeling the rheological properties and structure of colloidal fat crystal networks. *Trends Food Sci. Technol.*, 18, 474.
- Silva BV., Barreira JCM., Oliveira MBPP., 2016. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science & Technology*. Volume 50, Pages 144-158.
- Kris-Etherton PM., Hecker KD., Bonanome A., Coval SM., Binkoski AE., Hilpert KF., Griel AE., Etherton TD., 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113 (9), Pages 71-88.
- Mahfoudhi N., Ksouri R., Hamdi S., 2016. Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications in food industry. *Emulsions, A volume in Nanotechnology in the Agri-Food Industry*, Pages 365-403.
- Wang L ve Torsten Bohn T., 2012. *Health-Promoting Food Ingredients and Functional Food Processing. Nutrition, Well-Being and Health*. Volume 9: 201-224.
- Zhu C., ve Liu X., 2013. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from pomegranate peel by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1197-1202.

- Vélez MA., Perotti MC., Santiago L., Gennaro AM, Hynes E., 2017. Bioactive compounds delivery using nanotechnology: design and applications in dairy food. *Nutrient Delivery*, Chapter 6, pp: 221-250.
- Hejazi R ve Amiji, M., 2003. Chitosan-Based Gastrointestinal Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, Vol. 89, pp. 151-165
- McClements DJ., Decker EA., Park Y., Weiss J., 2009b. Structure Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 49, No. 6, pp. 577-606.
- Schrooyen P., van der Meer R., De Kruif C., 2001. Microencapsulation: its application in nutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 475–479.
- Gunasekaran S., Ko S., Xiao L., 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *J. Food Eng.*, 83 (1), pp. 31–40.
- Hedrn E., Diaz V., Svanberg U., 2002. Estimation of carotenoid accessibility from Carrot determined by in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 425–430.
- Cardoso C., Afonso C., Lourenço H., Costa S., Nunes M.L., 2015. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. *Trends in Food Science & Technology*, 41, pp. 5–23.
- Rein MJ., Renouf M., Cruz-Hernandez C., Actis-Goretta L., Thakkar SK., da Silva Pinto M., 2013. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 75, 588–602.
- Alminger, M., Aura, A.-M., Bohn, T., Dufour, C., El, S., Gomes, A., Karakaya, S., Carmen Martinez-Cuesta, M., McDougall, G. J., Requena, T., Santos, C., 2014. In Vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13 (4), 413-436.
- McClements DJ. ve Li Y., 2010. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and realese of lipophilic componenets. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 159, 213–228.
- Dahan A ve Hoffman A., 2008. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *J. Controlled Release*, 129, 1–10.
- McClements DJ., Decker EA., Park Y., Weiss J., 2008. Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components. *Food Biophys.*, 3(2): 219–228.
- Nik AM., Corredig M., Wright A. J. 2011. Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 278–289.
- Liu C, Corradini M, Rogers MA., 2015. Self-assembly of 12-hydroxystearic acid molecular gels in mixed solvent systems rationalized using Hansen solubility parameters. *Colloid and Polymer Science* 293(3): 975-983.
- O’Sullivan CM., 2016. In-Vitro Bioaccessibility and Stability of Beta-Carotene in Ethylcellulose Oleogels. Thesis. The University of Guelph. Canada.
- Singh M., 2011. Development of Sorbitan Monostearate Organogels for Controlled Delivery Systems. Thesis. Department of Biotechnology & Medical Engineering.
- Maljaars PWJ., Peters H.P.F., Mela D.J., Masclee AAM., 2008. Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review. *Physiol Behav*, ;95(3):271–81.
- Talegaonkar S, Azeem A, Ahmad FJ, Khar RK, Pathan SA, Khan ZI., 2008. Microemulsions: a novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2:238–57.
- Singh H, Ye AQ, Horne D., 2009. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res.*,48(2):92–100.
- O’Sullivan, CM.,Barbut, S., Marangoni AG., 2016. Edible oleogels for the oral delivery of lipid soluble molecules: Composition and structural design considerations. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 57, Part A, November 2016, Pages 59–73.
- Davidovich-Pinhas M., 2015. Oleogels: A promising tool for delivery of hydrophobic bioactive molecules. *Therapeutic Delivery*, 6, pp. 1239–1241.
- Nanjwade BK., Patel DJ., Udhani RA., Manvi FV., 2011. Functions of Lipids for Enhancement of Oral Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. *Sci Pharm*, 79(4); 705–727
- Sagiri S, Behera B, Rafanan R, Bhattacharya C, Pal K., Banerjee I., Rousseau D., 2014. Organogels as matrices for controlled drug delivery: a review on the current state. *Soft Materials* 12(1): 47-72.
- Murdan S., Andrysek T., Son D., 2005. Novel gels and their dispersions–oral drug delivery systems for ciclosporin. *International Journal of Pharmaceutics*, 300 (1–2), pp. 113–124



- Singh M., 2011. Development of Sorbitan Monostearate Organogels for Controlled Delivery Systems. Thesis. Department of Biotechnology & Medical Engineering.
- Murdan S., 2005. Organogels in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2(3): 489-505.
- Anand A., Pisal SS., Paradkar AR., Mahadik KR., 2001. Applications of Organogels in Pharmaceuticals. *Journal of Scientific & Industrial Research* Vol. 60, pp 311-318.
- Tarun G., Ajay B., Bhawana K., Sunil K., Ravi J., 2011. Organogels: advanced and novel drug delivery system. *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (12), 15-21.
- Williman H, Walde P, Luisi PL, Gazzaniga A, Stroppolo F., 1992. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. *Journal of pharmaceutical sciences* 81(9): 871-874.
- Kumar R ve Katare OP., 2005. Lecithin Organogels as a Potential Phospholipid-Structured System for Topical Drug Delivery: A Review. *AAPS Pharm.Sci.Tech*, 6(2): p:298-310.
- Aboofazeli, R., H. Zia, and T.E. Needham, Transdermal Delivery of Nicardipine: An Approach to In Vitro Permeation Enhancement. *Drug Delivery*, 2002. 9(4): p. 239 - 247.
- Willis-Goulet, H., Schmidt BA, Nicklin CF, Marsella R, Kunkle GA, Tebbett IR., 2003. Comparison of serum dexamethasone concentrations in cats after oral or transdermal administration using pluronic lecithin organogel (PLO): a pilot study. *Veterinary Dermatology*, 14(2): p. 83-89.
- Mayer, J., Wagner R., Taeymans O., 2010. Advanced Diagnostic Approaches and Current Management of Thyroid Pathologies in Guinea Pigs. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13(3): p. 509-523.
- Hadidi, N., Nazari N., Aboofazeli R., 2009. Formulation and optimization of microemulsion-based organogels containing propranolol hydrochloride using experimental design methods. *DARU*, 17(3).
- Sinha V., Kumar R., Singh G., 2009. Ketorolac tromethamine formulations: an overview. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 6(9): p. 961-975.
- Murdan S., Gregoriadis G., Florence AT., 1999. Novel sorbitan monostearate organogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88(6): p. 608-614.
- Uchegbu I ve Vyas S., 1998. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 172(1-2): p. 33-70.
- Plourde F., Motulsky A., Couffin-Hoarau AC., Hoarau D., Hy Ong H., Leroux JC., Plourde, F., 2005. First report on the efficacy of l-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs. *Journal of Controlled Release*, 108(2-3): p. 433-441.
- Zahi MR., Wan P., Liang H., Yuan Q., 2014. Formation and stability of d-limonene organogel-based nanoemulsion prepared by a high-pressure homogenizer. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 62 (52), pp. 1256–12563
- Yu HL ve Huang Q., 2012. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (21), pp. 5373–5379
- Chen, XW., Chen, YJ., Wang, JM., Guo, J., Yin, SW., Yang, XQ., 2017. Tunable volatile release from organogel-emulsions based on the self-assembly of  $\beta$ -sitosterol and  $\gamma$ -oryzanol. *Food Chemistry*. Volume 221, Pages 1491–1498.
- Sahoo S., Kumar N., Bhattacharya C., Sagiri SS., Jain K., Pal K., Ray SS., Nayak B., 2011. Organogels: Properties and Applications in drug delivery. *Designed Monomers and Polymers*, 14:95–108.
- Yu H., Shi K., Liu D., 2012. Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids. *Food Chem.*, 131:48–54.
- Lupi, F.R., Gabriele D., Greco V., Baldino N., Seta L., de Cindio B., 2013. A rheological characterisation of an olive oil/fatty alcohols organogel. *Food Research International*, 51: 510-517.
- Singh V.K., Pal K., Pradhan D.K., Pramanik K., 2013. Castor oil and sorbitan monopalmitate based organogel as a probable matrix for controlled drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 130 (3) (2013), pp. 1503–1515.
- Xuechen X., 2014. Improve bioaccessibility of quercetin using pseudo-organogel based nanoemulsions. Rutgers, New Brunswick, New Jersey.
- Hughes N.E., Rush J.W., Marangoni A.G., 2011. Clinical study on 12-hydroxystearic acid organogel ingestion. *Edible Oleogels, structure and health implications* (2011), pp. 313–330.

## ***In vitro* study of mTOR gene expression in plasma based microrna-7 / chitosan complexes in hepatocellular carcinoma cell lines**

Melek Evirgen\*, Ceyda Ekentok Atici, Suna Ozbas Turan

Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Marmara University, Tıbbiye Street, 34668 Istanbul, Turkey

\* Corresponding author e-mail: melekevirgen@gmail.com

### **Abstract**

MikroRNAs are small, endogenous and non-coding RNA molecules which regulate gene expression. Recent studies show that deregulation of miRNAs have been associated with different diseases including cancer. Therefore, miRNAs are important therapeutic target in cancer. However, major obstacles of usage miRNAs in therapy are stability, rapid clearance and internalization. For this reason, it is important in terms of therapy with appropriate carrier system to the cells. Aim of this study is to investigate efficacy (invasion, apoptosis and cell proliferation) and usability in hepatocellular carcinoma (HCC) cancer cell lines (Hep3B and HepG2) of polyplexes forms of chitosan and miR-7 mimic. miR-7 mimic and chitosan complex was prepared. In vitro characterisation of these complex was done. With these dosage have used to investigate mTOR protein levels by using ELISA assays and invasion, apoptosis and cell proliferation assays have done. Our studies show that chitosan/miR-7 complex was internalized stably to cancer cells, thus deregulated miRNA levels repaired. Invasiveness of cancer cells was reduced. Chitosan complexes were shown to be safe and efficient delivery system for miRNA.

**Keywords:** chitosan, chitosan/miR-7 complex, hepatocellular carcinoma, miR-7, miRNA delivery system.

### **INTRODUCTION**

Cancer is a prevalent health problem all over the world. Lung cancer is the most common type of cancer that causes death (Siegel et al., 2015) According to Findings from the Global Burden of Disease Study 2017 report published by Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME); lung, colorectal, gastric, liver and breast cancers are widespread in cancer-related deaths in 2017. Number of deaths are 1.880.000, 896.000, 864.000, 819.000, 611.000 respectively. Hepatocellular carcinoma (HCC) includes approximately 75% - 85% of all diagnosis of primary liver cancer. An effective treatment method is not known about hepatocellular carcinoma yet (Herath et al., 2006). The invasion, angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma are a complicated process comprised of many steps. It is a complex disease, which interplays between both genetic and environmental factors. New novel therapeutic approaches are necessary due to this complex nature of cancer. Recently, RNA interference (RNAi) has the potential for cancer therapy (Racz et al., 2006). MicroRNAs (miRNA) are small RNA molecules which trigger RNAi mechanism. They are small, non-coding and single-spiral RNAs. Many type of miRNAs have been identified to regulate tasks in the cell.

The miR-7 family is discovered by Lagos- Quintana in 2001, firstly (Lagos-Quintane et al., 2001). Some researches have shown that miRNA-7 plays an important role in hepatocellular carcinoma. miRNA-7 is defined as an tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cell line (Fang et al., 2012; Zhu et al., 2014; Wang et al., 2017; Kabir et al. 2018).

The most important challenges for the miRNA-based therapeutics are low stability and poor cellular uptake. For effective therapy, the miRNA must penetrate the target cell and tissue, so the development of efficient and safe delivery systems is important. Viral and non-viral vectors have been extensively used in nucleic acid-based therapy. Compared to viral vectors, non-viral vectors have several advantages such as a lack of immunogenicity, low or no integration in the genome, large scale production, and size limitations of nucleic acids. Cationic polymers are widely used as gene delivery systems (Buschmann et al., 2013; Neuberg and Kichler, 2014; Salva et al., 2013). Chitosan is a promising non-viral vector in gene delivery because of properties such as its cationic structure, biodegradability, biocompatibility, and non-toxicity. There are a few studies related to chitosan-based systems for miRNA delivery in cancer therapy. Although the biological functions of miRNA-7 have been studied, there has been no report to date related to the development and progress pathways of cancer by using chitosan/miRNA-7 nanoplexes. In this study, we investigated the therapeutic role of chitosan/miRNA-7 nanoplexes in angiogenesis, invasion, and apoptosis, in various hepatocellular carcinoma cell lines including Hep3B and HepG2.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials and Procedures

The human hepatocellular carcinoma Hep3B and HepG2 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, Virginia, U.S.A.), Hsa-miR-7 was obtained from Origene (Rockville, Maryland, U.S.A.). Chitosan (75 kDa; 75% - 85% deacetylation degree) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

### Preparation and Control of Chitosan/miRNA Nanoplexes

Chitosan was dissolved in 40 mM acetate buffer (pH 5.4) and the final concentration was adjusted to 1%. Chitosan solution was mixed with the solution of miR-7 (0.5 µg/µl) at different ratio (+/-) (0.5/1 to 5/1). Formation of nanoplexes were checked by agarose gel electrophoresis using 2% of gel at 80 mA and 45 minutes and zeta potential and size of nanoplexes were characterized with ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) in PBS pH 7.4 at 25 °C. miRNA was visualized under UV light as a result of reaction of miRNA with RedSafe™ (Intron Biotech, South Korea) nanoplexes were prepared in triplicate.

### Cell Lines and Cell Culture

The hepatocellular carcinoma cell lines Hep3B and HepG2 were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, penicillin and streptomycin antibiotic solution (Biological Industries, USA). All cell lines were cultivated in incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator, Japan) in a humidified atmosphere. 6-well plates were used for studies. Hepatocellular carcinoma cell lines were transfected with chitosan/miRNA-7 (1/1 and 2/1) nanoplexes.

### Proliferation Test by MTT Assay

Hep3B and HepG2 cell lines were seeded into 96-well plates, 24 hours after transfection. The growth activity of the cell lines were evaluated by 3-(4, 5 dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assays according to the literature.

### Effects of Chitosan/miR-7 Nanoplexes on mTOR Expression Levels

Cell culture supernatants were centrifuged for 5 min to remove cells and cell debris. All reagent, samples and standards are prepared. Sample and ELISA reagent are added into each well and are incubated for 1 hour at 37 °C. Then this steps, the plate is washed 5 times. Substrate solution A and B are added and are incubated for 1 hour at 37 °C. Stop solution is added and color is developed. OD values are read within 10 minutes. mTOR (BT Laboratory, China) protein that accumulated in the culture medium and dilutions of a recombinant human protein standards were analyzed using sandwich ELISA according to manufacturer protocols. Protein concentrations in the samples were determined spectrophotometrically (UV Spectrophotometry, Shimadzu, Japan) at 450 nm. Each test was repeated for three times and data were shown as mean values ± SE (n = 3).

## RESULTS

### Nanoplex Formation and Characterization

Chitosan formed full complexes with miRNA-7 at 1/1 and 2/1 (+/-) ratios. The chitosan partly complexed with miRNA below this ratio. Chitosan/miRNA-7 nanoplexes having 254.3 ± 12 and 305.6 ± 26 nm size were used in this study respectively. Chitosan/miRNA-7 nanoplexes having 5.75-18.8 mV surface charge were used in this study. The chitosan partly complexed with miRNA below this ratio (Fig. 1).

### Proliferation Test by MTT Assay

It was observed that chitosan / miRNA-7 1/1 formulation applied to Hep3B cell line decreased cell proliferation compared to control and chitosan / miR-7 2/1 formulation increased cell proliferation compared to control (Fig. 2). It was observed that chitosan / miR-7 1/1 formulation applied to HepG2 cell line did not change cell proliferation compared to control, chitosan / miR-7 2/1 ratio increased cell proliferation compared to control (Fig. 2).

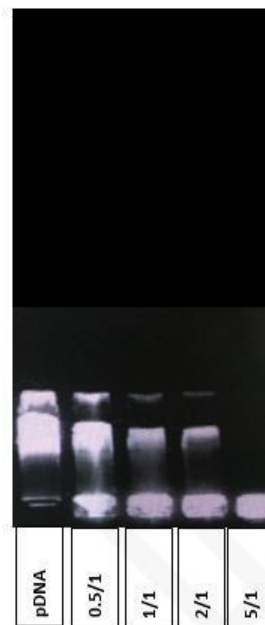


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of free miRNA-7 and chitosan/miR-7 nanoplexes prepared in the different ratios (0.5/1, 1/1, 2/1 and 5/1).

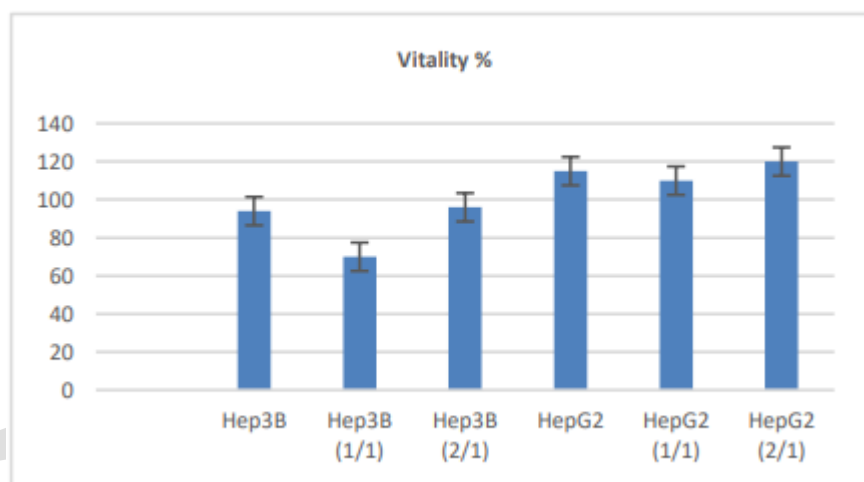


Fig.2 Determining by MTT vitality levels of cell lines after chitosan/miRNA-7 nanoplex treatment.

### Effect of Chitosan/miRNA-7 Nanoplexes on mTOR Expression

In order to investigate the effect of the miR-7 containing chitosan-based systems on angiogenesis, the mTOR levels of the hepatocellular carcinoma cell lines were measured in treated and untreated cancer cell lines (Fig. 3). Ratio of 1/1 and 2/1 in the Hep3B cell line, after treatment with chitosan/miRNA-7, the mTOR levels are reduced by 14% and 15% respectively. In spite of that ratio of 1/1 and 2/1 in the HepG2 cell line, after treatment with chitosan/miRNA-7, the mTOR levels are risen by 7% and 9% respectively.

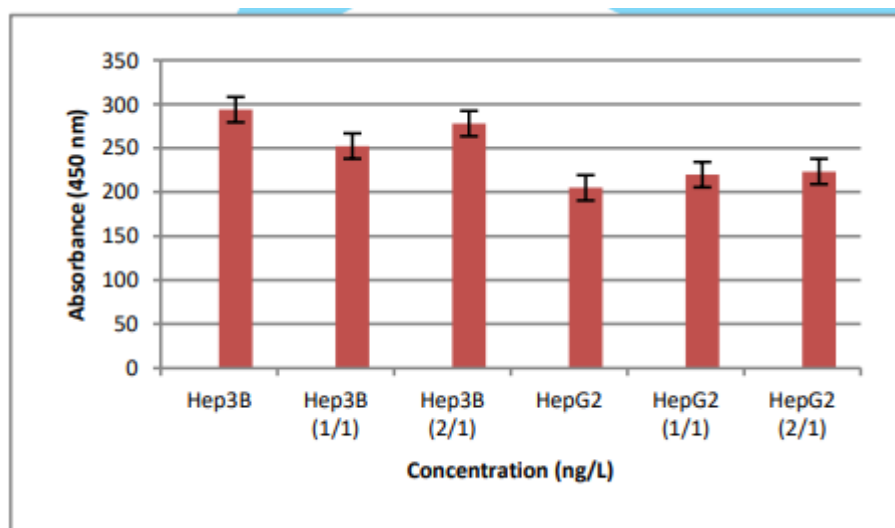


Fig.3 mTOR effect on different cell lines.

## DISCUSSION

Although there have been advancements in diagnostics and therapeutics, hepatocellular carcinoma is still the leading cause of cancer deaths in the world. Because of its resistance to chemotherapy, new approaches are necessary in the therapy of hepatocellular carcinoma. miRNA-7 has been downregulated hepatocellular carcinoma cell lines. In this study, miR-7 regulates expression targeting mTOR, and this information is consistent with the literature (Zhang et al., 2017).

## CONCLUSION

In conclusion, chitosan is a suitable carrier for miRNA-7. In this study, the role of chitosan/miRNA-7 nanoplexes in tumor development and angiogenesis progression was studied in two different hepatocellular carcinoma cell lines. The effect of the chitosan/miRNA nanoplexes on the tumor angiogenesis, proliferation, metastasis, and changed depending on the cell types. Therefore, during treatment with chitosan based miRNA-7 nanoplexes in hepatocellular carcinoma, the type of tumor cells must be considered.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Marmara University.

## REFERENCES

- Buschmann, M.D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., Darras, V., 2013. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (9), 1234–1270.
- Fang YX, Xue JL, Shen Q, Chen JZ, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* (2012) 55:1852–62.
- Herath N.I, Leggett B.A, MacDonald G.A. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006;15–21.
- Kabir TD, Ganda C, Brown RM, Beveridge DJ, Richardson KL, Chaturvedi V, et al. A microRNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness of sorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2018; 67: 216-31.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853–8.
- Neuberg, P., Kichler, A., 2014. Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines. *Adv. Genet.* 88, 263–288.
- Rácz Z. and Hamar P., “Can siRNA technology provide the tools for gene therapy of the future?,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, no. 19, pp. 2299-2307, 2006.

- Salva, E., Turan, S.O., Akbuga, J., 2013. The development of ternary nanoplexes for efficient small interfering RNA delivery. *Biol. Pharm. Bull.* 36 (12), 1907–1914.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.
- Wang Y, Wang Q, Song J. Inhibition of autophagy potentiates the proliferation inhibition activity of microRNA 7 in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017;14:3566-3572.
- Zhang Y, Huang Bo, Hui-Yun Wang, Augustus Chang, and X.F. Steven Zheng Emerging Role of MicroRNAs in mTOR Signaling, *Jul;74(14):2613-2625.*
- Zhu Z, Zhang X, Wang G, Zheng H. Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma. *Hepat Mon* 2014.

DRAFT